HAL
open science

Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermiologie

Lucie Post

To cite this version:

Lucie Post. Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermiologie. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02328744

HAL Id: dumas-02328744

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02328744

Submitted on 23 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Année : 2018-2019

Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermiologie

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DIPLÔME D'ÉTAT

Lucie POST

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le 11/10/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Présidente du jury : Mme le Professeur HENNEBICQ Sylviane

Membres : Mme le Professeur HOFFMANN Pascale

M. le Professeur FAURE Patrice

Mme le Docteur FAURE Anne Karen

M. le Docteur BESSONNAT Julien (directeur de thèse)

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **Pr. Patrice MORAND**

Année 2018-2019

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BOLLA Michel	Cancérologie-Radiothérapie
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et de Pathologique Cytologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CANALI-SCHWEBEL Carole	Réanimation médicale
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie générale
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	Chirurgie digestive et viscérale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Virologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	MALLION Jean-Michel	Cardiologie
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et Biologie Moléculaire
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophtalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Madame le Professeur Sylviane HENNEBICQ, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider cette thèse. Un grand merci pour votre soutien et votre confiance tout au long de mon parcours.

A Madame le Professeur Pascale HOFFMANN, merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci pour votre pédagogie, votre envie de nous apprendre de nouvelles choses dès que l'occasion se présente.

A Monsieur le Professeur Patrice FAURE, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre encadrement et vos cours durant mon semestre en biochimie.

A Madame le Docteur Anne Karen FAURE, merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en apportant votre expérience dans la biologie de la reproduction et vos compétences de qualiticienne.

A Monsieur le Docteur Julien BESSONNAT, merci d'avoir accepté de diriger ma thèse. En effet, merci pour ta confiance, tes conseils et ton écoute pour ce travail mais aussi pour ma formation tout au long de mon internat.

A toute l'équipe du laboratoire d'AMP

Merci à **Cécile, Emilie M, Emilie Q, Franck, JB, Lynda, Maeva, Magalie, Marie-Atéa, Mylène, Nath, Ono, Pierre, Solange** et à **toute l'équipe de gynécologues et sages-femmes**. Merci de m'avoir intégrée aussi chaleureusement. Ce fut un plaisir de partager ces deux années avec vous et avec enthousiasme que je m'apprête à passer deux nouvelles années en votre compagnie. Un grand merci aux techniciens qui m'ont apporté leur aide précieuse lors de mon travail de thèse, avec une attention toute particulière à Honorine qui s'est beaucoup impliquée à mes côtés.

Merci à **Charlotte** et **Thomas**, mes deux assistants préférés qui m'ont énormément apporté au quotidien durant toute ma formation, sauf lorsqu'ils étaient en congé maternité…

Merci à mes co-internes **Dorian** et **Quentin** d'avoir augmenté les rangs du groupe d'internes au laboratoire d'AMP, merci d'avoir partagé avec moi mon dernier semestre en tant qu'interne. Dorian, je te souhaite le meilleur pour ton aventure amiénoise et pour la suite. Quentin, tu n'es qu'au début de ta formation mais je te souhaite aussi le meilleur pour la suite, quel bon choix que la PMA !

A ma famille et mes amis

A mes parents, un simple merci ne suffirait pas pour exprimer à quel point je vous remercie pour votre soutien tout au long de mes études, votre compréhension et votre amour. Vous ne vous en souvenez peut-être pas mais je me rappelle l'année de mon bac avoir fait la liste des étapes cruciales à venir : le permis de conduire, le bac, les deux concours de la première année de médecine puis de la sixième et enfin la thèse… 10 ans plus tard, nous y voilà !

A mon frère Gabriel, merci tout simplement d'être là, d'être toi, pour ces fous rires qui sont souvent au dépend de maman… Sache que je serai toujours là pour toi et je te souhaite que du bonheur dans ta vie, où qu'elle soit !

A mes 3 grands frères, Franck, Stéphane et Lionel, merci pour leur amour fraternel et leur soutien. Petit clin d'œil à Stéphane qui m'a gentiment poussé à faire médecine plutôt que de faire sage-femme, voilà où j'en suis quelques années plus tard grâce à toi !

A mes chères amies Clara, Elsa, Floriane et Pauline, merci à vous pour toutes ces années partagées depuis nos débuts dans les études de médecine, en passant par les confs, la préparation au concours puis nos internats respectifs. Même si l'une est partie à l'autre bout de la France et l'autre à Lyon, on fait de notre mieux pour se voir régulièrement et c'est un plaisir à chaque fois. Un grand merci également pour votre soutien dans les aléas de la vie. L'une après l'autre on arrive enfin au bout de ces études, courage à celles qui ont encore (un peu) de temps à tenir avant la délivrance.

Et je garde le meilleur pour la fin… **A Lionnel**, un immense merci à toi pour ton soutien inconditionnel, ton amour, tes attentions, merci de prendre soin de moi comme tu le fais. Tu sais ce qu'on dit ? Merci d'être toi tout simplement. Avant tout, merci de croire en moi et de me rendre forte quand je n'y arrive pas moi-même. A mon tour d'être ton soutien inconditionnel.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS *6*

TABLE DES ABREVIATIONS *10*

INTRODUCTION *11*

AVANT-PROPOS *14*

I. CHAPITRE 1 : FERTILITE MASCULINE **14**
- A. L'appareil génital masculin 14
- B. Le spermatozoïde 15
- C. L'exploration de la fertilité masculine 20
- D. Capacitation et hyperactivation du mouvement 27

II. CHAPITRE 2 : LE CASA **29**
- A. Principe de fonctionnement 29
- B. Lames de comptage et effet Segré-Silberberg 34

III. CHAPITRE 3 : ACCREDITATION ET VALIDATION DE METHODE **35**

OBJECTIFS *41*

I. OBJECTIF PRINCIPAL **41**

II. OBJECTIFS SECONDAIRES **41**

MATERIEL ET METHODE *42*

I. LA METHODE MANUELLE **43**
- A. Concentration 43
- B. Mobilité 44

II. LA METHODE AUTOMATISEE **45**
- A. Présentation du CASA 45
- B. Préparation de l'échantillon de sperme 45
- C. Analyse sur le CASA 47
- D. Contrôles internes de qualité (CIQ) 49

III. LA VALIDATION DE METHODE **49**

IV. ÉTUDES SECONDAIRES **53**
- A. Les dilutions 53
- B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique 54

V. STATISTIQUES **56**

RESULTATS *58*

I. REPETABILITE **58**
- A. Concentration spermatique 58
- B. Mobilité spermatique 58

II. FIDELITE INTERMEDIAIRE **59**
- A. Concentration spermatique 59
- B. Mobilité spermatique 59

III. VARIABILITE INTER-OPERATEURS **60**
- A. Concentration spermatique 60

B. Mobilité spermatique 60

IV. EXACTITUDE 61
A. Concentration spermatique 61
B. Mobilité spermatique 61

V. INCERTITUDE DE MESURE 62

VI. COMPARAISON DE METHODE 62
A. Concentration spermatique 63
B. Mobilité spermatique 64
C. Nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs (millions/ml) 67

VII. ÉTENDUE DE MESURES 68
A. Concentration spermatique 68
B. Mobilité spermatique 68

VIII. INTERFERENCES 69
A. Flux laminaire 69
B. Spermatozoïdes enroulés 70
C. Cellules rondes 72

VI. COMPARAISON LAMES BIRR BIOSCIENCES-LAMES LEJA® 73

VII. ETUDES SECONDAIRES 75
A. Les dilutions 75
B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique 76

DISCUSSION 77

I. LA VALIDATION DE METHODE 77
A. Les performances de la méthode CASA 77
B. La comparaison de méthode 81

II. ETUDES SECONDAIRES 84
A. Les dilutions 84
B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique 85

III. AVANTAGES DU CASA 86

IV. LIMITES DU CASA 87
A. Facteurs influençant les performances du CASA 87
B. Les contrôles qualité et leurs limites 91

V. EXIGENCES ATTENDUES 94

VI. GESTION DES RISQUES 95
A. Principe de la gestion des risques 95
B. Les risques identifiés et leur moyen de maîtrise 96

VII. PERSPECTIVES ET APPLICATIONS 97
A. Perspectives 97
B. Applications cliniques 100

BIBLIOGRAPHIE 103

ANNEXES 108

TABLE DES ABREVIATIONS

ALH : Amplitude of Lateral Head displacement ou amplitude de déplacement lateral de la tête

AMP : Aide Médicale à la Procréation

CASA : Computer-Aided Sperm Analysis

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CQIL : Contrôle Qualité Inter-laboratoires

CV : Coefficient de Variation

EEQ : Evaluation Externe de Qualité

FIV : Fécondation In Vitro

HT : Hamilton Thorne

Hz : Hertz

ICSI : Injection de Spermatozoïde Intra-Cytoplasmique

IIU : Insémination Intra-Utérine

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LIN : Linéarité

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SQA : Sperm Quality Analyzers

STR : Straightness ou rectitude

TMS : Test de Migration-Survie

VAP : Velocity Average Path ou vitesse selon la trajectoire moyenne

VCL : Curvilinear Velocity ou vitesse curvilinéaire

VSL : Straight-Line Velocity ou vitesse de progression linéaire

INTRODUCTION

Un couple sur 6 sera amené à consulter pour infécondité au cours de sa vie procréative suite à une incapacité de concevoir après 1 an de rapports sexuels réguliers sans protection ni contraception. Parmi l'origine des facteurs en cause, on retrouve 20% de causes masculines, 34% de causes féminines, 38% de causes mixtes féminines et masculines et 8% de causes indéterminées (Thonneau et al. 1991). Au total, dans environ la moitié des cas il existe une origine masculine à cette infécondité. Dans tous les cas, le bilan de cette infécondité doit comprendre d'emblée une exploration des deux versants féminins et masculins.

Pour l'exploration des facteurs masculins d'infécondité, le spermogramme s'impose comme étant l'examen de base en complément de l'interrogatoire et l'examen clinique. En effet, il est le reflet à la fois de la spermatogenèse testiculaire, de la maturation et du stockage épididymaires, des sécrétions de la prostate et des vésicules séminales (élaboration du plasma séminal) ainsi que de la perméabilité des deux voies séminales : d'une part à travers l'analyse des spermatozoïdes (numération, mobilité, vitalité, morphologie) et d'autre part à travers la mesure du volume du recueil, du pH et de la viscosité. (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2010).

La majorité des laboratoires (79% selon Keel et al. 2000) réalisent le spermogramme grâce à une méthode manuelle d'examen au microscope du sperme, considérée comme la méthode de référence et décrite dans la 5ème édition du manuel de l'OMS 2010. La fidélité et la justesse de cette méthode restent toutefois peu optimales. La mise en place de contrôles internes de qualité (CIQ) et la participation aux programmes d'évaluations externes de qualité (EEQ) (Mallidis et al. 2012 ; Filimberti et al. 2013) sont des éléments primordiaux pour améliorer ces performances. D'autre part, les recommandations fournies par le manuel de l'OMS (5ème édition, 2010) ont pour objectif de standardiser les pratiques dans le cadre de la réalisation du spermogramme, notamment à travers l'adhésion à des procédures techniques bien définies. Malgré cela, il persiste une variabilité intra et interlaboratoires importante dans l'analyse des paramètres spermatiques (Keel et al. 2000 ; Auger et al. 2000) à en juger par les résultats de ces programmes d'EEQ.

Lors des quatre dernières décennies, l'apparition sur le marché d'automates permettant l'analyse automatisée du sperme a démontré qu'ils pouvaient être considérés comme étant une alternative à la méthode manuelle utilisée comme référence en routine pour améliorer la standardisation dans les laboratoires. Dans un premier temps, ces systèmes en question n'étaient pas performants concernant la mesure de la concentration des spermatozoïdes en raison de la difficulté à distinguer

les spermatozoïdes des débris ou des cellules rondes (OMS 2010). Puis les nouvelles générations de systèmes ont contribué à une meilleure analyse grâce à la détection du flagelle afin de permettre également la mesure de la mobilité spermatique ainsi que l'amélioration de la mesure de la concentration en présence de débris ou cellules rondes. Cela a également permis la mesure de paramètres cinétiques grâce à l'analyse fine du mouvement flagellaire non observable à l'œil humain. Il existe deux catégories d'analyseurs automatiques de sperme sur le marché qui se différencient par leur technologie de détection des spermatozoïdes. D'une part, le SQA (Sperm Quality Analyzers) qui est un système automatique complet basé sur la détection de signaux électro-optiques générés par les spermatozoïdes mobiles et ensuite interprétés grâce à des algorithmes (Lammers et al. 2014). Le traitement de ce signal pour la mesure de la mobilité spermatique est couplé à la technologie de spectrophotométrie pour déterminer la concentration des spermatozoïdes (Akashi et al. 2005 ; Agarwal et Sharma 2007). D'autre part, le système CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) qui est une méthode semi-automatisée basée sur un autre principe consistant en la capture d'images au microscope puis le traitement de ces images permettant la détection des spermatozoïdes mobiles et immobiles grâce à une acquisition successive et rapide de plusieurs champs (Mortimer 2000). Plusieurs études dont celle de l'équipe d'Agarwal en 2007 ont montré que ces systèmes d'analyse automatisée du sperme peuvent être une alternative plus précise et reproductible à la méthode manuelle connue pour sa grande variabilité et son manque de standardisation (OMS 2010). Le cahier de formation Bioforma (N°42 – Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin) permet une certaine tolérance pour l'estimation avec des différences acceptables établies, ce qui a pour conséquence ces subjectivité et variabilité inter-opérateurs importantes de la méthode manuelle. On peut citer également la difficulté de comptage en méthode manuelle lorsque la concentration spermatique est élevée, les spermatozoïdes étant de plus en plus superposés rendant la lecture difficile. D'autre part, ces systèmes permettent une analyse détaillée des paramètres cinétiques des spermatozoïdes.

L'accréditation vise à garantir la compétence ainsi que la qualité de rendu des résultats par les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) et repose sur la norme européenne NF EN ISO 15189 qui en définit les exigences réglementaires. Cette accréditation concerne les actes de biologie médicale, les activités biologiques d'aide médicale à la procréation et les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques réalisés en laboratoire de biologie médicale. Cela porte sur les phases pré-analytique (prélèvement et transport jusqu'au lieu d'analyse), analytique et post-analytique (interprétation biologique et validation du résultat). Depuis l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, l'accréditation est rendue obligatoire pour tous les LBM en France. Le 31 décembre 2017 était la première échéance fixée aux LBM dans le cadre de l'obligation législative

d'accréditation de leur activité. Les deux critères qui devaient être remplis à cette date étaient d'être accrédité sur chacune des familles d'examens pratiqués et sur au moins 50% de leur activité. La prochaine étape devrait consister à obtenir l'accréditation sur la totalité de leur activité d'ici le 1er novembre 2020.

Ainsi, depuis l'apparition de l'obligation d'accréditation pour tout laboratoire de biologie médicale en France, toute nouvelle méthode d'analyse doit être validée avant son utilisation afin de garantir la qualité des résultats. Le système CASA du fournisseur Hamilton Thorne (CASA HT CEROS II Clinical® version 1.11.3) a été installé au laboratoire du CHU de Grenoble en octobre 2017 et l'objectif est sa validation de méthode pour son application en routine dans le laboratoire d'aide médicale à la procréation (AMP).

AVANT-PROPOS

I. CHAPITRE 1 : FERTILITE MASCULINE

La définition de la fertilité masculine est en évolution constante. Elle évolue en fonction des progrès thérapeutiques réalisés dans le domaine de la procréation. Actuellement, la fertilité masculine se définit par la capacité pour un homme à parvenir avec une femme à la naissance d'au moins un enfant vivant avec ses propres gamètes. La fertilité masculine débute à la puberté (vers 13 ans en moyenne), atteint son maximum vers 20-30 ans, puis décline progressivement dès 35 ans. Elle peut être maintenue pendant toute la vie de l'individu.

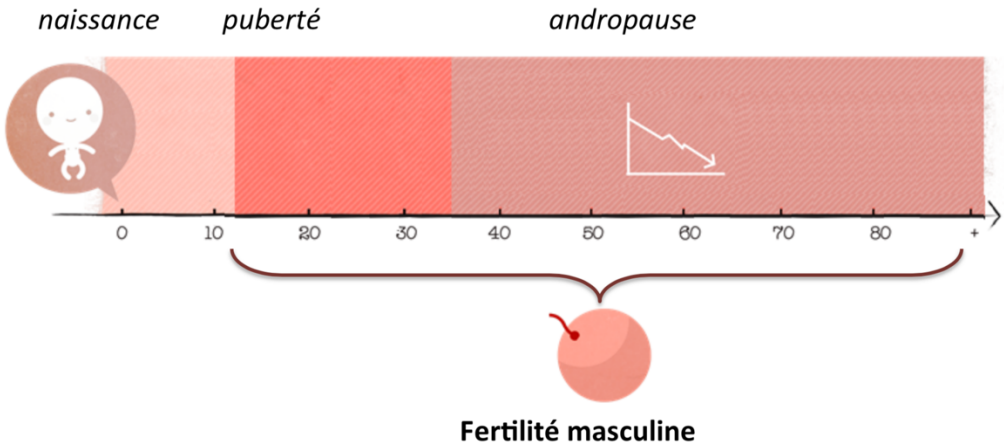


Figure 1 *- Fertilité masculine (Source : cours du Dr Sophie Brouillet intitulé « Fertilité masculine » au sein de l'Unité d'Enseignement « Fertilité féminine et implantation embryonnaire » du Master 1 Double Cursus de l'Université Grenoble Alpes)*

La fertilité d'un homme va dépendre :

- De l'anatomie du tractus génital masculin
- Et de sa capacité à émettre des spermatozoïdes fonctionnels à l'intérieur du vagin.

A. L'appareil génital masculin

L'anatomie du tractus génital masculin a une grande influence sur la fertilité masculine car son intégrité est essentielle à l'émission des spermatozoïdes produits dans les testicules jusque dans le vagin. L'appareil génital masculin est composé de plusieurs structures visibles sur la **figure 2** :

- Les testicules qui sont des organes pairs, symétriques, situés dans le scrotum.
- Les épididymes qui recouvrent la partie postérieure des testicules et correspondent à la partie initiale des conduits permettant l'excrétion du sperme.
- Les voies excrétrices représentées par les canaux déférents qui se poursuivent par les canaux éjaculateurs qui traversent la prostate pour se jeter dans l'urètre.

- Les glandes annexes : constituées des vésicules séminales, de la prostate et des glandes de Cowper (ou glandes bulbo-urétrales).
- Le pénis : formé par 2 corps caverneux et 1 corps spongieux et traversé par l'urètre.

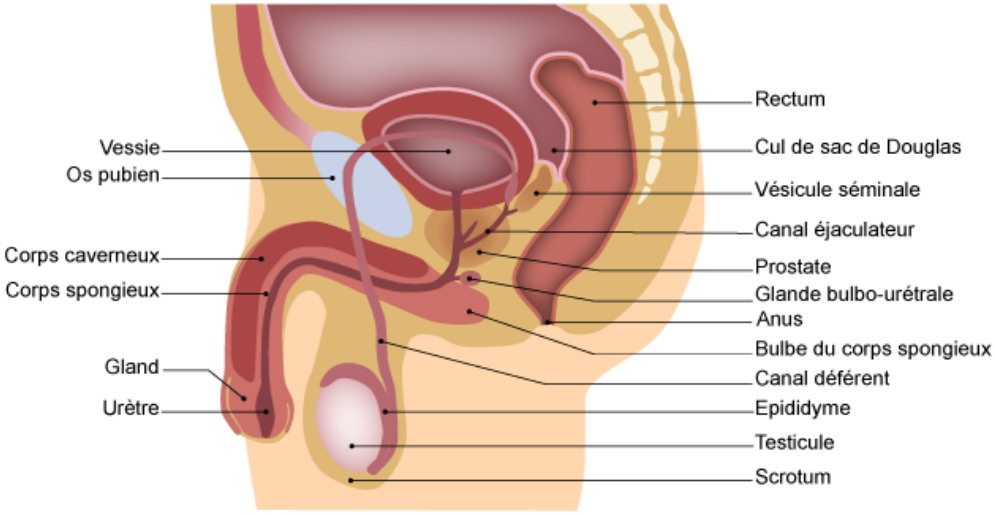


Figure 2 *- Anatomie de l'appareil génital masculin (Source : https://www.soins-infirmiers.com/discipline/gynecologie-obstetrique/anatomie-de-lappareil-reproducteur-masculin)*

B. Le spermatozoïde

a. Structure du spermatozoïde

Le gamète mâle appelé spermatozoïde est une cellule reproductrice hautement différenciée et spécialisée dans la fécondation. Le spermatozoïde humain est haploïde (1 chromosome à 1 chromatide pour chaque paire de chromosomes). Sa taille est d'environ 50-70 µm et il a une forme de petite poire de face et d'une flamme de bougie de profil. Le spermatozoïde est constitué de 3 parties (**Figure 3**), recouvert par la membrane plasmique en totalité :

- La tête
- Le cou (ou col)
- Le flagelle, lui-même constitué de 3 parties : pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale.

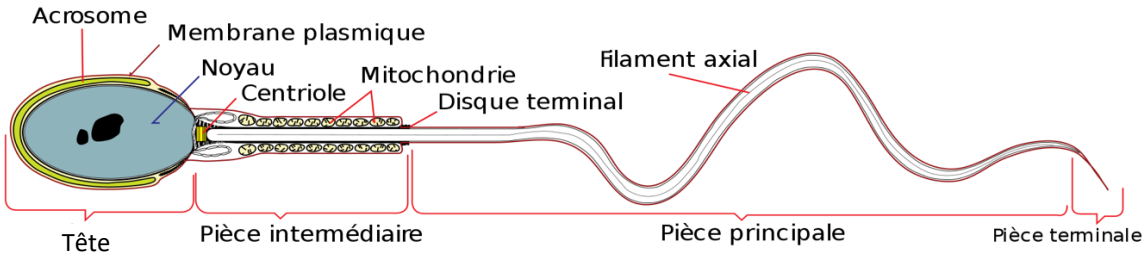


Figure 3 *- Schéma d'un spermatozoïde humain (Source : https://fr.wikipedia.org/wiki/Spermatozoïde_humain)*

i. La tête

La tête spermatique mesure environ 4-5 µm de long et 3 µm de large. Elle est quasiment dépourvue de cytoplasme et est constituée de 2 éléments principaux : le noyau et l'acrosome. Le noyau haploïde possède une chromatine très condensée, ce qui permet de protéger le génome du spermatozoïde lors de son long transit, d'abord dans le tractus génital masculin puis dans le tractus génital féminin. La tête renferme également l'acrosome : il s'agit d'une grande vésicule dérivant de l'appareil de Golgi contenant de nombreux enzymes et constitue une sorte de coiffe au niveau de la partie antérieure du noyau spermatique. Cet acrosome a un rôle fondamental lors de la fécondation par la libération de son contenu enzymatique permettant la lyse de la zone pellucide de l'ovocyte et l'apparition ou la modification de récepteurs et protéines jouant un rôle dans la fixation et la fusion avec l'ovocyte : ce phénomène s'appelle la réaction acrosomique.

i. Le cou

Le cou du spermatozoïde contient 2 éléments : la pièce connective et le centriole proximal. La pièce connective est composée de 9 colonnes segmentées en forme d'entonnoir. Ces colonnes segmentées se prolongent ensuite par les fibres denses au sein du flagelle. Le centriole proximal quant à lui est formé de 9 triplets de microtubules disposés en cercle avec un axe de 90° par rapport à l'axe du flagelle. Ce centriole proximal est impliqué dans la formation du fuseau mitotique de première division lors de la fécondation.

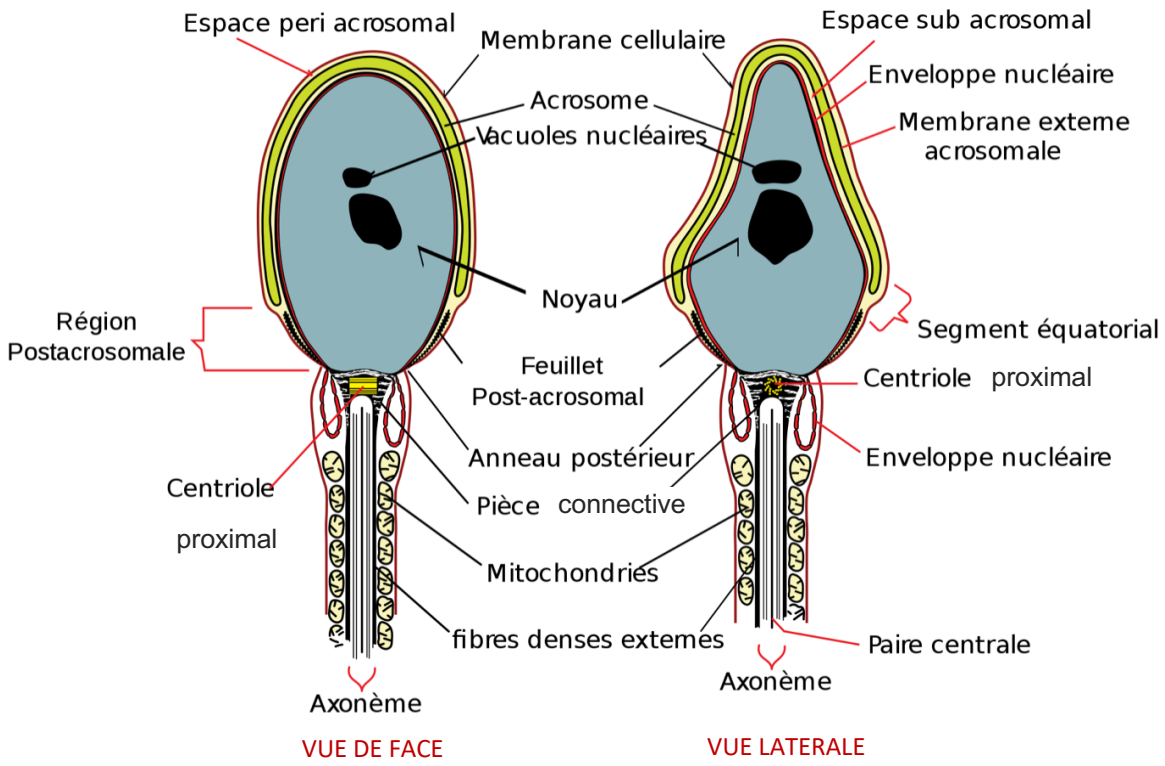


Figure 4 *- Schéma détaillé de la tête et du cou du spermatozoïde (Source : https://fr.wikipedia.org/wiki/Spermatozoïde_humain)*

ii. La flagelle

Le flagelle est constitué de fibres et de microtubules, c'est l'élément moteur du spermatozoïde puisqu'il lui permet d'avoir une mobilité indispensable pour sa rencontre avec l'ovocyte. Il est constitué de 3 parties : pièce intermédiaire (4-5 µm), pièce principale (45-50 µm) et pièce terminale (1-2 µm). La structure du flagelle est organisée autour de l'axonème avec la présence de structures péri-axonémales (sauf au niveau de la pièce terminale).

L'axonème est formé au centre des colonnes segmentées à partir du centriole distal. Il s'agit d'une structure constituée de microtubules organisés (**Figure 5**) avec 9 doublets de microtubules périphériques (microtubules A et B) reliés entre eux par des ponts de nexine et 1 doublet central entouré d'une gaine, relié par des fibres radiaires aux doublets périphériques. Les microtubules A sont dits « complets » et sont composés de 13 sous unités tubuline alors que les microtubules B sont dits « incomplets » et sont composés de 9 sous unités tubuline. Des bras internes et externes de dynéine sont associés au microtubule A et peuvent lier un microtubule A au microtubule B du doublet voisin : il s'agit d'ATPase et ont donc un rôle moteur.

Les différentes structures péri-axonémales sont :

- **Manchon mitochondrial** ou gaine de mitochondries : la pièce intermédiaire contient une zone riche en mitochondries suite à leur migration lors de la spermiogenèse. Ces mitochondries sont indispensables à la mobilité du spermatozoïde car elles apportent l'énergie nécessaire à la mobilité du flagelle grâce à l'hydrolyse de l'ATP.
- **Fibres denses** : elles prolongent les colonnes segmentées et correspondent à des densifications protéiques en regard des doublets périphériques. Elles sont présentes dans la pièce intermédiaire et la pièce principale.
- **Gaine fibreuse** : elle n'est présente que dans la pièce principale.
- **Colonnes longitudinales** : correspondent à un épaississement de la gaine fibreuse se confondant avec les fibres denses en regard des microtubules 3 et 8 (plan du doublet central).

La pièce terminale du flagelle quant à elle ne contient pas de structures péri-axonémales.

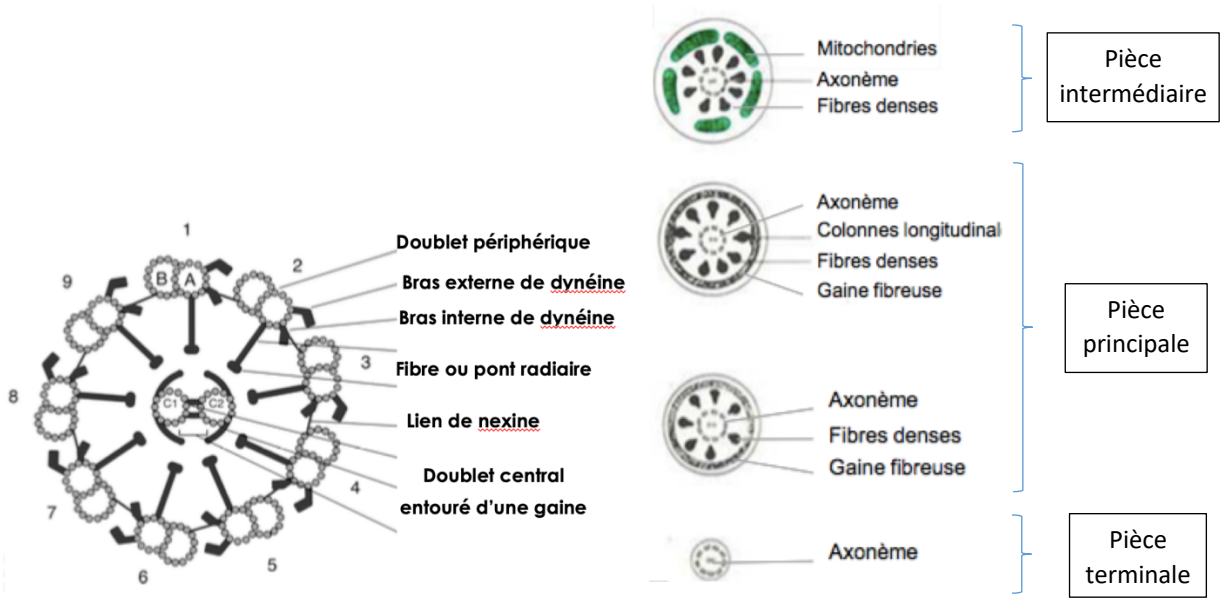


Figure 5 *- Axonème et structures péri-axonémales sur coupes transversales du flagelle (Sources : Kazuo Inaba, 2011 ; Bisson JP et David, 1975)*

b. Spermatogenèse

La spermatogenèse (ou gamétogenèse mâle) est un processus de division et de différenciation des cellules souches germinales mâles en spermatozoïdes (gamètes mâles matures). Il s'agit d'un processus continu, qui débute à la puberté et se poursuit jusqu'à un âge plus ou moins avancé dans la vie de l'homme. Cette spermatogenèse se déroule dans les testicules, et plus précisément dans la paroi des tubes séminifères des testicules. La durée de la spermatogenèse est d'environ 74 jours chez l'homme.

La spermatogenèse se déroule selon deux étapes successives :

- La **spermatocytogenèse** : première étape qui comprend la division par mitose des spermatogonies (cellules souches diploïdes) puis leur différenciation en spermatocytes primaires puis en spermatocytes secondaires (cellules haploïdes) suite à la première division méiotique (méiose I réductionnelle) et enfin en spermatides rondes suite à la deuxième division méiotique (méiose II équationnelle).
- La **spermiogenèse** : seconde étape qui comprend la différenciation (processus de maturation post méiotique) des spermatides en spermatozoïdes. La libération des spermatozoïdes dans la lumière de l'épithélium constitue la spermiation, étape ultime de la spermiogenèse et donc de la spermatogenèse.

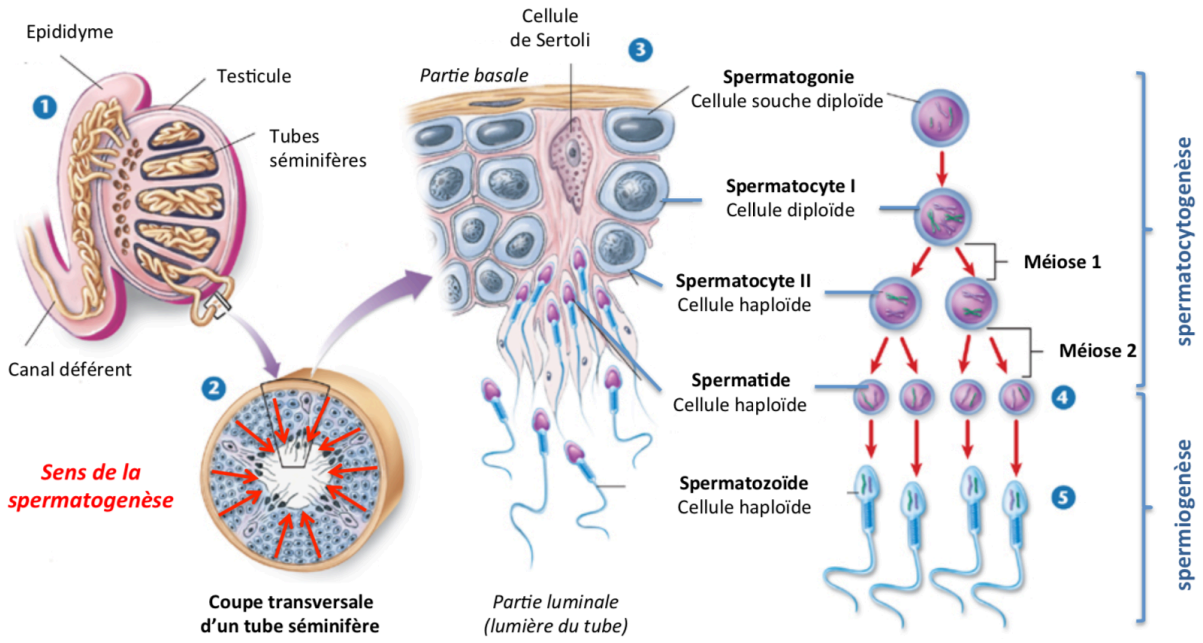


Figure 6 *- La spermatogenèse (Source : http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/f36.12.jpg)*

c. Maturation épididymaire

Suite à l'étape de spermiation, les spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubes séminifères vont cheminer vers les tubes droits (1 tube droit par lobule testiculaire) puis le rete testis (système canalaire). Ce cheminement des spermatozoïdes ne se fait pas grâce à leur mobilité propre mais grâce aux contractions de ces tubes séminifères puis des structures canalaires ultérieures conductrices des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes testiculaires présentent une morphologie complète mais sont cependant à ce stade immobiles et non fécondants.

Les spermatozoïdes vont ensuite gagner les épididymes au niveau des cônes efférents. Ces cônes efférents se poursuivent par le canal épididymaire, un canal extrêmement contourné faisant plusieurs mètres de long, qui se situe à l'extérieur du testicule à sa face dorsale. On identifie 3 différentes parties au niveau de l'épididyme : la tête, le corps, et la queue.

Les spermatozoïdes vont subir un phénomène de stockage et de maturation dans les épididymes. Cette maturation épididymaire comprend des modifications de la membrane plasmique, des modifications chromatiniennes et cytoplasmiques ainsi que l'acquisition du pouvoir fécondant (mobilité et interaction gamétique). Ils acquièrent en effet leur mobilité dans le corps de l'épididyme. Puis l'inhibition transitoire de leur pouvoir fécondant a lieu dans la queue de l'épididyme grâce à des facteurs décapacitants qui vont protéger les spermatozoïdes en

empêchant l'acquisition prématurée de leur fécondance lors du transit dans les voies génitales masculines puis lors de leur émission dans le sperme.

d. Émission des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes poursuivent ensuite leur cheminement, toujours principalement sous l'effet de contraction des structures tubulaires, pour gagner le canal déférent qui fait suite à l'épididyme. Ils seront ensuite mélangés au plasma séminal sécrété par les vésicules séminales puis la prostate pour être enfin éjaculés.

C. L'exploration de la fertilité masculine

Un couple sur 6 sera amené à consulter pour infécondité au cours de sa vie procréative. Selon l'OMS, l'infécondité est définie comme l'absence de survenue d'une grossesse après un an au moins de rapports sexuels non protégés. Dans ce contexte, plusieurs termes peuvent être employés et leur définition est nécessaire. La notion de fécondité/infécondité est liée au concept de résultats : avoir été impliqué ou non à un moment donné dans l'obtention d'une grossesse/de la naissance d'un enfant. La notion de fertilité/infertilité quant à elle est liée au concept d'aptitude/de capacité : présence d'un facteur ou d'un ensemble de facteurs compromettant très probablement la survenue d'une grossesse. Seuls quelques cas extrêmes (azoospermie, obstruction bilatérale des trompes) peuvent permettre d'affirmer qu'une grossesse ne pourra survenir de manière spontanée. De plus, le facteur temps est un élément important. En effet, la présence de plusieurs facteurs impactant sur la fertilité diminuera la probabilité d'obtenir une grossesse dans un délai acceptable (une année). Ainsi, il est préférable d'utiliser le terme d'hypofertilité à celui d'infertilité (Bioforma 2009).

a. Bilan d'une infécondité de couple

Dans tous les cas, le bilan d'une infécondité de couple doit comprendre d'emblée des investigations pour les deux membres du couple afin de déterminer quelle est la part respective des facteurs féminins et masculins contribuant à cette infécondité. En effet, on retrouve 20% de causes masculines, 34% de causes féminines, 38% de causes mixtes féminines et masculines et 8% de causes indéterminées (Thonneau et al. 1991). Au total, dans environ la moitié des cas il existe une origine masculine à cette infécondité. Cela illustre l'importance de l'exploration de la fertilité masculine, cela comprend :

- Interrogatoire : fertilité/sexualité, style de vie/profession, antécédents médico-chirurgicaux généraux, antécédents génito-urinaires, prise de médicaments, fertilité dans la famille de l'homme, résultats de spermogramme(s) antérieur(s)
- Examen clinique :
    - Examen général : taille, poids, degré d'imprégnation androgénique
    - Examen des organes génito-externes : volume testiculaire et consistance, palpation des épididymes et des canaux déférents, recherche de varicocèle, d'hypospadias…
- **Spermogramme** = examen clé de l'évaluation de la fertilité masculine
- Autres examens paracliniques en seconde intention :
    - Recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes
    - Biochimie du plasma séminal
    - Bilan hormonal
    - Echographie
    - Caryotype
    - Sérologies…

b. *Le spermogramme*

i. Généralités

Le spermogramme est l'examen de base en première intention pour évaluer la fertilité d'un homme car il s'agit d'un examen simple de réalisation, informatif, peu coûteux et sans risque. En effet, il fournit des informations à propos de (OMS 2010) :

- D'une part la production des spermatozoïdes (spermatogenèse testiculaire), leur maturation puis leur stockage au niveau des épididymes : ceci à travers l'analyse qualitative et quantitative des spermatozoïdes comprenant :
    - La numération : concentration (millions/mL) et numération totale (millions/éjaculat)
    - La mobilité,
    - La vitalité,
    - La morphologie : le spermocytogramme
- D'autre part la perméabilité des deux voies séminales et les sécrétions de la prostate et des vésicules séminales (élaboration du plasma séminal) : ceci à travers la mesure des caractéristiques physico-chimiques du sperme que sont le volume du recueil, le pH et la viscosité.

Cependant, il est important de noter que cet examen ne peut en aucun cas définir la capacité fécondante des spermatozoïdes d'un individu puisqu'il mesure un ensemble de caractéristiques

globales du sperme et n'évalue pas les capacités fonctionnelles de la sous-population de spermatozoïdes susceptible d'atteindre le site de fécondation (Bioforma 2009).

Les caractéristiques de l'éjaculat sont influencées par une série de facteurs qui doivent être pris en compte lors de l'interprétation de ces résultats par le biologiste :

- L'activité de sécrétion des glandes annexes : cela peut contribuer à diluer plus ou moins les spermatozoïdes produits et la concentration peut alors être un mauvais reflet du rendement de la spermatogenèse. Cela illustre l'importance d'interpréter la concentration avec la numération totale qui prend en compte le volume de l'éjaculat et permet de mieux évaluer la spermatogenèse.
- Le délai d'abstinence sexuelle : cela correspond au temps écoulé depuis la dernière éjaculation et influe sur le volume de l'éjaculat, la concentration, la vitalité et la mobilité des spermatozoïdes.
- La perte d'une partie de l'éjaculat lors du recueil
- Un épisode fébrile récent
- Des erreurs analytiques potentielles…

De plus, il existe une grande variabilité intra-individuelle des paramètres spermatiques (Bioforma 2009) se traduisant par une fluctuation importante du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat chez un même individu. Cela a pour conséquence majeure lors de l'interprétation d'un spermogramme l'impossibilité de conclure sur une seule analyse de sperme. Il est donc nécessaire de disposer d'au moins 2 spermogrammes réalisés à 3 mois d'intervalle minimum. En effet, le spermogramme reflète la production et la maturation des spermatozoïdes dans les 3 mois précédant l'examen, période correspondant approximativement à un cycle complet de spermatogenèse suivi de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme.

ii. Les conditions pré-analytiques

Les conditions pré-analytiques du recueil de sperme sont fondamentales et doivent être respectées afin d'assurer la qualité de l'échantillon à analyser et pour ne pas créer une source de variabilité supplémentaire des résultats. Cela regroupe :

- Des instructions à transmettre au patient lors de la prise de rendez-vous :
    - Hyperhydratation les jours précédant l'examen
    - Délai d'abstinence sexuelle entre 2 et 8 jours à respecter car les caractéristiques du sperme varient en fonction de ce délai
- Le remplissage par le patient d'un questionnaire utile à l'interprétation des résultats

- Des consignes de recueil : instructions claires orales et écrites sur le recueil de sperme avec en particulier l'importance du lavage des mains et de la toilette des parties génitales au savon puis avec un désinfectant
- La réalisation du recueil par masturbation au laboratoire dans un réceptacle gradué identifié
- La traçabilité de l'heure du recueil et le dépôt du réceptacle à l'étuve à 37°C pendant 20 à 30 minutes pour liquéfaction.

iii. Analyse du sperme

L'analyse du sperme peut commencer seulement après un délai de 20 à 30 minutes de liquéfaction du sperme à l'étuve et doit être réalisée dans l'heure suivant le recueil.

a) Caractéristiques physico-chimiques

Cette analyse commence par l'évaluation des caractéristiques physico-chimiques :

- *La viscosité* : l'évaluation de la viscosité est semi-quantitative en observant la manière dont le sperme s'écoule à l'extrémité de la pipette (OMS 2010) :
    - 0 : viscosité normale, gouttes séparées
    - + : viscosité augmentée, gouttes non séparées (filament plus ou moins long)
    - ++ : viscosité très augmentée/forte, éjaculat très visqueux, s'écoule mal ou pas, reste en bloc
- *La mesure du volume* : le volume de l'éjaculat est déterminé en utilisant une pipette graduée à 0,1 mL près.
- *Le pH* : celui-ci est mesuré grâce à une bandelette de papier pH en déposant une goutte de sperme bien homogénéisé puis en comparant la couleur obtenue à la gamme étalon, 20 à 30 secondes après avoir déposé la goutte.

b) Évaluation microscopique initiale

Une évaluation microscopique initiale à faible grossissement est ensuite réalisée entre lame et lamelle et permet d'estimer la concentration (pour définir la dilution ultérieure), l'homogénéité cellulaire, la présence d'agrégats/agglutinats, la présence et l'importance d'autres cellules et de débris.

c) La mobilité

L'analyse de la mobilité est effectuée sur 2 gouttes de 10 µL entre lame et lamelle à fort grossissement (x20-40) sur 5 à 10 champs de chaque préparation. Le manuel de l'OMS 2010 fournit

des recommandations pour la classification des spermatozoïdes concernant la mobilité, dans chaque champ évalué chaque spermatozoïde est évalué comme étant :

- **Immobile « I »** : aucun déplacement, tête et flagelle immobiles
- **Non progressif « NP »** : déplacement de moins de deux longueurs de tête en une seconde ou, aucun déplacement avec des oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaire
- **Progressif « P »** : tous les autres spermatozoïdes (non immobile et non mobile sur place).

Deux modalités d'évaluation de la mobilité sont possibles :

- Le comptage : on doit évaluer la mobilité par comptage lorsque l'estimation de la concentration à l'évaluation microscopique initiale est inférieure à 15 millions/mL ou lorsque la mobilité progressive semble inférieure à 10%, quel que soit la concentration des spermatozoïdes. Le compte est fait sur un total d'au moins 100 spermatozoïdes dans différents champs et sur les 2 préparations.
- L'estimation : l'évaluation de la mobilité par estimation est réalisée dans tous les autres cas. Elle doit être faite dans des champs différents (5-10 par préparation) afin de tenir compte de l'éventuelle hétérogénéité de la préparation et la moyenne de l'ensemble des estimations pour chaque préparation est faite.

d) La concentration

La concentration des spermatozoïdes quant à elle est mesurée en utilisant un hémocytomètre. L'OMS recommande la cellule de Neubauer modifiée, la cellule de Malassez qui fournit des résultats reproductibles peut aussi être utilisée.

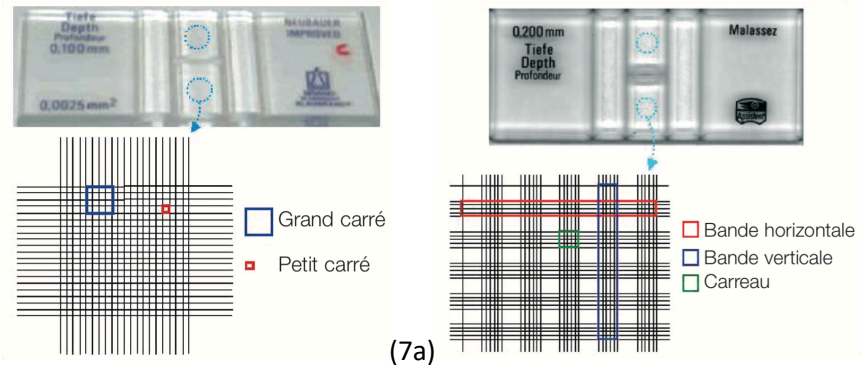


Figure 7 *- **(7a)** Cellule de Neubauer modifiée et son quadrillage - **(7b)** Cellule de Malassez et son quadrillage (Source : cahier de formation Bioforma N°42 Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin, 2009)*

Que ce soit l'une ou l'autre, le principe d'évaluation de la concentration reste le même. Dans un premier temps, une dilution du sperme à analyser est préalablement réalisée avec une solution

formolée permettant l'immobilisation des spermatozoïdes pour faciliter leur comptage. Cette dilution est déterminée en fonction de la concentration estimée lors de l'évaluation microscopique initiale.

Deux aliquots sont réalisés dans les mêmes conditions selon la dilution adéquate permettant la réalisation de 2 comptages sur les 2 quadrillages d'une même cellule de comptage. A condition que l'ensemble de la chambre indique une répartition relativement homogène des spermatozoïdes, les spermatozoïdes sont alors comptés en utilisant l'objectif x40 en contraste de phase et seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés. Selon la concentration, les spermatozoïdes sont comptés sur une surface plus ou moins importante de la chambre de comptage. Ensuite, la concentration est calculée à partir du compte de spermatozoïdes, de la dilution et d'un facteur de conversion dépendant de la surface où les spermatozoïdes ont été comptés.

L'OMS fournit des valeurs acceptables de somme et de différence entre les 2 comptages et si ces valeurs sont acceptables, la moyenne des 2 comptages permet d'obtenir la concentration de spermatozoïdes.

e) Cellules rondes

L'éjaculat peut contenir d'autres cellules que les spermatozoïdes. Celles-ci sont regroupées sous le terme général de cellules rondes et peuvent être : des cellules épithéliales desquamées du tractus génital, des cellules de la lignée germinale et des cellules de la lignée blanche. La concentration en cellules rondes est évaluée grâce à l'hémocytomètre de la même manière que pour l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes, dans le même temps.

f) La vitalité

Pour la vitalité, deux tests sont disponibles : le test à l'Eosine-Nigrosine et le test hypo-osmotique.

- Le test à l'Eosine-Nigrosine est basé sur l'exclusion d'un colorant par les spermatozoïdes vivants (en blancs) et la pénétration du colorant pour les spermatozoïdes morts en raison de l'altération de leur membrane (colorés en rouge violacé/rose). Après avoir mélangé le sperme avec l'éosine puis la nigrosine, un frottis est réalisé à partir d'une goutte de 10 µL. Une évaluation du pourcentage de spermatozoïdes vivants est réalisée sur un minimum de 200 spermatozoïdes. Les spermatozoïdes vivants ne sont pas colorés (restent blancs), les morts ont la tête colorée en rouge violacé/rose. Un spermatozoïde avec une faible coloration ne concernant qu'une partie de la tête est compté mort et les têtes isolées ne sont pas comptées.

- Le test hypo-osmotique est quant à lui basé sur le fait que la membrane de la cellule intacte est semi-perméable. En conséquence, si le spermatozoïde est placé en milieu hypo-osmotique, il se produit un influx d'eau, le spermatozoïde "gonfle" et le signe le plus manifeste de son augmentation de volume est un enroulement assez serré de son flagelle sur une portion plus ou moins longue de celui-ci. Au contraire, si la cellule est morte, sa morphologie ne se modifie pas. Le pourcentage de spermatozoïdes présentant des enroulements flagellaires est évalué à partir de l'analyse de 200 spermatozoïdes.

g) La morphologie

Concernant l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes, cela s'appelle le spermocytogramme. Après confection des frottis, une fixation puis une coloration (Papanicolaou modifiée ou Shorr) sont effectuées. Un montage des lames peut être fait permettant alors la lecture différée et la conservation des lames. Puis la lecture consiste à classifier les spermatozoïdes en fonction de différentes anomalies morphologiques sur un compte de 100 spermatozoïdes minimum. Pour cela deux classifications existent :

- Et la classification de Kruger, recommandée par l'OMS qui regroupe 4 classes d'anomalies :
    - Les anomalies de l'acrosome
    - Les anomalies de la tête
    - Les anomalies de la pièce intermédiaire
    - Les anomalies du flagelle
- La classification de David modifiée, la plus répandue en France :
    - 7 anomalies de la tête : Allongée, amincie, microcéphale, macrocéphale, têtes multiples, anomalie de la base, anomalie de l'acrosome
    - 3 anomalies de la pièce intermédiaire : pièce intermédiaire grêle, restes cytoplasmiques, angulations
    - 5 anomalies du flagelle : absent, irrégulier, court, enroulé, multiple

h) Valeurs de références de l'OMS 2010

La 5ème édition du manuel de l'OMS 2010 intitulé « Examination and processing of human semen » décrit les différentes techniques d'analyse de sperme en précisant les techniques de référence. Les modes opératoires sont développés et les valeurs normales (**Tableau 1**) sont définies ainsi que la terminologie des anomalies des caractéristiques du sperme (**Tableau 2**).

CARACTERISTIQUES	VALEURS DE REFERENCE SELON OMS 2010
Volume de l'éjaculat	≥ 1,5mL
pH	7,2-8,0
Concentration spermatique	≥ 15 millions/mL
Numération totale spermatique	≥ 39 millions/mL
Mobilité	≥ 40% mobilité totale ≥ 32% mobilité progressive
Vitalité	≥ 58% de spermatozoïdes vivants
Morphologie	Kruger : ≥ 4% spermatozoïdes morphologiquement normaux David modifiée : ≥ 23% spermatozoïdes morphologiquement normaux (Auger et al. 2016)
Concentration en leucocytes	< 1 million/mL

Tableau 1 *- Valeurs de référence de l'OMS pour le spermogramme (pour une abstinence sexuelle en 2 et 8 jours et pour un sperme analysé selon les techniques décrites dans le manuel de l'OMS)*

TERMINOLOGIE	CARACTÉRISTIQUES DE SPERME CORRESPONDANTES
Aspermie	Absence d'éjaculat (avec ou sans éjaculation rétrograde)
Asthénozoospermie	Moins de 32 % de spermatozoïdes mobiles progressifs
Asthénotératozoospermie	Pourcentages de spermatozoïdes mobiles progressifs et de spermatozoïdes morphologiquement normaux inférieurs aux valeurs de référence de l'OMS
Azoospermie	Absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat
Cryptozoospermie	Absence de spermatozoïde à l'examen direct mais retrouvés dans l'analyse du culot de centrifugation
Hémospermie	Présence d'hématies dans l'éjaculat
Leucospermie	Présence de leucocytes dans l'éjaculat à une concentration ≥ 1 million/mL
Nécrozoospermie	Nombre de spermatozoïdes vivants < 58%
Normozoospermie	Numération totale (ou concentration) des spermatozoïdes, pourcentage de mobiles progressifs et pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale considérés comme normaux en fonction des valeurs de référence de l'OMS (égaux ou supérieurs aux valeurs seuil de référence)
Oligoasthénozoospermie	Numération totale (ou concentration) des spermatozoïdes et pourcentage de mobiles progressifs inférieurs aux valeurs seuil de référence de l'OMS
Oligoasthénotératozoospermie (OATS)	Numération totale (ou concentration) des spermatozoïdes, pourcentage de mobiles progressifs et pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale inférieurs aux valeurs seuil de référence de l'OMS
Oligotératozoospermie	Numération totale (ou concentration) des spermatozoïdes et pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale inférieurs aux valeurs seuil de référence de l'OMS
Oligozoospermie	Nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat inférieur à 39 millions/mL ou concentration de spermatozoïdes inferieure à 15 millions/mL
Tératozoospermie	Pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux inférieur aux valeurs de référence selon la classification de Kruger (< 4%) ou celle de David modifiée (< 23 %)

Tableau 2 *- Terminologies courantes en cas d'anomalies des caractéristiques du sperme (en référence aux valeurs seuils proposées par l'OMS, 2010)*

D. Capacitation et hyperactivation du mouvement

a. La capacitation

La capacitation est l'ensemble des modifications biochimiques et structurales, membranaires et cytoplasmiques se déroulant dans le tractus génital féminin qui permettent aux spermatozoïdes

d'acquérir leur pouvoir fécondant. Le phénomène de capacitation résulte dans un premier temps de la suppression des facteurs décapacitants contenus dans le plasma séminal ou fixés sur les spermatozoïdes lors de la traversée de la glaire cervicale, puis de l'action de facteurs capacitants sécrétés par les voies génitales féminines. Cette capacitation est réversible et ne concerne qu'une sous-population des spermatozoïdes à un instant donné.

La capacitation est liée à des modifications membranaires lipidiques (principalement un efflux de cholestérol) et protéiques, augmentant notamment la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique. Cela permet ensuite l'activation de différentes voies de signalisation aboutissant à une phosphorylation de protéines. Ces modifications ont pour objectif l'acquisition du potentiel de réaction acrosomique par l'exposition des récepteurs spermatiques à la zone pellucide de l'ovocyte ainsi que l'hyperactivation du mouvement flagellaire. L'ensemble de ce processus permet de rendre les gamètes mâles aptes à interagir avec l'ovocyte : ce sont les spermatozoïdes capacités.

b. Hyperactivation du mouvement

L'hyperactivation de la mobilité acquise lors de la capacitation dans le tractus génital féminin correspond à des changements de la dynamique flagellaire résultant en un mouvement caractéristique du spermatozoïde appelé mouvement hyperactivé. Cette hyperactivation se traduit par une augmentation de l'amplitude de la courbure du flagelle et de la fréquence du mouvement flagellaire, essentiellement dans la partie proximale du flagelle. Au microscope, le déplacement d'un spermatozoïde hyperactivé dans un milieu de faible viscosité est caractéristique : sa trajectoire est manifestement très incurvée et tortueuse avec une faible progression linéaire et un degré élevé d'oscillations de la tête autour de la trajectoire moyenne (Bioforma 2009). Il existe deux types d'hyperactivation du spermatozoïde : progressive et non progressive (**Figure 8**). Le mouvement hyperactivé non progressif décrit un trajet qualifié classiquement « en étoile » et ne s'exprime que de manière transitoire pour un spermatozoïde donné, entre des phases où le mouvement est progressif (Jouannet et al. 1995).

Le mouvement hyperactivé est déterminant pour la progression du spermatozoïde dans le tractus génital féminin mais aussi au sein du complexe cumulo-ovocytaire afin de pouvoir pénétrer la zone pellucide et féconder l'ovocyte (Mortimer et al. 2015) à travers (Bioforma 2009) :

- Le développement des forces nécessaires pour détacher des spermatozoïdes ayant adhéré au revêtement épithélial,
- La facilitation des échanges des métabolites et des autres facteurs stimulants par une agitation du fluide réalisant le microenvironnement local du spermatozoïde,

- La prévention du piégeage des spermatozoïdes dans les portions étroites et contournées du tractus par une migration facilitée,
- L'augmentation de la probabilité de rencontre avec le complexe cumulus-ovocyte par un volume balayé plus important et,
- La pénétration au travers de la masse du cumulus et de la zone pellucide par une poussée accrue au niveau de la tête du spermatozoïde.

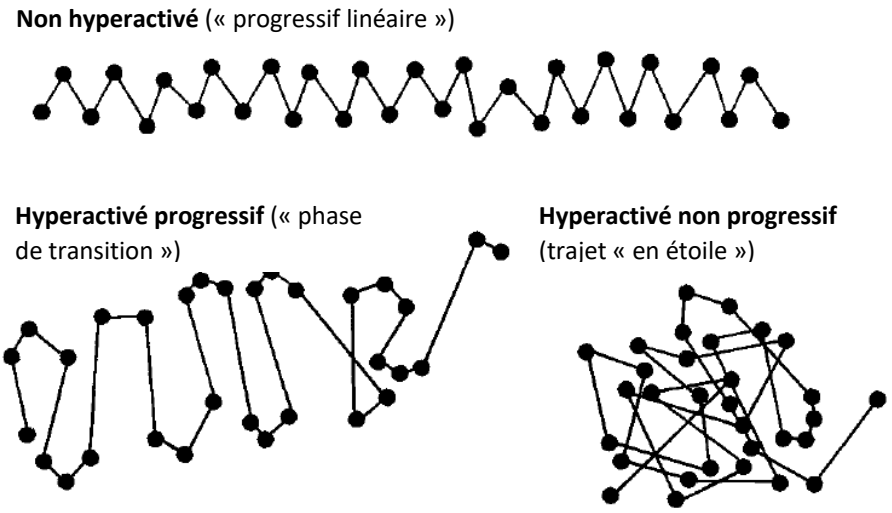


Figure 8 *- Trajectoires de spermatozoïdes capacités mobiles non hyperactivés et hyperactivés (Mortimer et al. 2000).*

Ces différents éléments montrent l'importance de l'acquisition du mouvement activé dans la rencontre du spermatozoïde avec l'ovocyte et la fécondation.

Chez l'homme, dans les conditions *in vitro*, on ne voit apparaître ce mouvement que pour une faible proportion de spermatozoïdes (environ 10-20%). Dans l'espèce humaine, le mouvement hyperactivé *in vitro* a pu être caractérisé grâce aux systèmes de microvidéographie par ordinateur (Bioforma 2009).

II. CHAPITRE 2 : LE CASA

A. Principe de fonctionnement

L'acronyme CASA signifie Computer-Aided Sperm Analysis. Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode semi-automatisée permettant l'analyse à partir d'un échantillon de sperme de paramètres spermatiques tels que la concentration, la mobilité, la vitalité ou encore la morphologie des spermatozoïdes mais aussi les paramètres cinétiques à travers une analyse fine du mouvement

flagellaire non observable par l'œil humain. Le système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif relié à un logiciel informatique par l'intermédiaire d'une caméra permettant la digitalisation des images, c'est-à-dire la transformation des images capturées par la caméra en images numériques (Mortimer 2000 ; OMS 2010).

Il s'agit en effet d'une méthode semi-automatisée puisque l'opérateur doit se déplacer sur la chambre de comptage pour permettre l'acquisition des différents champs. Il est important que les champs analysés soient à différentes distances du site de dépôt de l'échantillon dans la chambre, principalement le long de l'axe central formé par les point d'entrée et point de sortie de la lame (Amann et Waberski 2014), car la distribution des spermatozoïdes dans la chambre n'est pas homogène (Douglas-Hamilton et al. 2005a). La validation de méthode doit notamment montrer que cette distribution non homogène n'a pas d'impact sur la qualité des résultats (si l'acquisition des champs est correctement réalisée) grâce à une comparaison par rapport à une méthode de référence qu'est l'hémocytomètre (cellule de Malassez). Tout comme cela est réalisé pour la méthode manuelle, plusieurs champs doivent être analysés pour obtenir un nombre suffisant de spermatozoïdes. Le manuel de l'OMS 2010 recommande l'analyse de 2 chambres par patient avec d'une part un minimum de 200 spermatozoïdes analysés par chambre et d'autre part 6 champs minimum par chambre. Chaque champ correspond à l'acquisition d'une série d'images à une fréquence de 60 Hz (= Hertz = 60 images par seconde) (Manuel fournisseur Hamilton Thorne ; OMS 2010) sur une durée de 0,5 seconde, soit 30 images par champ. Les recommandations de l'ESHRE de 1998 préconisent en effet une fréquence d'acquisition minimale de 50 Hz (Mortimer et al. 1988) ainsi qu'une durée minimale d'acquisition de 0,5 seconde pour obtenir des valeurs cinétiques fiables d'une trajectoire et ainsi étudier l'hyperactivité du mouvement.

Lors d'une acquisition, chaque image d'un champ au microscope est transmise par la caméra au logiciel pour ensuite être convertie en une image numérique (Mortimer 2000) : la digitalisation. Avant la capture de chaque champ, la luminosité doit être adaptée manuellement sur le microscope après avoir fait la mise au point (netteté à adapter sur l'image à l'écran) : le logiciel prévoit pour cela un indicateur de luminosité qui doit se trouver entre 55 et 65 pour être acceptable.

Puis, chaque spermatozoïde et sa trajectoire correspondante sont analysés individuellement. Le microscope optique à contraste de phase négatif permet une identification du spermatozoïde optimisée : on observe les spermatozoïdes blancs grâce à leur réfringence sur un fond noir (Manuel fournisseur Hamilton Thorne ; Mortimer 2000). Cette réfringence reste constante même si le spermatozoïde est mobile car la rotation de la tête spermatique lors du mouvement ne modifie pas l'intensité de la réfringence (Mortimer 2000). Lors de la digitalisation de l'image, le logiciel détermine

le nombre de pixels pour chaque tête spermatique grâce au contraste entre la tête blanche et le fond noir. Il existe alors un nombre de pixels acceptable pour que la surface puisse être identifiée comme une tête de spermatozoïde : cela correspond aux valeurs minimum et maximum de taille de la tête nécessaires à l'identification par le logiciel de chaque spermatozoïde (Mortimer 2000).

L'identification du spermatozoïde est réalisée selon trois critères :

- La taille de la tête spermatique : minimum 5 μm^2 – maximum 50 μm^2
- La réfringence de la tête spermatique et du flagelle : luminosité minimum de la tête 170 – luminosité minimum du flagelle 70
- L'élongation correspondant au rapport de la longueur et de la largeur de la tête : minimum 1% - maximum 100%

La position d'un spermatozoïde est définie par le centre de la tête spermatique et ses coordonnées (x,y) sont alors déterminées. Pour chaque position de la tête d'un spermatozoïde, le logiciel calcule la probabilité de la nouvelle position sur l'image suivante grâce une zone de probabilité au rayon prédéterminé (**Figure 9**). Ce rayon est la distance maximum qu'un spermatozoïde est censé parcourir sur la période de temps séparant 2 images (distance définie par le fournisseur : 10µm).

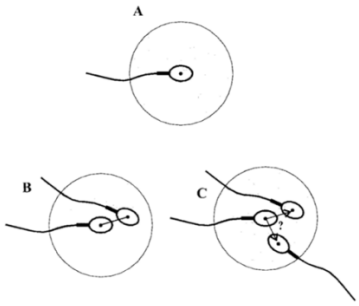


Figure 9 *- Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (A), position probable sur la prochaine image (B), complications possibles lorsque plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone de probabilité (Mortimer et al. 2000)*

La trajectoire d'un spermatozoïde est alors reconstruite à partir de la succession des différentes positions de la tête sur les 30 différentes images constituant un champ (**Figure 10**).

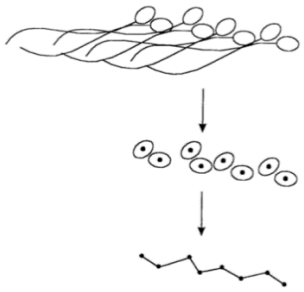


Figure 10 *- Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde. Les points sont alors reliés pour obtenir la reconstruction de la trajectoire. (Mortimer et al. 2000)*

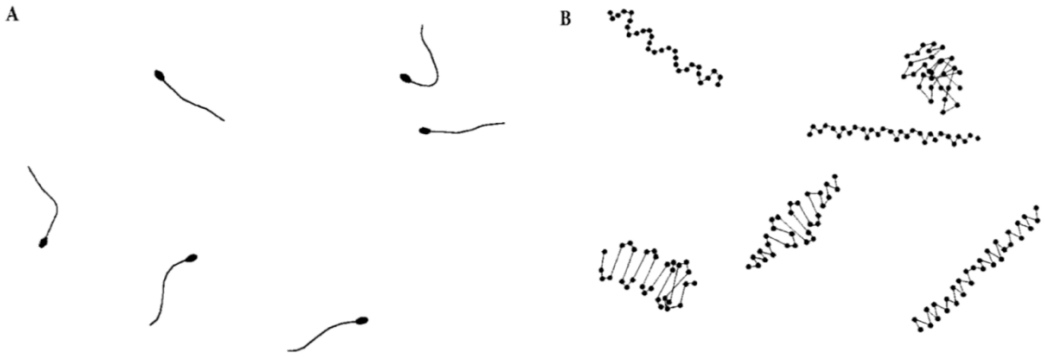


Figure 11 - Numérisation par le CASA et reconstructions des trajectoires des spermatozoïdes. Différences entre les trajectoires en lien avec les différences dans le battement flagellaire (Mortimer et al. 2000)

Des erreurs de trajectoires peuvent résulter de la présence de plusieurs spermatozoïdes dans une même zone de probabilité voire même leur collision. Ces erreurs sont minimales pour une concentration spermatique inférieure à 30 millions/mL (Manuel fournisseur Hamilton Thorne) mais deviennent de plus en plus significatives avec l'augmentation de la concentration. Sachant que la probabilité de collision augmente avec la concentration, la mobilité et le nombre d'images par trajectoire, les collisions sont minimisées grâce à l'analyse uniquement des 10 premières images pour la détermination de la concentration de spermatozoïdes mobiles, la concentration de spermatozoïdes immobiles et la fraction de spermatozoïdes mobiles. Les paramètres cinétiques sont quant à eux déterminés à partir de la totalité des images (Manuel fournisseur Hamilton Thorne).

Grâce à la reconstruction de la trajectoire du spermatozoïde, le logiciel peut fournir des paramètres « annexes » que sont les paramètres cinétiques (**Figure 12**) dont le manuel de l'OMS 2010 donne les définitions pour les principaux suivants :

- **VSL** (Straight line velocity) : la vitesse en ligne droite (µm/s) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- **VCL** (Curvilinear velocity) : la vitesse (µm/s) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).
- **VAP** (Average path velocity) : la vitesse (µm/s) selon la trajectoire moyenne.
- **ALH** (Amplitude of lateral head displacement) : l'amplitude de déplacement latéral de la tête (µm) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne (selon la trajectoire moyenne).
- **LIN** (linearity) : la linéarité correspond au ratio VSL/VCL en pourcentage et illustre la direction de la trajectoire
- **STR** (Straightness) : la rectitude de trajectoire correspond au ratio VSL/VAP et représente la linéarité de la trajectoire moyenne

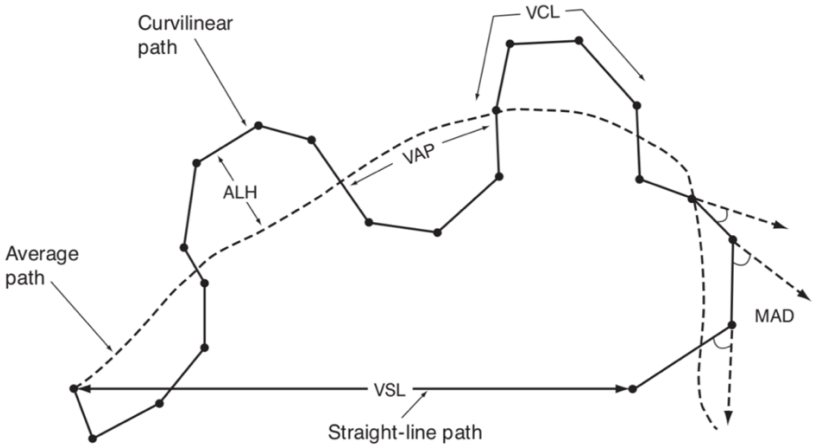


Figure 12 *- Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (manuel de l'OMS 2010)*

Cependant, le manuel de l'OMS 2010 ne fournit pas de valeurs de référence pour ces paramètres. En effet, les différents systèmes CASA n'utilisent pas les mêmes algorithmes pour obtenir ces paramètres cinétiques ce qui rend difficile à ce jour la comparabilité de ces mesures entre les systèmes (OMS 2010).

Un inconvénient du système CASA est que la forme de la trajectoire du spermatozoïde peut être modifiée selon le nombre d'images acquises par seconde. En effet, un même spermatozoïde analysé à deux fréquences différentes (respectivement 30 et 60 images par seconde) possèdera une trajectoire reconstruite et donc des valeurs cinétiques différentes (**Figure 13**) (Mortimer et al. 1988). A noter, une fréquence d'acquisition d'images augmentée permet d'obtenir plus d'informations disponibles sur la trajectoire. Cela souligne l'importance du réglage des paramètres CASA et l'impact potentiel sur les résultats, l'OMS recommande ainsi une fréquence d'acquisition de 60 images par seconde (soit 60 Hz).

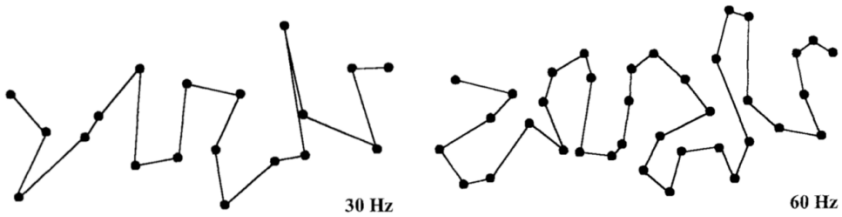


Figure 13 *- Trajectoires d'un même spermatozoïde à deux fréquences d'acquisition différentes (30 Hz et 60 Hz) (Mortimer et al. 1988)*

Par conséquent, plusieurs paramètres cinétiques des spermatozoïdes sont dépendants de la fréquence d'acquisition dont par exemples les valeurs VCL et ALH qui seront plus élevées lors d'une augmentation de la fréquence. (Mortimer et al. 1988).

Des cut-offs (valeur maximale ou minimale) de certains de ces paramètres cinétiques (**Tableau 3**) sont définis afin de pouvoir classifier chaque spermatozoïde dans la catégorie de mobilité correspondante selon les recommandations de l'OMS 2010 : mobilité progressive (anciennement « a+b »), mobilité non progressive (anciennement « c ») et immobiles (anciennement « d »).

Paramètres cinétiques	Fonction
STR progressive (STRP)	Valeur minimale de STR en % requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive
VAP progressive (VAPP)	Valeur minimale de VAP requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive
VAP lente (VAPS)	Valeur maximale de VAP en µm/s pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente
VSL lente (VSLS)	Valeur maximale de VSL en µm/s pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente
Algorithme statique	Détermine quel algorithme est utilisé pour définir les spermatozoïdes statiques. L'algorithme utilisé dans notre cas est le multiplicateur de largeur statique.
VAP statique (VAPSTATIC)	Valeur maximale de VAP pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique
VSL statique (VSLSTATIC)	Valeur maximale de VSL pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique
Multiplicateur de largeur statique	Basé sur la largeur de la tête spermatique et définit le mouvement maximum qu'une tête spermatique peut faire tant en étant toujours classifié comme statique

Tableau 3 *- Les paramètres cinétiques et leurs fonctions (Manuel fournisseur Hamilton Thorne)*

B. Lames de comptage et effet Segré-Silberberg

Le chargement de l'échantillon dans la chambre des lames se fait par capillarité. Le sperme étant un fluide visqueux, son écoulement lors du chargement dans la chambre suit la loi de Poiseuille : il s'agit alors d'un écoulement de Poiseuille. Cela se traduit par un écoulement laminaire du fluide (dans un cylindre ou entre deux plaques parallèles) avec une vitesse du flux diminuant à mesure qu'on se rapproche des parois avec par conséquent une vitesse maximale atteinte au niveau de la moitié de la profondeur de chambre et une vitesse nulle au niveau des parois de la chambre. On pourrait imaginer que les spermatozoïdes au milieu de la profondeur de chambre progressent plus rapidement que ceux près des parois. Cependant, à cette loi Poiseuille s'ajoute l'effet Segré-Silberberg (Douglas-Hamilton et al. 2005a) : les particules en suspension, en l'occurrence les spermatozoïdes, dans un écoulement Poiseuille sont amenées à se déplacer transversalement à la direction du fluide pour atteindre une position d'équilibre au niveau de 2 plans à équidistance des parois (flèches rouges sur la **figure 14**). Ce phénomène est observé dans les chambres avec une lamelle en verre fixée nécessitant un chargement par capillarité. Les spermatozoïdes dans ces 2 plans de Segré-Silberberg se déplacent plus rapidement que la vitesse moyenne du fluide. Cela a pour

conséquence une accumulation des spermatozoïdes au niveau de ce que l'on appelle le ménisque, qui correspond à la couche de fluide à l'avant avec la progression la plus rapide (**Figure 14**). Ce phénomène peut être responsable d'une sous-estimation de la mesure de la concentration. Cependant, cette sous-estimation est constante et peut être corrigée par un facteur de correction. Le seul paramètre variable à prendre en compte est la viscosité qui est dépendante de manière linéaire au temps de remplissage de la chambre (instructions sur effet Segré-Silberberg, notice fournisseur Leja®) :

- Sperme dilué avec SPM : facteur de correction ≈ 1.23
- Sperme normalement liquéfié : facteur de correction ≈ 1.1 (temps remplissage ≈ 7-9 secondes)
- Sperme très visqueux : facteur de correction ≈ 1 (temps remplissage > 30 secondes)

Le facteur de correction est uniquement constant si l'on utilise les nouveaux modèles de lames Leja® 2 et 4 chambres (instructions sur effet Segré-Silberberg, notice fournisseur Leja®) permettant une profondeur de chambre uniforme (Bompart et al. 2018).

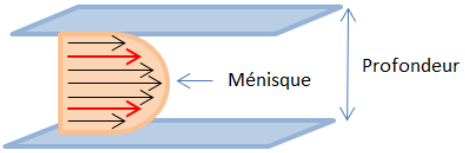


Figure 14 *- Écoulement de Poiseuille et effet Segré-Silberberg dans une chambre de comptage à chargement par capillarité*

III. CHAPITRE 3 : ACCREDITATION ET VALIDATION DE METHODE

L'accréditation est délivrée par un organisme national d'accréditation sur demande du LBM. En France, cet organisme est le Comité français d'accréditation (COFRAC). En Europe, chaque pays n'a qu'un seul organisme d'accréditation. En effet, le COFRAC est l'unique organisme de référence en matière d'accréditation en France. Il s'agit d'une association à but non lucratif créée en 1994 dont la mission de service public est alors de s'assurer de la compétence et de l'impartialité des organismes d'évaluation de la conformité. En 2008, l'État désigne le COFRAC comme instance unique d'accréditation en France (site www.cofrac.fr). L'accréditation est délivrée par le COFRAC pour une durée de 4 ans pour le premier cycle puis renouvelable ensuite par période de 5 ans au maximum. La surveillance de l'accréditation est réalisée par des évaluations sur site, annuelles pendant le premier cycle d'accréditation, puis tous les 18 mois au plus tard pendant les cycles suivants. Les référentiels

utilisés lors de cette validation de méthode sont la norme NF EN ISO 15189 et les documents édités par le COFRAC contenant les recommandations reconnues comme étant appropriées pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Parmi ces documents du COFRAC, on retrouve notamment le SH REF 02 (Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189), le SH REF 08 (Expression et évaluation des portées d'accréditation) et les guides techniques d'accréditation (GTA), en particulier le SH GTA 04 (guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale). Les exigences spécifiques pour l'accréditation des LBM (SH REF 02) portent sur les exigences organisationnelles (management, organisation du laboratoire) et techniques (compétence des personnels, analyse de leurs pratiques). La satisfaction de ces exigences fondée sur une évaluation des pratiques par les pairs est la condition de l'accréditation. Parmi ces exigences, on retrouve entre autres la validation de toute méthode de biologie médicale, qui concerne alors essentiellement la phase analytique. Une méthode est définie selon le document SH GTA 04 comme étant un ensemble ordonné de manière logique de principes, de règles, d'étapes qui constitue un moyen pour parvenir à un résultat. Les référentiels cités précédemment permettent aux LBM de valider une méthode selon la portée d'accréditation appropriée (SH REF 08) :

- Lorsqu'il s'agit d'adopter une méthode reconnue, cette validation consiste en une vérification sur site des performances annoncées du système analytique (généralement un couple analyseur et réactif) lors de la mise en application en routine dans le laboratoire : on parle de **portée flexible standard de type A**. Une méthode reconnue peut être la méthode fournisseur qui est alors a priori validée dans son domaine d'application selon ses paramétrages d'usine. Cela peut également être une méthode publiée dans des livres faisant autorité, des journaux avec comité de lecture, des normes, des instructions de consensus international ou des réglementations (SH GTA 04). Cette vérification a donc pour but de confirmer la fiabilité des résultats obtenus dans les conditions de travail du laboratoire en tenant compte des objectifs attendus (besoins cliniques).
- Les laboratoires peuvent également faire le choix d'adapter à leurs besoins une méthode reconnue ou de développer leur propre méthode en interne : on parle alors de **portée flexible étendue de type B**. Dans ce cas, le laboratoire doit valider la méthode en évaluant l'ensemble des critères de qualité de la méthode permettant d'en démontrer la maîtrise.

Préalablement à la constitution du dossier de vérification/validation de méthode, le laboratoire doit identifier les informations suivantes :

- Besoins du laboratoire (utilisation prévue de l'examen),

- Processus simple ou complexe : les examens de biologie médicale peuvent être constitués d'une seule méthode/étape/processus (processus simple, exemple du dosage des protéines totales dans le sérum) ou de l'enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus (processus complexe, exemple de la numération formule sanguine),
- Analyses des risques (pré, per et post-analytiques) : description des risques encourus à chaque étape du processus et les moyens mis en œuvre pour leur maîtrise,
- Documentation fournisseur,
- Étude bibliographique,
- Type de portée de la méthode choisie (portée A ou portée B),
- Critères de performance attendus définis (état de l'art, données RICOS, sociétés savantes…),
- Échantillothèque,
- Existence de contrôle interne de qualité (CIQ) / Évaluations externes de la qualité (EEQ) et modalités de comparaison interlaboratoires/intersites.

Le document SH FORM 43 est un formulaire mis à disposition de tous les LBM sur le site internet du COFRAC et permet de constituer le dossier de vérification/validation d'une méthode. Ce dossier doit contenir les items suivants :

- Présentation du processus analytique (étape(s), méthode(s), éléments à vérifier/valider),
- Maîtrise des risques,
- Détermination des critères de performances (paramètres) à vérifier,
- Détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre) de ces critères,
- Vérification bibliographique,
- Plan d'expérience et mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire,
- Compilation et traitement statistique des données obtenues,
- Conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées : déclaration d'aptitude par un biologiste responsable.

Les différents critères de performance qui peuvent être étudiés sont :

- **La répétabilité** : L'évaluation de la répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même analyseur, même lot de réactifs et même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif de cette évaluation est de définir la meilleure performance possible dans des conditions optimales afin de vérifier le bon fonctionnement du système analytique pour l'analyte concerné. Cela est nécessaire afin de connaître les performances initiales de l'analyseur lors de son installation. Il est recommandé d'utiliser au minimum 2 niveaux de concentration, choisis en fonction des valeurs

physiopathologiques et dont au moins un des niveaux proche de la (des) zone(s) décisionnelle(s). De plus, le nombre de répétitions recommandé est de 30 pour une interprétation statistique optimale (SH GTA 04). Il est toutefois possible d'appliquer un nombre d'essais inférieur s'il est argumenté en fonction de critères pertinents tels que rareté de la matrice, coûts des analyses, durée d'analyse… tout en sachant que la valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que ces effectifs sont faibles (SH GTA 04).

- **La fidélité intermédiaire** : L'évaluation de la fidélité intermédiaire (anciennement appelée reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages. Cela permet de paramétrer les critères d'acceptation des antériorités en combinaison avec les variations biologiques. La fidélité intermédiaire est habituellement évaluée à l'aide des coefficients de variation (CV) calculés à partir des résultats des CIQ. A partir de séries successives de CIQ quotidiens (en général 1 à 2 par jour), la fidélité intermédiaire est évaluée grâce à 30 déterminations sur au moins 15 jours et à 2 niveaux minimum. Un autre moyen d'évaluer la fidélité intermédiaire est la variabilité inter-opérateurs qui consiste à analyser un même échantillon par un minimum de 5 opérateurs différents, le CV obtenu permettant alors d'évaluer cette variabilité.
- **L'exactitude** : L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande (SH GTA 04). Elle est évaluée à partir des résultats des Évaluations Externes de la Qualité (EEQ). Cela correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude). A noter, l'évaluation de l'exactitude est pertinente lorsque le nombre de participants à l'EEQ est suffisant.
- **L'incertitude de mesure** : la définition reconnue internationalement de l'incertitude de mesure est la suivante : paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées (SH GTA 14). L'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder, elle est associée à tout résultat de mesure. Son évaluation va permettre de prendre en compte une information importante du processus d'analyse que le résultat seul n'intègre pas (exemple de deux résultats mathématiquement différents mais non significativement différents car les intervalles d'incertitude se chevauchent). La norme NF EN ISO 15189 précise que « *le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée pour consigner les grandeurs mesurées sur les échantillons des patients [...] et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure* » (SH GTA 04). De plus, les différentes composantes de l'incertitude de la phase analytique doivent être

établies pour chaque mesurande lors de l'évaluation de la maîtrise des risques. Pour cela, il faut tout d'abord définir le mesurande et analyser le processus de mesure : identifier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure puis identifier parmi ceux-ci ceux dont l'influence est considérée comme non significative en le justifiant et enfin apporter la preuve de la maîtrise des facteurs qui ont une influence significative sur les résultats. Un calcul d'incertitude doit être déterminé pour les paramètres quantitatifs. Le document SH GTA 14 intitulé « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation de l'incertitude de mesure en biologie médicale » constitue une aide pour les laboratoires et présente les différentes méthodes d'évaluation de l'incertitude de résultats quantitatifs. L'incertitude doit faire l'objet d'une réévaluation régulière (périodicité annuelle recommandée).

- **La comparaison de méthode** : cela consiste à analyser un même échantillon en simple avec la méthode dite de référence et la méthode à valider dans un délai le plus court possible pour évaluer la comparabilité des résultats. Il s'agit alors d'analyser au moins 30 échantillons de patients de façon homogène sur l'étendue du domaine physiopathologique rencontré. A partir de ces résultats, des graphiques sont ensuite établis :
    - Droite de régression : la corrélation (degré de liaison)
    - Graphique de Bland-Altman : la concordance

  A noter concernant la droite de régression, dans ce contexte de comparaison de 2 méthodes le calcul du coefficient de corrélation n'a pas d'intérêt puisque les variables sont dépendantes (mesure du même échantillon). Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées : similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0.
- **L'étendue de mesure** : cela comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité. Le document SH GTA 04 fournit les définitions de ces 3 paramètres :
    - La limite de détection correspond au plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration pouvant être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions. L'étude de la limite de détection est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés entre les blancs et les échantillons.
    - La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue. La limite de quantification est la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient.

- La limite supérieure de linéarité correspond à la plus grande valeur de concentration pouvant être quantifiée sans avoir recours à la dilution de l'échantillon et permettant d'obtenir un résultat fiable.

La limite de quantification et la limite supérieure de linéarité permettent de définir le domaine de mesure de la méthode.

- **<u>Les interférences</u>** : la présence d'éventuelles substances dans les liquides biologiques ou bien d'autres facteurs liés à la matière ou encore au matériel peut être à l'origine d'interférences et éventuellement avoir un impact sur les résultats. Ces interférences doivent être recherchées et leur influence éventuelle sur les résultats évaluée.

A noter, toute démarche qui diffère des recommandations de ces référentiels peut tout de même être acceptée si elle est argumentée et documentée en démontrant que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences de la norme.

Les deux figures ci-dessous illustrent les notions de justesse, fidélité et exactitude (**Figure 15**) ainsi que l'erreur de mesure, le biais et l'écart-type (**Figure 16**).

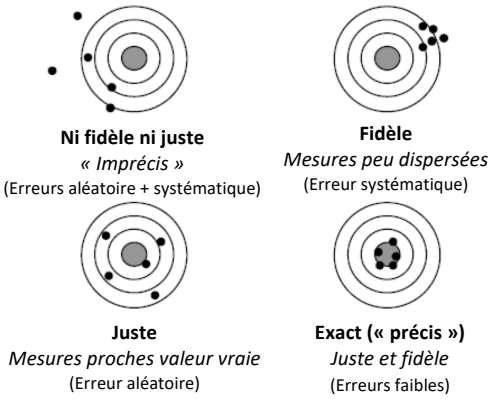


Figure 15 *- Justesse, Fidélité et Exactitude (Source : http://chaptal2bio.free.fr/chim/oral/FuxIncertitudes-v2.pdf)*

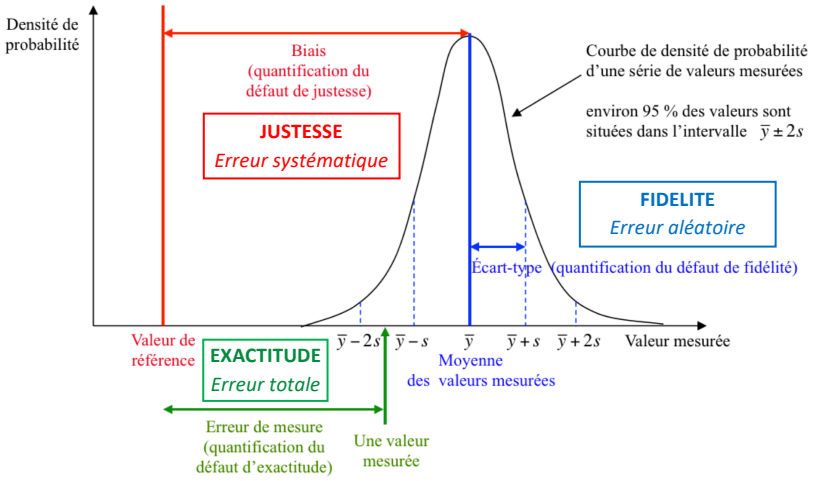


Figure 16 *- Représentation de l'erreur de mesure, du biais et de l'écart-type (Source : https://www.ac-strasbourg.fr/fileadmin/pedagogie/biotechnologies/Metrologie/Document_ressource_metrologie_octobre_2013.pdf)*

OBJECTIFS

I. OBJECTIF PRINCIPAL

L'objectif principal de cette étude est la validation de la méthode de mesure de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes par le CASA qui est une méthode semi-automatisée en comparaison à la méthode manuelle de référence dans l'objectif d'utiliser ce système CASA en routine dans le laboratoire d'aide médicale à la procréation (AMP). La validation de méthode comprend :

- L'évaluation des critères de performance : répétabilité, fidélité intermédiaire, variabilité inter-opérateurs, exactitude,
- Un calcul d'incertitude de mesure,
- Une comparaison de méthode,
- L'évaluation de l'étendue de mesure,
- L'évaluation de potentielles interférences,
- Une comparaison entre deux types de chambres de comptage : BIRR de Biosciences et Leja® de Leja Products B.V.,
- La maîtrise des risques.

II. OBJECTIFS SECONDAIRES

Après la validation de méthode comme objectif principal, l'objectif secondaire est l'évaluation de l'apport de ce système CASA dans le secteur de spermiologie thérapeutique à travers :

- D'une part, la gestion des dilutions : l'objectif est de déterminer la dilution la plus adéquate pour toute concentration dépassant la limite supérieure de linéarité du CASA et minimisant au mieux la perte de précision due à la dilution.
- D'autre part, la préparation des capacitats pour obtenir une concentration de 10 millions/mL dans le cadre des fécondations in vitro (FIV) : l'objectif est d'évaluer l'apport du CASA à obtenir la concentration cible de 10 millions/mL après dilution du capacitat pour les FIV et ICSI (Injection de Spermatozoïde Intra-Cytoplasmique).

MATERIEL ET METHODE

Pour la méthode manuelle et la méthode automatisée, les mêmes conditions pré-analytiques avant tout examen de sperme doivent être respectées (OMS 2010) :

- Instructions à transmettre au patient lors de la prise de rendez-vous :
    - Hyperhydratation : boire 2 litres d'eau par jour les 2 jours précédant l'examen
    - Délai d'abstinence sexuelle entre 2 et 7 jours à respecter
- Si le patient est non connu du service, un questionnaire lui est remis pour recueillir les informations suivantes : son identité (nom, prénom et date de naissance) ainsi que celle de sa conjointe, l'existence d'enfants avec sa conjointe actuelle ou avec une précédente, des débuts de grossesse (interruption volontaire de grossesse, fausse couche), des antériorités de spermogrammes, ses antécédents médico-chirurgicaux uro-génitaux, l'existence d'évènements intercurrents dans les 3 derniers mois (fièvre, maladie, prise de traitement…) pouvant influencer les paramètres spermatiques, antécédents familiaux
- Instructions claires orales et écrites sur le recueil de sperme : importance du lavage des mains, de la toilette des parties génitales au savon puis avec un antiseptique (Dakin)
- Recueil par masturbation au laboratoire dans un réceptacle gradué identifié
- Tracer l'heure du recueil et placer le réceptacle à l'étuve à 37°C pendant 20 à 30 minutes pour liquéfaction

L'analyse commence par les caractéristiques physico-chimiques de l'éjaculat : la mesure du volume (pipette graduée), la mesure du pH par bandelette colorimétrique ainsi qu'une estimation de la viscosité.

Pour la validation de méthode, deux types d'échantillons ont été utilisés :

- Sperme frais
- Capacitat : sperme après préparation par test de migration-survie (TMS)

La préparation du sperme est nécessaire avant toute technique d'aide médicale à la procréation afin de sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles mais aussi séparer les spermatozoïdes du liquide séminal. En effet, des inhibiteurs de la fécondance (facteurs décapacitants) des spermatozoïdes sont présents dans ce liquide et la préparation du sperme va permettre de les éliminer pour obtenir une « capacitation *in vitro* ». Le test de migration-survie consiste à déposer le sperme sur une colonne de gradient de densité croissante puis à récupérer le culot après centrifugation qui va contenir les spermatozoïdes les plus mobiles et les plus aptes à féconder.

L'utilisation des deux types d'échantillons de sperme pour la validation de méthode permet notamment d'obtenir des mobilités sur une étendue de valeurs plus grande.

I. LA METHODE MANUELLE

A. Concentration

L'analyse de la concentration des spermatozoïdes est réalisée selon les recommandations du manuel de l'OMS 2010 : après liquéfaction puis homogénéisation, 2 comptages distincts doivent être effectués grâce à une cellule de comptage de Malassez (**Figure 17**) après dilution dans une solution formolée permettant l'immobilisation des spermatozoïdes.

Figure 17 *- Cellule de Malassez*

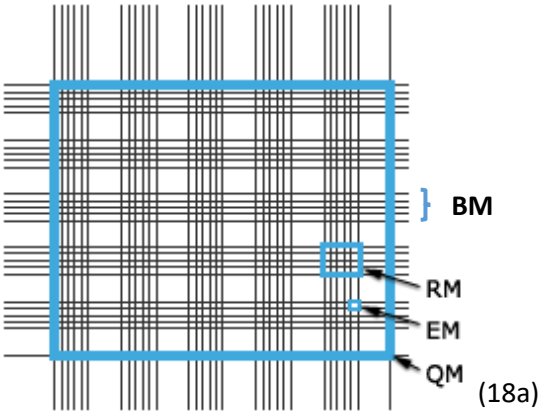
Cette analyse est évaluée en deux temps selon le mode opératoire du laboratoire (HCEBPC.MOP.058) :

- *Estimation de la concentration* : cette estimation permet de déterminer dans un premier temps la dilution nécessaire pour la cellule de Malassez (**Tableau 4**).

Concentration estimée	Dilution à réaliser	Volume de sperme (µL)	Volume de diluant (µL)
> 50 millions/mL	1/40	25	975
> 5 millions/mL	1/20	50	950
< 5 millions/mL	1/10	50	450

Tableau 4 *- Dilution pour cellule de Malassez en fonction de l'estimation de la concentration (Source : mode opératoire HCEBPC.MOP.058)*

- *Comptage en cellule de Malassez* : après dilution adéquate, 2 comptages sont réalisés sur les 2 quadrillages d'une même cellule de Malassez. En fonction de la concentration dans la cellule de Malassez, il faudra compter plusieurs rectangles (non adjacents), ou bandes (non adjacentes) ou la totalité de la cellule pour avoir un compte de 100 spermatozoïdes minimum.



(18a)

EM : volume élémentaire = petit carreau = 1/2000mm3 (ne sert pas pour le comptage)
RM : volume du rectangle = 1/100 mm3
BM : volume d'une bande = 1/10 mm3
QM : quadrillage total = 1 mm3

(18b)

Figure 18 *- **(18a)** Schéma d'une cellule de Malassez et ses subdivisions - **(18b)** Légende (Source : mode opératoire HCEBPC.MOP.058)*

La concentration est ensuite calculée selon la formule suivante :

[Concentration en millions/mL] = X x D x K

- X étant la moyenne obtenue après 2 (ou 3) comptages.
- D étant le facteur de dilution (ex : 20 si dilution au 1/20)
- K étant le facteur dépendant du volume évalué (rectangles/bandes/quadrillage total)

4 rectangles	K = 25 000
5 rectangles	K = 20 000
8 rectangles	K = 12 500
10 rectangles (1 bande)	K = 10 000
2 bandes	K = 5 000
4 bandes	K = 2 500
8 bandes	K = 1 250
Quadrillage	K = 1000

Tableau 5 *- Facteur K selon le volume de cellule de Malassez évalué (Source : mode opératoire HCEBPC.MOP.058)*

B. Mobilité

L'étude de la mobilité est une évaluation en pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes dans le sperme. Elle doit être évaluée dès que possible après la liquéfaction de l'échantillon, de préférence 30 minutes après l'éjaculation. Pour cela, on réalise 2 gouttes calibrées de 10 µL entre lame et lamelle après homogénéisation. L'évaluation de la mobilité se fait alors en pourcentage sur les 2 préparations au microscope à contraste de phase (objectifs x20 et x40) selon la classification suivante (OMS 2010) :

- Mobiles Progressifs : P (anciennement « a+b »)
- Mobiles Non Progressifs : NP (anciennement « c »)
- Immobiles : I (anciennement « d »)
- Mobilité totale : MT = P + NP

Deux modalités d'évaluation sont possibles :

- *Le comptage* : si la concentration est inférieure à 10 millions/mL ou si la mobilité progressive est inférieure à 10%. Il faut compter 100 spermatozoïdes dans différents champs sur chaque préparation soit au total 200 spermatozoïdes puis faire la moyenne des 2 préparations pour chaque catégorie de mobilité (cf classification ci-dessus).
- *L'estimation* : dans tous les autres cas.

II. LA METHODE AUTOMATISEE

A. Présentation du CASA

Le système CASA mis en place au laboratoire du CHU de Grenoble est le système Hamilton Thorne (HT) CEROS II Clinical®. Notre version ne comporte que les modules de base : concentration et mobilité. Des modules d'analyses complémentaires tels que la vitalité et la morphologie peuvent également être installés si besoin. Ce système est composé :

- Du logiciel Hamilton Thorne CASA II Human Clinical Software Version 1.11, Rev. A
- D'un microscope HT Zeiss Axio Lab.A1
- D'une caméra CM-040 GE (JAI®)

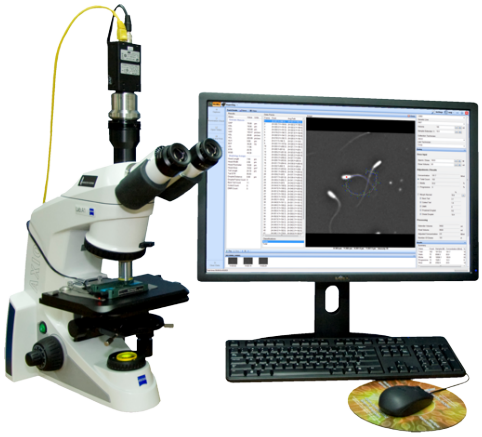


***Figure 19** - Le système CASA HT CEROS II Clinical® en place au laboratoire du CHU de Grenoble*
(Source : https://www.hamiltonthorne.com)

B. Préparation de l'échantillon de sperme

L'échantillon de sperme à analyser doit être introduit lentement par capillarité dans une chambre de comptage avec une pipette en formant un angle d'environ 45° après homogénéisation. Il est important de déposer l'échantillon au niveau de l'entrée de la chambre en laissant entrer le liquide par capillarité et non en poussant le liquide à l'intérieur avec la pipette (notice fournisseur).

L'OMS recommande l'utilisation de chambre de comptage de 20 µm de profondeur qui permet d'obtenir des résultats fiables. La profondeur de la chambre doit être suffisante pour ne pas contraindre le mouvement des spermatozoïdes et à la fois permettre un focus adéquat grâce à la formation d'une monocouche de cellules (ESHRE 1998). En effet, cette profondeur de chambre de 20 µm est le bon compromis pour avoir un focus adéquat tout en permettant la préservation des mouvements d'hyperactivation (Le Lannou 1992), d'autant que l'utilisation du CASA dans le laboratoire du CHU de Grenoble impliquera l'analyse de spermatozoïdes capacités et donc hyperactivés.

Plusieurs chambres de comptage sont commercialisées. Deux différentes chambres de comptage ont été utilisées durant la validation de méthode :

- Dans un premier temps, les lames BIRR BB2-C-20 (BIRR Biosciences B.V., Vreeland, The Netherlands) : lames avec marquage CE composées de 2 chambres d'une profondeur de 20 µm et d'une capacité de 7 µL chacune.

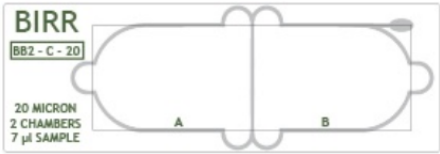


Figure 20 *- Lames BIRR Biosciences 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B*

- Puis les lames Leja® (Leja Products B.V., Nieuw Vennep, The Netherlands) avec marquage CE composées de 2 chambres d'une profondeur de 20 µm et d'une capacité de 6 µL chacune.

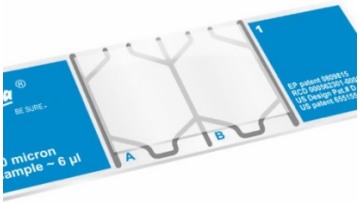


Figure 21 *- Lame Leja® 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B*

Les lames Leja® finalement choisies présentent plusieurs avantages en comparaison aux lames BIRR Biosciences :

- Les lames Leja® ont tout d'abord démontré leur capacité à être utilisées en routine de par leur bonne concordance avec la technique gold standard qu'est l'hémocytomètre, Neubauer modifiée notamment (Bailey, 2007).
- De plus, la formation de bulles d'air est relativement fréquente avec les lames BIRR Biosciences ayant pour conséquence un gaspillage de lames estimé à environ 1 sur 10 à 15 lames. Quant aux lames Leja®, leur conception permet de limiter la formation de bulles d'air si l'introduction de l'échantillon est correctement réalisée (notice fournisseur Leja®).

- Enfin, les lames Leja® correspondent à la recommandation du fournisseur du système CASA (Hamilton Thorne).

L'analyse peut être effectuée sur sperme pur ou après dilution avec du Sperm Preparation Medium (Origio®).

C. Analyse sur le CASA

Le manuel de l'OMS 2010 recommande l'analyse de 2 chambres par patient avec un minimum de 200 spermatozoïdes analysés par chambre et 6 champs minimum par chambre. L'analyse de la concentration et l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes sont réalisées simultanément par le logiciel.

a. Concentration

Le manuel du fournisseur Hamilton Thorne détaille les règles de comptage. Chaque spermatozoïde entrant dans le champ durant les 10 premières images sont comptés durant l'acquisition. Le corollaire est que tout spermatozoïde sortant du champ durant les 10 premières images ne sont pas comptés pour correctement déterminer la concentration. Tout spermatozoïde entrant dans le champ après les 10 premières images est identifié mais n'est pas compté et tout spermatozoïde quittant le champ après les 10 premières images est bien compté. Au total, seulement les spermatozoïdes présents sur les 10 premières images affectent le calcul de la concentration spermatique.
Les concentrations spermatiques allant de 2 millions/mL jusqu'à 50 millions/mL de spermatozoïdes peuvent être mesurées à partir d'un échantillon de sperme pur (Garrett et al. 2003 ; OMS 2010). Au-delà de 50 millions/mL, une dilution est nécessaire (OMS 2010).

b. Mobilité

Comme précisé précédemment, la concentration de spermatozoïdes mobiles, la concentration de spermatozoïdes immobiles et la fraction de spermatozoïdes mobiles sont déterminées à partir de l'analyse uniquement des 10 premières images sur les 30 afin de minimiser l'impact des collisions entre spermatozoïdes sur les résultats.
Les spermatozoïdes sont classés selon les mêmes recommandations que pour la méthode manuelle (OMS 2010 5ème édition) :

- La mobilité progressive (anciennement « a+b »)
- La mobilité non progressive (anciennement « c »)
- La mobilité totale correspondant à la somme des 2 précédentes
- Les spermatozoïdes immobiles (anciennement « d »)

La classification d'un spermatozoïde dans chaque catégorie de mobilité se fait à partir des paramètres cinétiques selon des cut-offs déterminés par les réglages fournisseur détaillés précédemment dans le tableau : des valeurs minimales de vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP) et de rectitude (STR) pour la mobilité progressive et des valeurs maximales de vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP) et de vitesse en ligne droite (VSL) pour la mobilité non progressive et les immobiles. Le logiciel Hamilton Thorne CASA II Human Clinical Software utilise un code couleur spécifique pour chaque spermatozoïde selon les catégories décrites dans le **tableau 6** ci-dessous.

Catégorie	Description	Couleur	OMS 5
Mobile	Un spz qui bouge sur une distance supérieure à la longueur de sa tête à partir de sa position d'origine pendant l'acquisition	**Vert**	**Mobilité progressive (a+b)**
Progressif	Un spz bougeant avec STR > STR_p **ET** VAP > VAP_p	**Cyan**	**Anciennement « a »**
Lent	Un spz bougeant avec VSL < VSL_{lent} OU VAP < VAP_{lent}	**Magenta**	**Mobilité non progressive**
Statique	Un spz bougeant avec VSL < $VSL_{statique}$ OU VAP < $VAP_{statique}$	**Rouge**	**Immobiles**
Franchit les limites	Quitte le champ pendant les 10 premières images	**Bleu foncé**	
Trajet tardif	Début de mouvement après les 10 premières images	**Jaune**	
Entrée tardive	Entre dans le champ après les 10 premières images	**Gris**	

Tableau 6 *- Catégories de mobilité et code couleur*

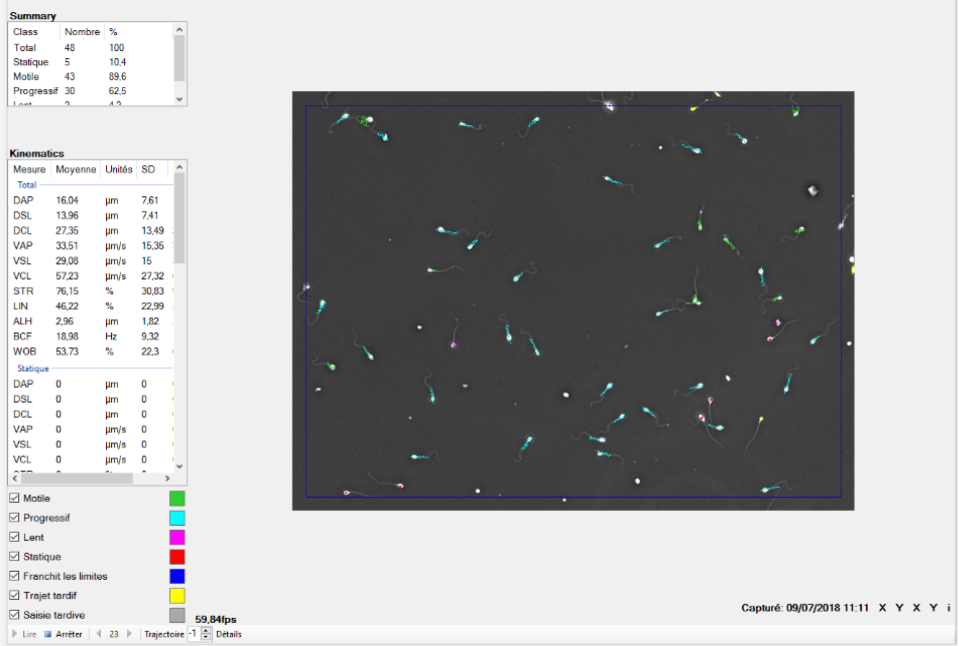


Figure 22 *- Capture d'écran du logiciel : chaque spermatozoïde a sa trajectoire représentée avec la couleur correspondant à sa catégorie de mobilité*

Capture	
Nombre d'images	30
Fréquence d'acquisition	60
Nombre de spermatozoïdes minimum/chambre	200
Chambre	
Correction capillaire	1
Profondeur de la chambre (µm)	20
Type de chambre	Capillaire
Paramètres cinétiques	
STR progressive (%)	80
VAP lente (µm/s)	5
VAP progressive (µm/s)	25
VAP statique (µm/s)	0
VSL lente (µm/s)	5
VSL statique (µm/s)	0
Détection spermatozoïde	
Elongation maximum (%)	100
Elongation minimum (%)	1
Luminosité minimum de la tête	170
Luminosité minimum du flagelle	70
Taille maximum de la tête (µm²)	50
Taille minimum de la tête (µm²)	5
Luminosité	
Maximum	65
Minimum	55

Figure 23 *- Paramétrages du CASA établis par le fournisseur*

D. Contrôles internes de qualité (CIQ)

Des contrôles internes de qualité (CIQ) pour la concentration des spermatozoïdes commercialisés par le même fournisseur que le CASA sont utilisés : il s'agit des CIQ ACCU-BEADS® (Hamilton Thorne) avec 3 niveaux de concentration :

- Vial #1 : valeur cible (Fixed coverslip) = 35 +/- 5 Millions/mL
- Vial #2 : valeur cible (Fixed coverslip) = 18 +/- 2.5 Millions/mL
- Vial #3 : valeur cible (Fixed coverslip) = 3 +/- 1 Millions/mL

Il s'agit de billes de latex de taille similaire à la tête d'un spermatozoïde humain (Notice fournisseur : 4 µm de diamètre) permettant seulement d'évaluer la concentration uniquement et non la mobilité spermatique.

III. LA VALIDATION DE METHODE

Dans la démarche d'accréditation, une vérification des performances sur site du système HT CASA CEROS II a été réalisée au sein du laboratoire du CHU de Grenoble à partir des paramétrages initiaux établis par le fournisseur (**Figure 23**) : il s'agit donc d'une portée A. Les critères de performance à évaluer dans ce cas pour une méthode quantitative (concentration en Millions/mL et mobilité en % des spermatozoïdes) sont décrits dans le **tableau 7** ci-dessous.

Critères à évaluer	Modalités
Répétabilité, fidélité intermédiaire	Essai
Justesse/Exactitude	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité	Essai
Comparaison de méthode	Essai
Intervalle de mesure	Bibliographie
Interférences	Bibliographie
Contamination (s'il y a lieu)	Bibliographie
Robustesse	Bibliographie
Stabilité des réactifs	Bibliographie
Intervalle de référence	Bibliographie (fournisseur ou autre)
Limite de détection	/
Spécificité/sensibilité analytique	/

Tableau 7 *- Tableau des critères de performance à évaluer lors d'une vérification de méthode quantitative (SH GTA 04)*

En s'appuyant sur les référentiels du COFRAC, les critères ayant été retenus pour la vérification de la méthode concernant la concentration et la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes sont les suivants :

- **La répétabilité** : les échantillons de sperme de 4 patients ont été analysés chacun 10 fois par le même opérateur sur le même analyseur dans un délai le plus court possible (15 à 34 minutes entre la première et la dernière mesure). Le nombre de répétitions est établi à 10 pour limiter l'impact de la détérioration rapide de la mobilité des spermatozoïdes dans le temps. Les 4 patients utilisés pour évaluer la répétabilité de la mesure de la concentration et de la mobilité correspondent à 4 profils différents de concentration :
    - *Échantillon 1* : Concentration normale proche de la limite des valeurs normales (normale si > 15 millions/mL)
    - *Échantillon 2* : Concentration supérieure à la limite supérieure de linéarité ayant nécessité une dilution (> 50 millions/mL)
    - *Échantillon 3* : Concentration normale proche de la limite supérieure de linéarité (50 millions/mL OMS 5ème édition), ne nécessitant pas de dilution
    - *Échantillon 4* : Concentration inférieure aux valeurs de référence soit < 15 millions/mL (OMS 2010 5ème édition), proche de la limite de quantification (2,1 millions/mL)
- **La fidélité intermédiaire et la variabilité inter-opérateurs** :
    - *Concentration spermatique* : chacun des 3 niveaux de CIQ Accu-Beads® a été analysé avec un minimum de 30 déterminations sur une période d'environ 4 mois du 16/03/2018 au 24/07/2018. Deux niveaux de CIQ sur les 3 sont analysés quotidiennement dès lors que l'analyseur est utilisé, par deux opérateurs différents concernant cette période sur le même analyseur.

- *Mobilité spermatique* : le seul élément d'évaluation de la fidélité intermédiaire du CASA HT CEROS II à notre disposition pour la mobilité spermatique est l'étude de la variabilité inter-opérateurs. En effet, d'une part le CIQ Accu-Beads® (Hamilton Thorne) n'est pas exploitable dans ce cas car il n'évalue pas la mobilité et d'autre part le temps ne peut être utilisé comme facteur à faire varier en raison de la détérioration temporelle rapide de la mobilité des spermatozoïdes. Les échantillons de sperme de 3 patients ont été analysés pour évaluer la variabilité inter-opérateurs de la mobilité ainsi que la concentration par 5 opérateurs différents dans un délai le plus court possible.

- **L'exactitude** :
  - *Mobilité spermatique* : l'exactitude a pu être évaluée à partir de l'exploitation des résultats d'une comparaison interlaboratoires. En effet, devant l'absence actuelle de CIQ permettant d'évaluer la mobilité spermatique ainsi que l'absence d'EEQ exploitable pour la mobilité sur les systèmes CASA (vidéos non lisibles), le CHU de Grenoble a pris l'initiative de mettre en place un contrôle qualité interlaboratoires (CQIL). Des vidéos d'analyses de sperme constituant 3 profils différents de concentration et mobilité spermatiques ont été enregistrées sur le système CASA du laboratoire du CHU de Grenoble. Après recrutement de 5 laboratoires de spermiologie participants ayant un système CASA Hamilton Thorne en France, une première campagne de CQIL (2019-1) a été réalisée au cours de laquelle les vidéos leur ont été envoyées. Après réception des résultats de chacun des laboratoires participants, la moyenne, l'écart-type et le CV ont été calculés ainsi que le Z-score et le biais (%) pour chaque laboratoire respectivement.
  - *Concentration spermatique* : en plus de ce CQIL, l'exactitude a aussi pu être évaluée à partir de l'exploitation des résultats de l'EEQ « Numération des spermatozoïdes 2018-2A » de Biologie prospective, pour lequel le laboratoire du CHU de Grenoble est répertorié comme utilisant la méthode manuelle avec cellule de Malassez. S'agissant du même matériel que les CIQ utilisés sur le CASA (CIQ Accu-Beads®), cet EEQ a donc pu être analysé sur le CASA.

- **L'incertitude de mesure** : La méthode de calcul choisie est la méthode « CIQ / EEQ » où les résultats du CQIL sont utilisés à la place de l'EEQ. De plus, les CIQ ne permettant pas la mesure de la mobilité, les résultats de variabilité inter-opérateurs ont été utilisés à la place des CIQ pour le calcul de l'incertitude de mesure de la mobilité spermatique. L'incertitude de mesure (u(C)) est obtenue en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et du CQIL (SH GTA 14) :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(CQIL)}$$

La composante u^2(CIQ) représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du CIQ ou de la variabilité inter-opérateurs et la composante u^2(CQIL) représente la variance liée à la justesse (biais) obtenue à partir des résultats du CQIL. On obtient ensuite l'incertitude élargie U selon la formule : U = u(C) x k, où k=2.

- **La comparaison de méthode** : 60 patients ont été analysés par la méthode manuelle de référence et par le CASA sachant que la moitié de ces échantillons correspondait à du sperme total et l'autre moitié à du capacitat.
- **L'étendue de mesures** : le manuel de l'OMS 2010 5ème édition fournit les références pour la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité qui sont respectivement de 2 et 50 millions/mL. Une étude expérimentale a également été réalisée en parallèle pour la limite de quantification et la limite de détection :
    - *Limite de détection* : des mesures de blancs ont été réalisé à partir du diluant SPM car il constitue une matrice dépourvue de l'analyte à doser. Idéalement, 30 mesures répétées des blancs doivent être réalisées, l'écart-type en concentration de ces 30 mesures est ensuite calculé et la limite de détection est alors égale à cet écart-type multiplié par 3.
    - *Limite de quantification* : des dilutions de l'échantillon de CIQ le plus bas (3 millions/mL) avec le diluant (Sperm Preparation Medium (SPM), Origio®) selon le schéma 100µL CIQ + 0µL SPM, 90 + 10, 80 + 20, … et 0 + 100 soit 11 échantillons mesurés chacun 10 fois dans une série unique. Ensuite, on calcule pour chaque série de mesures des différentes dilutions l'écart-type (s), le CV et l'écart de la moyenne à la valeur théorique. Puis, on réalise la courbe d'Horwitz correspondant à la courbe des CV en fonction des concentrations et on peut ensuite déterminer la concentration correspondant à un CV de 10%, représentant alors la limite de quantification.

La réalisation d'une étude expérimentale pour la limite supérieure de linéarité n'a pas été jugée pertinente car d'une part une référence est fournie par l'OMS et d'autre part la perte de précision éventuelle induite par la dilution pour les fortes numérations n'a pas d'impact clinique (pas de valeur normale supérieure).

- **Les interférences** : à partir des résultats discordants de la comparaison de méthode, une analyse détaillée de chaque cas discordant a été réalisée à la recherche de facteurs ayant pu affecter l'analyse et entraîner une discordance entre les méthodes, mettant alors

possiblement en évidence une interférence. La présence de débris ou cellules rondes (Zinaman et al. 1996) est une interférence potentielle qui a été testée dans cette étude.

- De plus, une comparaison a été réalisée entre les deux types de chambres de comptage utilisées lors de la validation de méthode : des échantillons de sperme de 10 patients ont été analysés avec les lames BIRR Biosciences et les lames Leja®.
- Enfin, un complément à la comparaison de méthode a consisté à calculer le nombre de spermatozoïdes progressifs en millions/mL à partir de la concentration et la mobilité progressive pour les deux méthodes pour ensuite comparer ce nombre obtenu entre les deux méthodes. Les différents arguments quant à l'intérêt de calculer le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs en millions/mL sont les suivants :
    - Compte tenu de l'hypothèse de départ qui considère les cellules rondes et débris comme une potentielle interférence, ce calcul permet de les exclure pour s'affranchir de leur potentiel impact sur les résultats. En effet, même si les cellules rondes ou débris sont identifiés comme spermatozoïde et inclus dans la concentration, ils ne sont pas mobiles et ne seront donc pas inclus dans le pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs.
    - Selon le même raisonnement, les spermatozoïdes enroulés étant majoritairement immobiles seront alors exclus grâce à ce calcul
    - Dans le secteur de spermiologie thérapeutique, ce nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs en millions/mL est utile lors de la décision du type de technique entre insémination intra-utérine si ce nombre est supérieur à 1 millions/mL ou fécondation in vitro (FIV conventionnelle ou ICSI) s'il est inférieur à 1.

A noter, les différents critères suivants n'ont pas été évalués pour les raisons correspondantes :

- Justesse : il n'existe pas de CIQ externalisé à disposition,
- Contamination : des chambres de comptages à usage unique sont utilisées, il n'existe donc pas de risque de contamination,
- Robustesse et stabilité des réactifs : aucun réactif n'est utilisé pour cette méthode.

IV. ÉTUDES SECONDAIRES

A. Les dilutions

Lorsque les échantillons possèdent une concentration supérieure à la limite supérieure de linéarité soit 50 millions/mL (manuel de l'OMS 2010 5ème édition), une dilution est alors nécessaire pour réaliser l'analyse de ces échantillons. Celle-ci est réalisée avec du Sperm Preparation Medium®

comme diluant. Il n'existe pas de limite supérieure des valeurs normales de concentration spermatique, ces valeurs peuvent en effet atteindre plusieurs centaines de millions par millilitre. Une étude supplémentaire a été réalisée dans le but de comparer trois dilutions différentes : 1/10ème, 1/20ème, 1/40ème. En théorie une dilution au 1/10ème devrait permettre à tous les échantillons d'une concentration spermatique allant de 50 à 500 millions/mL d'être analysés par le CASA. La comparaison est donc réalisée avec la méthode manuelle en cellules de Malassez qui nécessite une dilution au 1/40 pour tous les échantillons avec une concentration supérieure à 50 millions/mL.

Huit échantillons de patients avec une concentration supérieure à 50 millions/mL ont été analysés : les 3 dilutions ont été réalisées pour chaque patient avec 4 mesures effectuées pour chacune des dilutions soit au total 32 valeurs pour chaque dilution. Les moyennes des écarts sont alors calculées pour chacune des 3 dilutions et ont été comparées grâce au test statistique de Friedman.

L'objectif est de montrer s'il existe une dilution parmi les 3 étudiées qui permette de minimiser la perte de précision due à la dilution de manière significative par rapport aux 2 autres. Dans le cas où aucune différence statistiquement significative n'est retrouvée, la dilution au 1/10ème apparaitrait alors comme la plus adéquate en raison de la perte de précision augmentant avec la dilution et avant tout, cela permet de capturer moins de champs pour atteindre les 200 spermatozoïdes minimums comptés (recommandations de l'OMS), entraînant par conséquent un gain de temps pour l'opérateur.

B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique

Le système CASA HT CEROS II Clinical® acquis par le laboratoire a pour objectif son application en routine dans le secteur de spermiologie thérapeutique.

Pour chaque technique d'aide médicale à la procréation (FIV, ICSI ou IIU), le sperme doit être préalablement préparé avant son utilisation que ce soit par un gradient de densité ou un lavage simple. Dans tous les cas, les paramètres spermatiques que sont la concentration et la mobilité sont évalués au départ : ce sont les paramètres initiaux. Ils sont ensuite à nouveau évalués à la fin de la technique de préparation afin de déterminer :

- Soit le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs présents dans le capacitat à inséminer dans le cadre des inséminations intra-utérines (IIU)
- Soit la technique de mise en fécondation : FIV conventionnelle ou FIV avec ICSI
- Soit la quantité de capacitat nécessaire pour la FIV conventionnelle.

A ce jour, cette évaluation des paramètres spermatiques dans ce secteur est subjective car réalisée par une simple estimation de la concentration et de la mobilité au microscope par l'opérateur. En effet, aucune cellule de comptage n'est utilisée pour l'évaluation de la concentration. L'intérêt du CASA prend donc tout son sens en permettant la standardisation de cette évaluation des paramètres spermatiques dans ce secteur de spermiologie thérapeutique.

Dans le cas des techniques de FIV, la concentration finale du capacitat doit être ajustée grâce à une ou plusieurs dilutions successives :

- Pour les FIV conventionnelles : à environ 10 millions/mL avec des limites acceptables définies par le laboratoire : 8-12 millions/mL. Il est en effet nécessaire de cibler la concentration finale du capacitat car il existe à la fois un risque d'hypofécondation si la concentration est insuffisante mais aussi un risque de fécondation anormale (3 pronoyaux) lorsque celle-ci est trop grande.
- Pour les FIV avec ICSI : une ou plusieurs dilutions peuvent également être nécessaires pour obtenir dans ce cas un capacitat inférieur à 15 millions/mL afin de faciliter l'étape de la sélection du spermatozoïde à injecter.

A noter, le technicien a souvent besoin de diluer à plusieurs reprises pour aboutir au résultat attendu et cela est un facteur supplémentaire de subjectivité justifiant d'autant plus la nécessité d'une méthode d'analyse plus adaptée et objective.

L'objectif de cette étude secondaire est donc de démontrer l'apport du CASA dans l'analyse des paramètres spermatiques dans ce secteur thérapeutique grâce à une meilleure précision et objectivité des résultats.

Pour cela, une étude sur une dizaine d'échantillons de FIV ou ICSI a été réalisée pour évaluer l'apport du CASA pour obtenir la concentration cible finale du capacitat : à partir des capacitats non dilués, un premier passage sur le CASA est réalisé pour obtenir une concentration précise avant dilution et ainsi calculer la dilution nécessaire pour obtenir une concentration finale dans le capacitat de 10 millions/mL. Un deuxième passage sur le CASA est alors réalisé après la dilution pour évaluer si la concentration se trouve entre 8 et 12 millions/mL. Cela permet également de comparer le nombre de dilutions nécessaire entre le CASA et la méthode manuelle, facteur impactant sur le temps technicien.

V. STATISTIQUES

Concernant la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la variabilité inter-opérateurs, l'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$CV\ (\%) = \frac{(s)}{(m)} \times 100$$

L'évaluation de chacun de ces critères repose sur le calcul du CV exprimé en % et sa comparaison au CV limite acceptable préalablement choisi (fournisseurs, sociétés savantes…) : le CV limite de la table RICOS (Ricos et al, 1999). Cette valeur de la table RICOS correspond à la recommandation dite « souhaitable », mais on peut également calculer la limite correspondant à la recommandation dite « acceptable » en multipliant les CV de référence par 1,25. Le CV de la fidélité intermédiaire correspond au « I(%) » pour Imprecision dans la table RICOS et le CV de la répétabilité est quant à lui égal au CV de la fidélité intermédiaire multiplié par 0,75.

Pour l'exactitude, la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) sont également calculés. Ensuite, le Z-score et le biais (%) sont calculés à partir de la moyenne, de l'écart-type et de la valeur du laboratoire (X) tels que les formules ci-dessous le décrivent. Le Z-score est jugé satisfaisant s'il est compris entre -2 et +2, quant au biais il est comparé à la valeur « TE(%) » de la table RICOS correspondant à l'erreur totale et utilisée comme référence pour l'exactitude.

$$Z - score = \frac{(X-m)}{s} \qquad Biais\ (\%) = \frac{(X-m)\times 100}{m}$$

Concernant la comparaison de méthode et la comparaison entre les lames BIRR Biosciences et les lames Leja®, une droite de régression est réalisée avec la méthode manuelle dite de référence en abscisse et le CASA soit la méthode à évaluer en ordonnée, grâce à la droite des moindres carrés dans le logiciel Excel. De plus, un test de concordance a également été réalisé : il s'agit du test de Bland-Altman (Bland et Altman, 1986). Il compare la moyenne entre les 2 méthodes pour chaque échantillon à la différence entre les mesures obtenues par les 2 méthodes. Cela permet d'obtenir les limites d'agrément à partir de la moyenne des différences.

On calcule pour cela :

- m = moyenne des différences
- DS = écart-type des différences
- m +/- 2DS = limites supérieure et inférieure

A partir de ce graphique, il est alors possible d'observer si la moyenne des différences est différente ou non de zéro, et si la différence entre les mesures obtenues par les deux méthodes varie selon la valeur de concentration ou de mobilité (différences importantes dans les valeurs extrêmes par exemple). L'interprétation relève seulement de la décision de l'utilisateur de considérer la concordance satisfaisante ou non (Fuhrman et al. 2003). Les deux méthodes peuvent être considérées comme comparables si la plupart des points obtenus se situent dans l'intervalle donné par les limites d'agrément (m +/- 2DS).

Enfin pour ce qui est de la comparaison des dilutions, une comparaison des moyennes des différences est réalisée grâce au test de Friedman. En effet, il s'agit de comparer plus de 2 facteurs d'étude qualitatifs étant appariés et dont la variable de réponse est quantitative.

RESULTATS

I. REPETABILITE

A. Concentration spermatique

Échantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
Échantillon 1	10	18,8	2,0	10,7	10,1	Conforme (acceptable)
Échantillon 2	10	105,7	6,6	6,3	10,1	Conforme
Échantillon 3	10	48,1	2,7	5,7	10,1	Conforme
Échantillon 4	10	4,1	0,2	4,6	10,1	Conforme

Tableau 8 *- Résultats de répétabilité pour la concentration spermatique*

Pour les échantillons 2, 3 et 4, les CV obtenus sont respectivement de 6,3%, 5,7% et 4,6% et sont conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de RICOS égal à 10,1%. Pour l'échantillon 1, le CV obtenu est égal à 10,7%, il est légèrement supérieur au CV limite souhaitable de RICOS égal à 10,1%. Cependant, il est conforme si l'on considère la limite acceptable de RICOS égale à 12,6%.

B. Mobilité spermatique

a. Mobilité totale

Échantillons	Nombre de valeurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
Échantillon 1	10	69,9	1,8	2,5	6,9	Conforme
Échantillon 2	10	79,2	1,9	2,3	6,9	Conforme
Échantillon 3	10	13,9	1,2	8,4	6,9	Conforme (acceptable)
Échantillon 4	10	60,0	3,2	5,4	6,9	Conforme

Tableau 9 *- Résultats de répétabilité pour la mobilité totale des spermatozoïdes*

Pour les échantillons 1, 2, 4, les CV obtenus sont respectivement de 2,5%, 2,3% et 5,4% et sont conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de RICOS de 6,9%. Pour l'échantillon 3, le CV obtenu est de 8,4%, il est légèrement supérieur au CV limite souhaitable de RICOS de 6,9%, mais conforme selon la limite acceptable de RICOS égal à 8,6%.

b. Mobilité progressive

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
Échantillon 1	10	62,8	1,8	2,9	5,7	Conforme
Échantillon 2	10	73,1	1,9	2,5	5,7	Conforme
Échantillon 3	10	10,2	0,8	7,3	5,7	Non conforme
Échantillon 4	10	57,0	2,5	4,5	5,7	Conforme

Tableau 10 *- Résultats de répétabilité pour la mobilité progressive des spermatozoïdes*

Pour les échantillons 1, 2 et 4, les CV obtenus sont respectivement de 2,9%, 2,5% et 4,5% et sont conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de RICOS de 5,7%. Pour l'échantillon 3, le CV obtenu est de 7,3%, ce qui est non conforme car supérieur au CV limite souhaitable de RICOS ainsi que légèrement supérieur à la limite acceptable de RICOS égale à 7,1%.

II. FIDELITE INTERMEDIAIRE

A. Concentration spermatique

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
CIQ Vial #1	30	35,8	3,0	8,4	13,4	Conforme
CIQ Vial #2	32	19,0	1,6	8,2	13,4	Conforme
CIQ Vial #3	33	3,3	0,4	12,1	13,4	Conforme

Tableau 11 *- Résultats de fidélité intermédiaire pour la concentration spermatique*

Pour les 3 niveaux de CIQ (3, 18 et 35 millions/mL) les CV obtenus sont respectivement de 8,4%, 8,2% et 12,1% et sont tous conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de la table RICOS égal à 13,4%.

B. Mobilité spermatique

La mobilité des spermatozoïdes n'étant pas stable au cours du temps, il n'a pas été possible d'utiliser un échantillon de patient pour établir la fidélité intermédiaire. De plus, la fidélité intermédiaire étant principalement dépendante de la variabilité inter-opérateurs, elle sera donc analysée à partir des résultats correspondants.

III. VARIABILITE INTER-OPERATEURS

A. Concentration spermatique

Échantillons	Nombre d'opérateurs	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
Échantillon 1	5	12,9	0,8	6,2	13,4	Conforme
Échantillon 2	5	22,8	0,9	4,0	13,4	Conforme
Échantillon 3	5	92,9	6,6	7,1	13,4	Conforme

Tableau 12 *- Résultats de la variabilité inter-opérateurs pour la concentration spermatique*

Les concentrations spermatiques des 3 échantillons analysés couvrent une bonne partie du domaine physiopathologique, les moyennes des valeurs des 5 opérateurs pour chaque échantillon étant de 12,9, 22,8 et 92,9 millions/mL. Les CV des échantillons 1, 2 et 3 sont respectivement de 6,2%, 4,0% et 7,1% et sont tous conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de la table RICOS égal à 13,4%.

B. Mobilité spermatique

a. Mobilité totale

Échantillons	Nombre d'opérateurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV limite (%) RICOS	Conclusion
Échantillon 1	5	14,0	1,5	10,5	9,2	Conforme (acceptable)
Échantillon 2	5	75,7	6,9	9,2	9,2	Conforme
Échantillon 3	5	69,7	2,9	4,2	9,2	Conforme

Tableau 13 *- Résultats de la variabilité inter-opérateurs pour la mobilité totale des spermatozoïdes*

Pour les échantillons 2 et 3, les CV obtenus sont respectivement de 9,2% et 4,2% et sont conformes car inférieurs au CV limite souhaitable de RICOS égal à 9,2%. Pour l'échantillon 1, le CV obtenu est égal à 10,5%, ce qui est légèrement supérieur au CV limite souhaitable de RICOS égal à 9,2%. Cependant, il est conforme si l'on considère la limite acceptable de RICOS égal à 11,5 %.

b. Mobilité progressive

Échantillons	Nombre d'opérateurs (N)	Moyenne	Écart -type	CV (%)	CV limite (%) (RICOS)	Conclusion
Échantillon 1	5	11,4	1,1	9,8	7,6	Non conforme
Échantillon 2	5	65,8	4,3	6,6	7,6	Conforme
Échantillon 3	5	62,8	3,7	6,0	7,6	Conforme

Tableau 14 *- Résultats de la variabilité inter-opérateurs pour la mobilité progressive des spermatozoïdes*

Pour les échantillons 2 et 3, les CV obtenus sont respectivement de 6,6% et 6,0%, ce qui est conforme car sont inférieurs au CV limite souhaitable de RICOS égal à 7,6%. Pour l'échantillon 1, le

CV obtenu est non conforme car supérieur au CV limite souhaitable de RICOS, ainsi que légèrement supérieur au CV limite acceptable de RICOS égal à 9,5%.

IV. EXACTITUDE

A. Concentration spermatique

Échantillons	Valeur Labo (CASA)	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) (groupe de pairs)	Biais (%) (toutes techniques)	Biais limite (%)	Conclusion
EEQ 2018-2A	12,8	10,1	15,3	26,5	16,4	+/- 37,7	Conforme
Échantillons	**Valeur Labo**	**Cible : moyenne**	**Z score**	**Biais (%)**	**Limites acceptables RICOS (%)**		**Conclusion**
CQIL 2019-1.1	22,0	23,1	-0,39	-4,9	+/- 37,7		Conforme
CQIL 2019-1.2	5,2	5,5	-0,41	-5,0	+/- 37,7		Conforme
CQIL 2019-1.3	16,5	17,4	-0,40	-5,0	+/- 37,7		Conforme

Tableau 15 *- Résultats de l'exactitude pour la concentration spermatique*

Pour les 3 échantillons du CQIL 2019-1, les biais sont respectivement de -4,9%, -5,0% et -5,0% et sont conformes car compris dans l'intervalle formé par les limites souhaitables de RICOS (+/-37,7%). Les Z-scores sont de -0,39, -0,41 et -0,40 respectivement pour les 3 échantillons et sont conformes car compris entre -2 et +2. Concernant l'EEQ « NUM SPZ 2018-2A », le biais/groupe de pairs et le biais/toutes techniques sont respectivement de 26,5% et 16,4% et sont conformes par rapport à la limite souhaitable de RICOS (+/- 37,7%). De plus, le Z score a pu être calculé à partir de la moyenne et l'écart type du groupe toutes techniques : il est égal à -0,6, conforme car compris entre -2 et +2.

B. Mobilité spermatique

a. Mobilité totale

Échantillons	Valeur Labo	Cible : moyenne	Z score	Biais (%)	Limites acceptables RICOS (%)	Conclusion
CQIL 2019-1 Profil 1	84,0	83,8	0,49	0,3	+/- 23,9	Conforme
CQIL 2019-1 Profil 2	56,1	55,9	0,72	0,4	+/- 23,9	Conforme
CQIL 2019-1 Profil 3	26,3	26,2	0,54	0,3	+/- 23,9	Conforme

Tableau 16 *- Résultats de l'exactitude pour la mobilité totale des spermatozoïdes*

Pour les 3 échantillons du CQIL 2019-1, les biais sont respectivement de 0,3%, 0,4% et 0,3% et sont conformes car compris dans l'intervalle formé par les limites souhaitables de RICOS (+/- 23,9%). Les Z-scores sont de 0,49, 0,72 et 0,54 respectivement pour les 3 échantillons et sont conformes car compris entre -2 et +2.

b. Mobilité progressive

Échantillons	Valeur Labo	Cible : moyenne	Z-score	Biais (%)	Limites acceptables RICOS (%)	Conclusion
CQIL 2019-1 Profil 1	79,9	78,8	0,46	1,5	+/- 21,6	Conforme
CQIL 2019-1 Profil 2	53,5	52,3	0,53	2,5	+/- 21,6	Conforme
CQIL 2019-1 Profil 3	20,2	19,3	0,49	4,3	+/- 21,6	Conforme

Tableau 17 *- Résultats de l'exactitude pour la mobilité progressive des spermatozoïdes*

Pour les 3 échantillons du CQIL 2019-1, les biais sont respectivement de 1,5%, 2,2% et 4,3% et sont conformes car compris dans l'intervalle formé par les limites souhaitables de RICOS (+/- 21,6%). A noter, les Z-scores sont de 0,46, 0,53 et 0,49 respectivement pour les 3 échantillons et sont conformes car compris entre -2 et +2.

V. INCERTITUDE DE MESURE

	CONCENTRATION			MOBILITE TOTALE		MOBILITE PROGRESSIVE	
	Niveau 1 (3 millions/mL)	Niveau 2 (18 millions/mL)	Niveau 3 (35 millions/mL)	Niveau 1 (14%)	Niveau 2 (70%)	Niveau 1 (11%)	Niveau 2 (63%)
Incertitude de mesure élargie U	1,5 millions/mL	3,2 millions/mL	6,0 millions/mL	2,2%	6,1%	2,2%	8,1%

Tableau 18 *- Incertitude de mesure pour la concentration, la mobilité totale et la mobilité progressive*

Concernant la concentration, les incertitudes de mesure élargies U pour les 3 niveaux de CIQ 3, 18 et 35 millions/mL sont respectivement de 1,5, 3,2 et 6,0 millions/mL. Pour la mobilité, les incertitudes de mesure élargies U pour les niveaux 1 (14%) et 2 (70%) sont respectivement de 2,2% et 6,1% pour la mobilité totale et pour les niveaux 1 (11%) et 2 (63%) sont de 2,2% et 8,1% pour la mobilité progressive.

VI. COMPARAISON DE METHODE

Le **tableau 19** ci-dessous résume les paramètres spermatiques mesurés par la méthode manuelle de référence des 60 échantillons utilisés pour la comparaison de méthode grâce à la moyenne, l'écart-type (DS ou déviation standard), la médiane et l'étendue de mesure (valeurs minimum et maximum) pour la concentration, la mobilité totale et la mobilité progressive spermatiques.

Paramètres	n	Manuelle			
		Moyenne	DS	Médiane	Étendue
Concentration spermatique (M/mL)	60	68,7	66,6	49,3	1,4-321
Mobilité totale (%)	60	52	25	50	7-95
Mobilité progressive (%)	60	49	27	48	7-95

Tableau 19 *- Paramètres spermatiques des 60 patients de la comparaison de méthode, analysés par la méthode manuelle*

A. Concentration spermatique

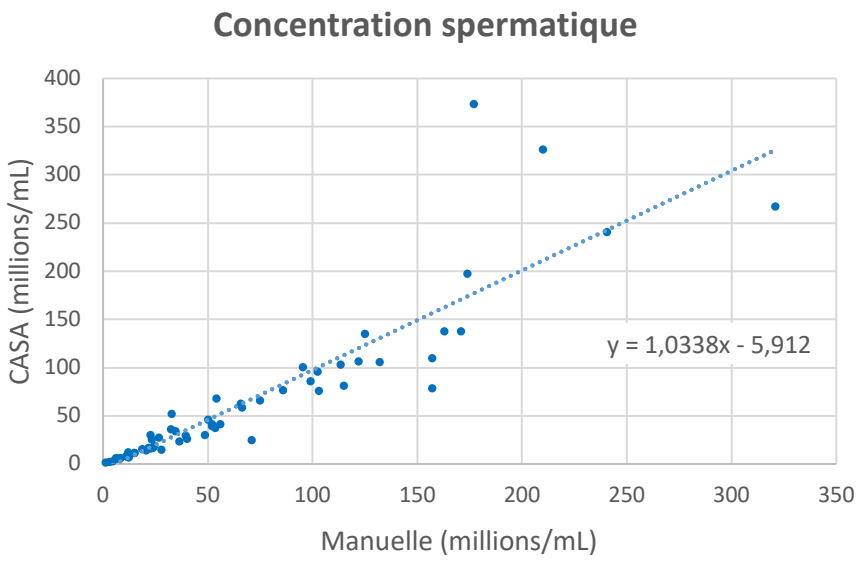


Figure 24 *- Corrélation entre la méthode manuelle et le CASA pour la concentration spermatique : droite de régression*

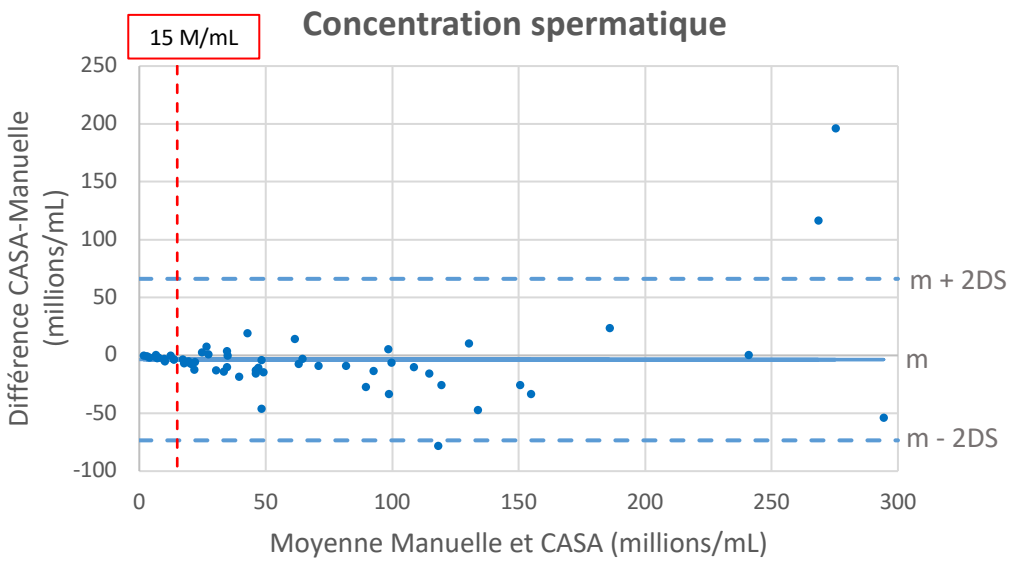


Figure 25 *- Test de concordance de Bland-Altman entre la méthode manuelle et le CASA pour la concentration spermatique*

Sur les 60 valeurs, 3 points sortent de l'intervalle formé par les limites d'agrément [-73,4 ; 66,2] (dont 1 point à la limite) mais ces différences ne sont constatées que pour des fortes concentrations (> 100 millions/mL). La moyenne des différences est égale à -3,6 millions/mL. A noter, 16 échantillons parmi les 60 présentaient une concentration supérieure à 100 millions/mL. Ces différences observées sont donc sans conséquence sur le plan clinique car elles ne modifient pas l'interprétation des résultats de concentration spermatique. On peut alors jugée la concordance entre ces 2 méthodes (CASA et méthode manuelle) comme étant satisfaisante.

B. Mobilité spermatique

a. Mobilité totale

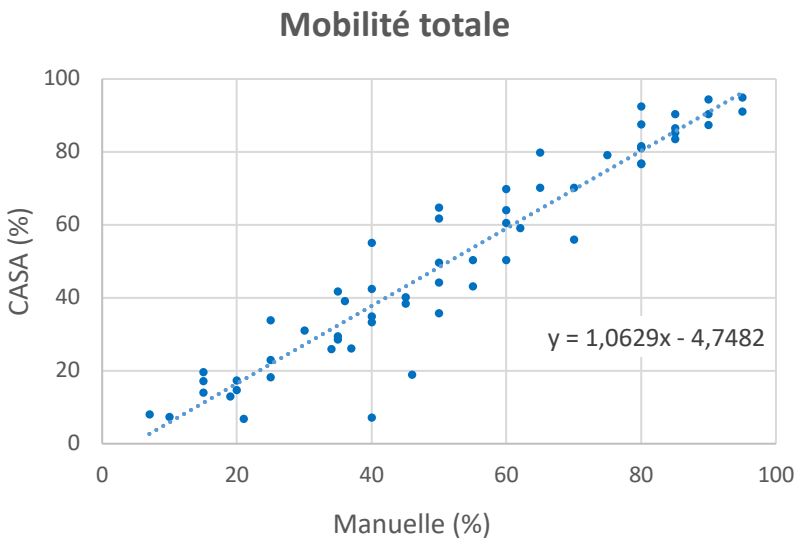


Figure 26 *- Corrélation entre la méthode manuelle et le CASA pour la mobilité totale : droite de régression*

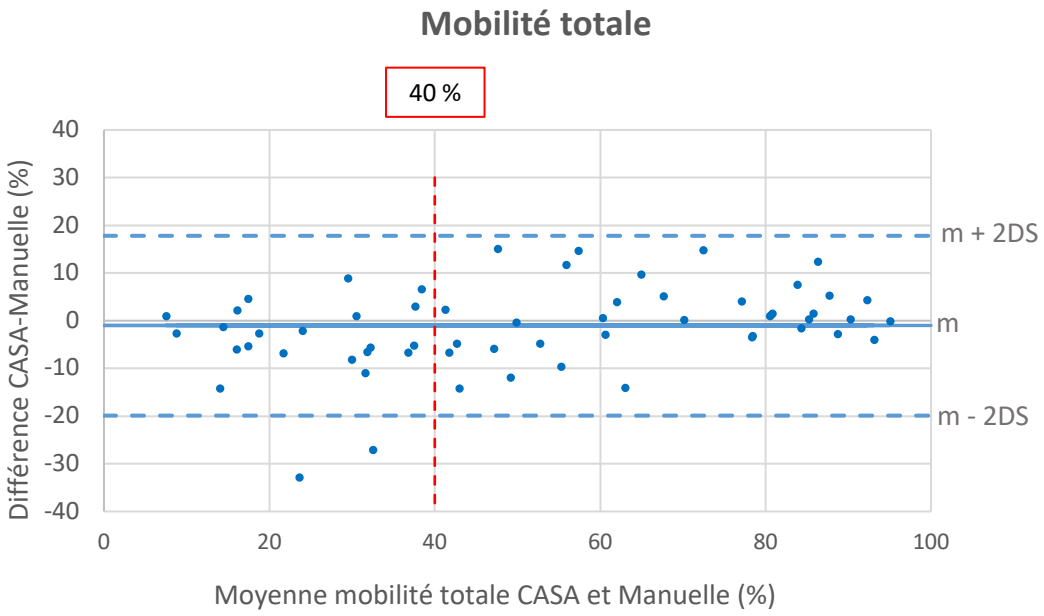


Figure 27 *-Test de concordance de Bland-Altman entre la méthode manuelle et le CASA pour la mobilité totale*

Sur les 60 valeurs, on observe seulement 2 points qui sortent de l'intervalle formé par les limites d'agrément [-19 ; 16]. La moyenne des différences est égale à -1%. L'imprécision constatée pour les 2 valeurs déviantes a une conséquence clinique puisque l'interprétation des résultats est modifiée. En effet, les mobilités obtenues pour ces deux patients (N°32 et N°57) par la méthode manuelle et par le CASA sont présentés dans le **tableau 20** ci-dessous.

	PATIENT N°32		PATIENT N°57	
	Méthode manuelle	CASA	Méthode manuelle	CASA
Mobilité totale (%)	46	19	40	7
Mobilité progressive (%)	25	16	10	3
Mobilité non progressive (%)	21	3	30	4

Tableau 20 *- Résultats de mobilités obtenues par méthode manuelle et par CASA des patients 32 et 57*

Pour ces deux patients N°32 et N°57, les mobilités totales sont respectivement de 46% et 40% en méthode manuelle et de 19% et 7% sur le CASA. A noter, les mobilités en méthode manuelle ont été obtenues par comptage pour le patient N°32 et par estimation pour le patient N° 57. A propos du comptage manuel du patient N°32, il a été réalisé sur 100 cellules alors que l'analyse sur le CASA pour ce même patient a concerné 600 cellules. L'interprétation des résultats est ainsi modifiée avec des mobilités totales normales car supérieures à 40% avec la méthode manuelle alors qu'elles sont inférieures à cette valeur de référence avec le CASA. Cette différence entre les deux méthodes semble provenir principalement d'une discordance entre mobilité non progressive et immobiles. En effet, on observe une mobilité non progressive importante en méthode manuelle (21% et 30% respectivement) que l'on ne retrouve pas avec le CASA (3% et 4% respectivement) alors que la mobilité progressive semble relativement concordante. Ainsi l'interprétation n'est que peu modifiée entre les deux méthodes puisque dans les deux cas, la mobilité reste pathologique avec une mobilité progressive inférieure aux valeurs de référence. A noter, l'analyse en méthode manuelle et l'analyse sur le CASA ont été effectuées l'une après l'autre sans délai. Un délai important entre les deux analyses aurait pu expliquer que les spermatozoïdes mobiles non progressifs (méthode manuelle) soient devenus des immobiles (CASA) avec le temps. De plus, les mobilités totales en méthode manuelle pour ces deux patients restent malgré tout à la limite de la valeur seuil de l'OMS à 40%.

Au total, on peut donc juger la concordance entre les 2 méthodes CASA et méthode manuelle comme satisfaisante.

b. Mobilité progressive

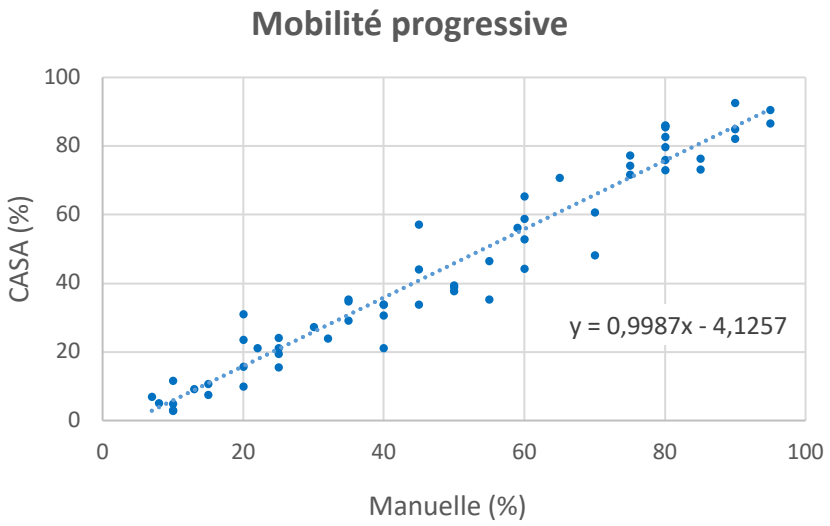


Figure 28 *- Corrélation entre la méthode manuelle et le CASA pour la mobilité progressive : droite de régression*

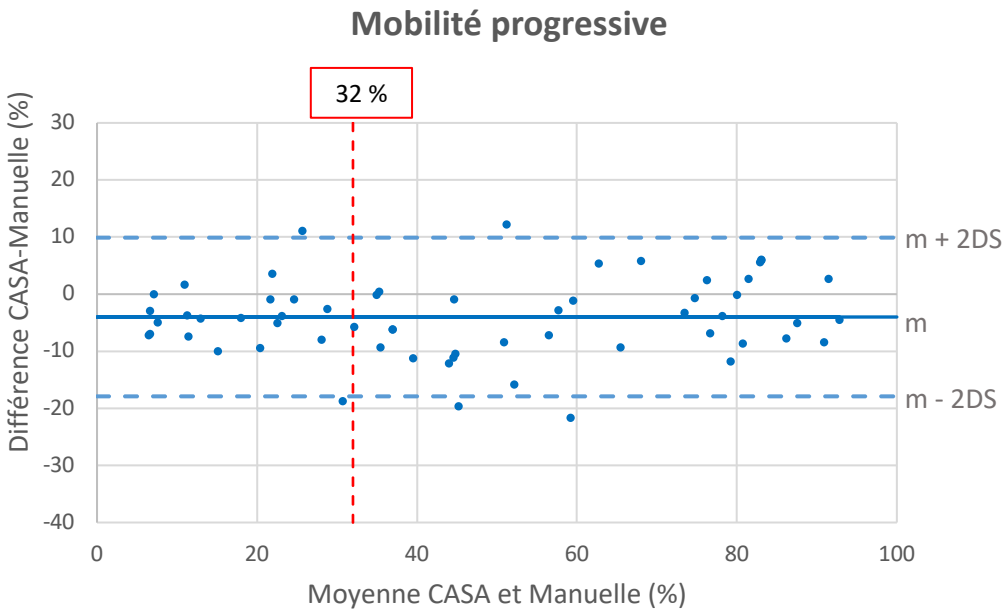


Figure 29 *- Test de concordance de Bland-Altman entre la méthode manuelle et le CASA pour la mobilité progressive*

Sur les 60 valeurs, 5 points sortent de l'intervalle formé par les limites d'agrément [-18 ; 9], les 5 points restant proches des limites supérieure ou inférieure de cet intervalle. La moyenne des différences est égale à -4%. L'imprécision constatée pour les 5 valeurs déviantes n'a pas de conséquence clinique excepté pour une seule valeur car l'interprétation des résultats est changée. Pour cette valeur déviante concernant le patient N°31, les mobilités obtenues par la méthode manuelle et par le CASA sont présentés dans le **tableau 21** ci-dessous.

	PATIENT N°31	
	Méthode manuelle	CASA
Concentration (millions/mL)	65,8	63,3
Mobilité totale (%)	40	55
Mobilité progressive (%)	40	21
Mobilité non progressive (%)	0	34

Tableau 21 *- Résultats de mobilités obtenues par méthode manuelle et par CASA pour le patient 31*

On observe pour ce patient N°31 une mobilité progressive normale à 40% en méthode manuelle alors qu'elle est égale à 21% et inférieure à la valeur normale (32%) avec le CASA. On remarque également une mobilité non progressive importante avec le CASA à 34% alors que celle-ci est nulle avec la méthode manuelle. A noter, la mobilité concernant cette valeur déviante ayant un impact clinique a été évaluée en méthode manuelle par estimation et non par comptage.

La concordance entre les 2 méthodes CASA et méthode manuelle est jugée satisfaisante pour la mobilité progressive.

C. Nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs (millions/ml)

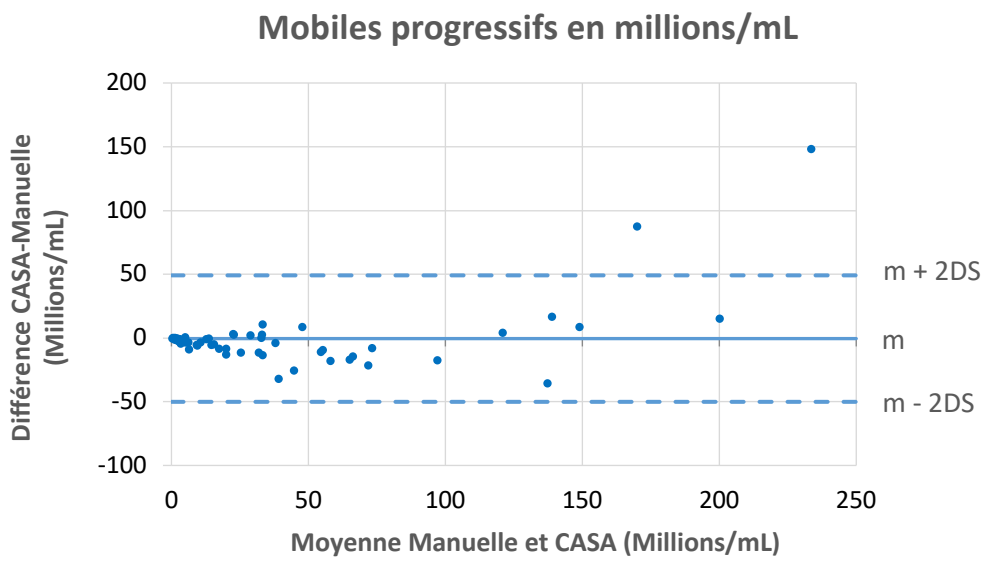


Figure 30 *- Test de concordance de Bland-Altman entre la méthode manuelle et le CASA pour le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs en millions/mL*

A partir des résultats des 60 patients de la comparaison de méthode, le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs en millions/mL a été calculé à partir de la concentration spermatique et du pourcentage de mobilité progressive pour chaque patient et pour chaque méthode (méthode manuelle et CASA). La concordance entre les deux méthodes pour ce paramètre a été évaluée grâce à un test de Bland-Altman (**Figure 30**). La moyenne des différences est de -0,5 million/mL et la majorité des points est compris dans les limites d'agrément [-50,1 ; 49,1]. En effet, seuls 2 points

sortent de ces limites mais sans impact clinique car concernent des fortes concentrations (supérieures à 150 millions/mL), qui implique la nécessité d'une forte dilution à l'origine d'une perte de précision. Le premier patient présente un nombre de mobiles progressifs de 159,3 millions/mL en méthode manuelle et 307,6 millions/mL avec le CASA et le deuxième patient, 126 millions/mL en méthode manuelle et 213,9 millions/mL avec le CASA.

VII. ÉTENDUE DE MESURES

A. Concentration spermatique

a. Limite de quantification

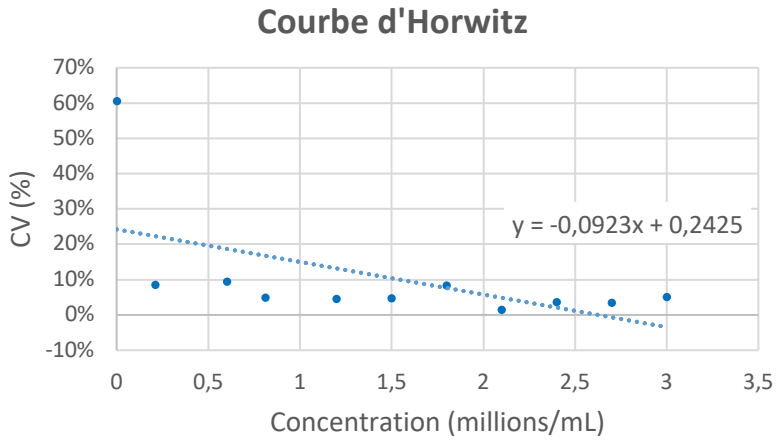


Figure 31 *- Courbe d'Horwitz : représentation des CV (%) en fonction de la concentration spermatique (millions/mL)*

A partir de la courbe d'Horwitz représentant les CV en fonction de la concentration, on détermine la limite de quantification étant égale à la concentration correspondant à un CV égal à 10%, soit 1,5 millions/mL. Ce résultat se rapproche de la référence fournie par le manuel de l'OMS 2010 égale à 2,0 millions/mL.

b. Limite de détection

Quinze mesures de blancs avec le diluant SPM ont été effectuées. En calculant le triple de l'écart-type de ces mesures, on obtient alors une limite de détection égale à 0,09 millions/mL.

B. Mobilité spermatique

La mobilité spermatique étant mesurée en pourcentage, l'étendue de mesure est donc de 0 à 100%.

VIII. INTERFERENCES

A. Flux laminaire

Il a été observé dans cette étude que la présence d'un flux laminaire peut surestimer la mobilité, tous les spermatozoïdes étant en mouvement passif et donc comptabilisés comme mobile par le CASA lors de la capture. De plus, tout objet de taille et d'apparence similaires à une tête spermatique et mis en mouvement par ce flux peut également être compté comme un spermatozoïde mobile ce qui surestime dans ce cas la concentration, le mouvement flagellaire n'étant pas pris en compte dans la détection des spermatozoïdes (Mortimer et al. 2015). Le **tableau 22** ci-dessous illustre avec un exemple l'impact de la présence d'un flux laminaire sur les résultats. On observe lors de la première analyse en présence du flux que la quasi-totalité des spermatozoïdes comptés par le logiciel est considérée comme mobile : mobilité totale à 96%. Puis lorsque l'analyse est réitérée sur le même échantillon après avoir attendu que le flux cesse, on remarque que la mobilité totale diminue de plus de la moitié : mobilité totale à 40%. La **figure 32** représente une capture d'écran de l'analyse d'un champ par le logiciel CASA en présence d'un flux. On peut observer sur cette capture la trajectoire de chaque tête de spermatozoïde représentée par un trait de la couleur correspondant à la catégorie de mobilité (vert ou bleu correspondant à la mobilité progressive). Ainsi en raison du flux, les spermatozoïdes mais aussi toute autre particule ou cellule de taille et apparence similaires à la tête spermatique sont mobilisés par ce flux de la gauche vers la droite. On retrouve ainsi la surestimation importante de la mobilité en présence du flux laminaire, ainsi qu'une légère surestimation de la concentration (peu de débris et cellules présents dans cet échantillon et en particulier sur ce champ).

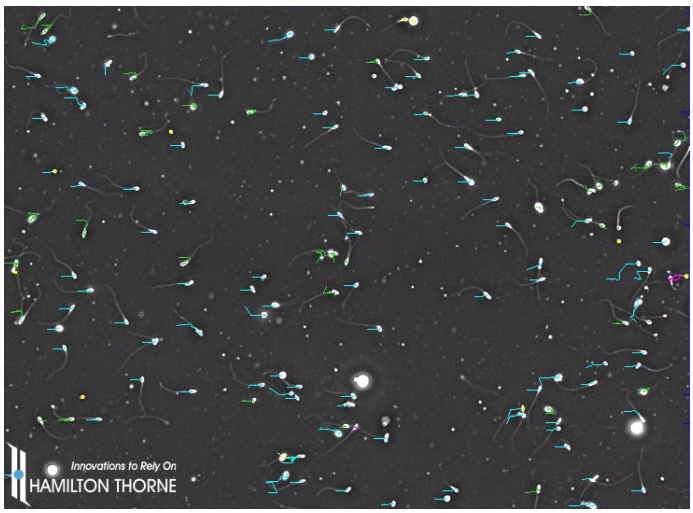


***Figure 32**- Capture écran de l'analyse du logiciel CASA en présence d'un flux laminaire*

	1ère analyse avec flux	2ème analyse sans flux
Concentration (millions/mL)	4,7	3,8
Mobilité totale (%)	96	40
Mobilité progressive (%)	77	24

Tableau 22 *- Comparaison de résultats de concentration et de mobilité d'un même échantillon avec flux et sans flux*

Le respect du mode opératoire permet de limiter la formation de ce flux, en particulier l'importance de ne pas laisser d'échantillon excédentaire au niveau de la zone de chargement à l'entrée de la chambre de comptage. Dans les cas où le flux persiste malgré ces recommandations, il suffit d'attendre quelques secondes voire minutes pour que le flux cesse avant de démarrer l'acquisition sur le logiciel (Mortimer et al. 2015).

B. Spermatozoïdes enroulés

Les spermatozoïdes enroulés possèdent le flagelle enroulé autour de la tête ou enroulé sur lui-même. Il existe alors une très forte probabilité que le spermatozoïde ne soit pas comptabilisé par le CASA : cela entraîne un risque de sous-estimation de la concentration et donc de surestimation de la mobilité (les spermatozoïdes enroulés étant majoritairement immobiles).

Le graphique ci-dessous (**Figure 33**) représente les différences en millions/mL entre la concentration spermatique évaluée par le CASA et celle par la méthode manuelle en fonction du pourcentage d'enroulés pour les 60 échantillons de la comparaison de méthodes. Le graphique suivant (**Figure 34**) quant à lui représente les différences en pourcentage entre la mobilité totale spermatique évaluée par le CASA et celle par la méthode manuelle en fonction du pourcentage d'enroulés pour les 60 échantillons de la comparaison de méthodes. A noter pour la mobilité, seul le graphique pour la mobilité totale est présenté, celui de la mobilité progressive étant comparable. L'objectif de ces graphiques est de rechercher une éventuelle valeur seuil en termes de pourcentage de spermatozoïdes afin d'adapter l'interprétation des résultats. La courbe linéaire de tendance a été représentée ainsi que les limites souhaitables supérieure et inférieure correspondant à l'erreur totale « TE (%) » de la table RICOS soit +/- 37,7% pour la concentration et +/- 23,9% pour la mobilité totale puisque qu'il s'agit d'évaluer l'écart d'une valeur ponctuelle à la valeur vraie.

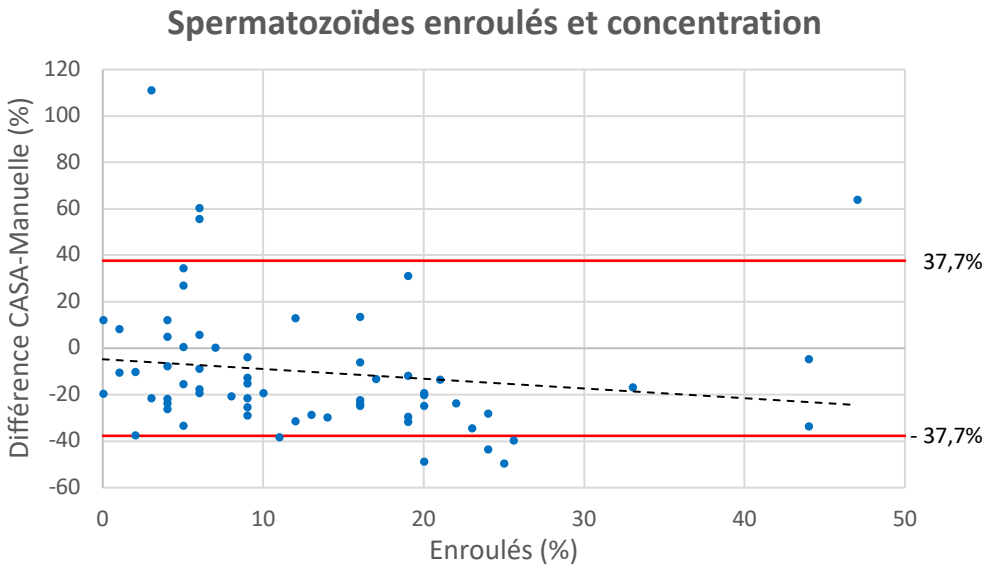


Figure 33 *- Résultats de l'influence du pourcentage de spermatozoïdes enroulés sur la concentration spermatique : différence en M/mL entre CASA et manuelle en fonction du pourcentage d'enroulés*

Sur les 60 valeurs, 9 points sortent de l'intervalle de référence et concernent des pourcentages de spermatozoïdes enroulés allant de 3 à 47 % et pour des concentrations allant de 12,3 à 210 millions/mL. Sur ces 9 échantillons, il n'existe aucune conséquence clinique car l'interprétation des résultats reste inchangée entre les 2 méthodes. On observe une légère tendance de sous-estimation de la concentration augmentant avec le pourcentage de spermatozoïdes enroulés (courbe de tendance en pointillé sur **figure 33**).

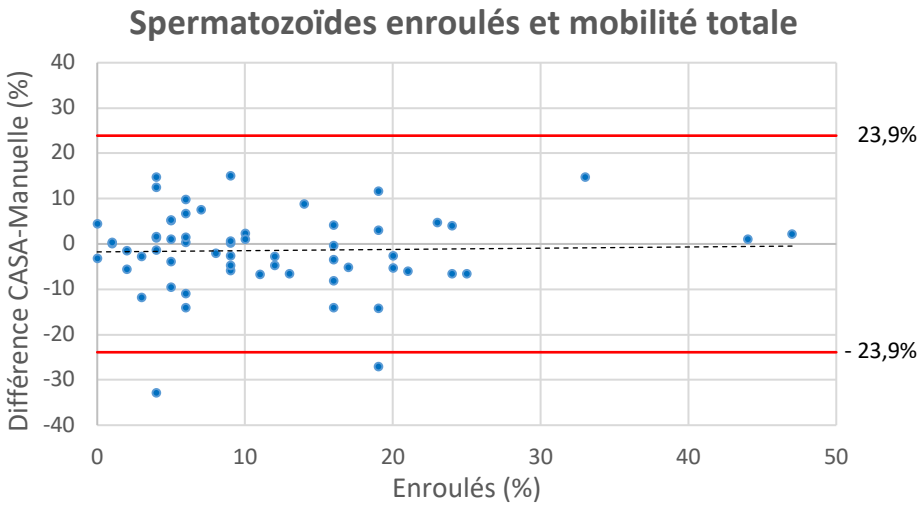


Figure 34 *- Résultats de l'influence du pourcentage de spermatozoïdes enroulés sur la mobilité totale spermatique : différence en % entre CASA et manuelle en fonction du pourcentage d'enroulés*

Sur les 60 valeurs, 2 points sortent de l'intervalle de référence. Pour le premier (patient N°32), le pourcentage de spermatozoïdes enroulés est de 19% et la mobilité totale est de 46% en méthode manuelle et 19% sur le CASA. Pour le second (patient N°57), le pourcentage de spermatozoïdes enroulés est de 4% et la mobilité totale est de 40% en méthode manuelle et 7% sur le CASA. Pour ces

2 échantillons, il existe donc une conséquence clinique car l'interprétation des résultats de mobilité totale est modifiée entre les 2 méthodes. Il s'agit en réalité des deux mêmes patients identifiés comme valeurs déviantes sur le graphique de Bland-Altman pour la comparaison de méthode de la mobilité totale. La mobilité non progressive importante en manuelle et non retrouvée avec le CASA avait été identifiée comme cause probable à cette différence entre les deux méthodes concernant ces patients. De plus, les pourcentages de spermatozoïdes enroulés pour ces 2 patients étaient relativement faibles (19% et 4%). Enfin, il n'a pas été mis en évidence de tendance à une surestimation de la mobilité lorsque le pourcentage de spermatozoïdes enroulés augmente (courbe de tendance en pointillé sur **figure 34**).

C. Cellules rondes

Les premières générations de systèmes CASA avaient des difficultés à distinguer les spermatozoïdes des débris ou cellules rondes pouvant impacter sur la mesure de la concentration des spermatozoïdes (Zinaman et al. 1996 ; ESHRE 1998). L'influence de la présence de cellules rondes sur l'analyse de la concentration spermatiques a été évaluée en comparant la mesure de la concentration spermatique pour 5 échantillons dont la concentration en cellules rondes était au moins égale à 1 million/mL. Le graphique ci-dessous (**Figure 35**) représente la différence de concentration (%) entre le CASA et la méthode manuelle (cellule de Malassez) en fonction de la concentration en cellules rondes en millions/mL, allant de 1,2 à 7,9 millions/mL. Les limites acceptables de la table RICOS (erreur totale, TE +/- 37,7 %) sont représentées par les deux droites rouges parallèles. Pour les 5 échantillons analysés, les différences observées entre les 2 méthodes sont comprises dans les limites acceptables de RICOS.

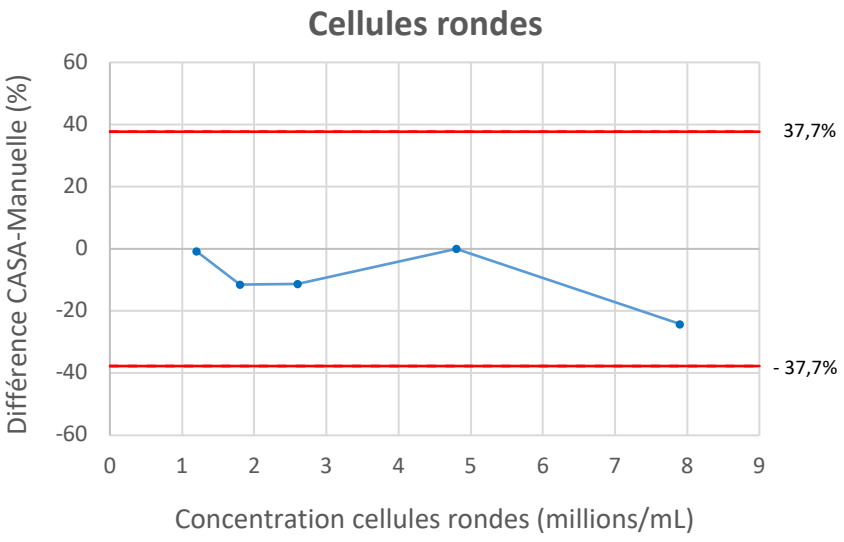


Figure 35 *- Résultats de l'influence des cellules rondes sur la concentration spermatique : différence de concentration en % entre CASA et Manuelle en fonction de la concentration en cellules rondes en Millions/mL*

VI. COMPARAISON LAMES BIRR BIOSCIENCES-LAMES LEJA®

Les 10 patients analysés ont permis la comparaison sur une majorité du domaine physiopathologiques des valeurs de concentration et de mobilité avec pour valeurs extrêmes (moyennes BIRR/Leja®) :

- Concentration : 6,0 à 169,5 millions/mL
- Mobilité totale : 16 à 88 %
- Mobilité progressive : 13 à 83%

Les lames BIRR et les lames Leja® présentent une bonne corrélation pour la concentration, la mobilité et la mobilité progressive des spermatozoïdes, ce qui est illustré par les droites de régression correspondantes (**Figures 36, 38 et 40**). On retrouve également une bonne concordance pour ces 3 paramètres que l'on peut observer sur les graphiques de Bland-Altman correspondants (**Figures 37, 39 et 41**). En effet, sur l'ensemble de ces 3 graphiques, on ne retrouve qu'une seule valeur déviante qui concerne la concentration et correspond à une valeur supérieure à 150 millions/mL sans impact sur l'interprétation (158,4 millions/mL avec lame BIRR et 180,5 millions/mL avec lame Leja®).

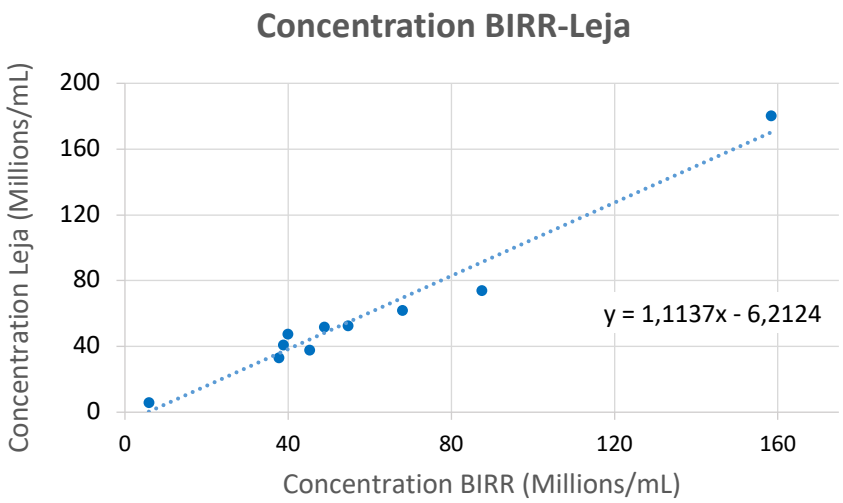


Figure 36 *- Corrélation entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la concentration : droite de régression*

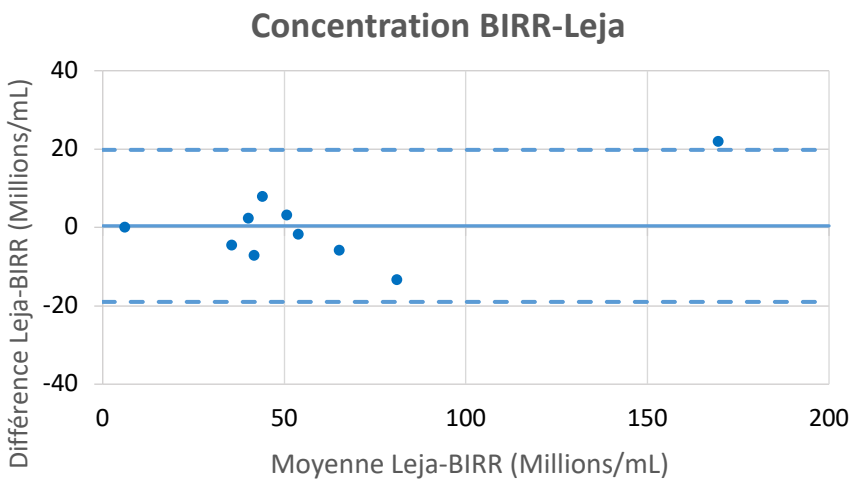


Figure 37 *- Test de concordance de Bland-Altman entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la concentration*

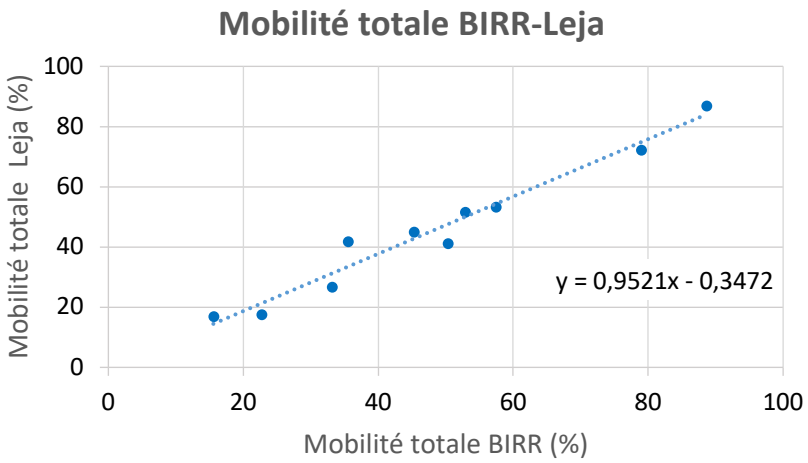


Figure 38 *- Corrélation entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la mobilité totale : droite de régression*

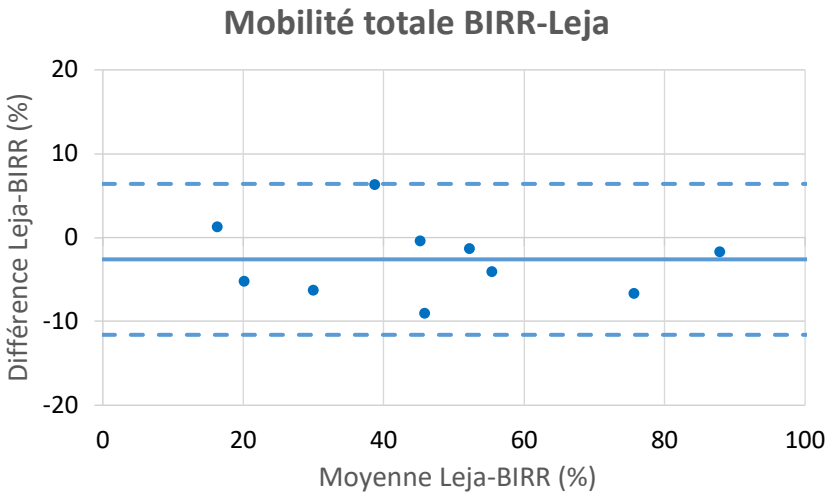


Figure 39 *- Test de concordance de Bland-Altman entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la mobilité totale*

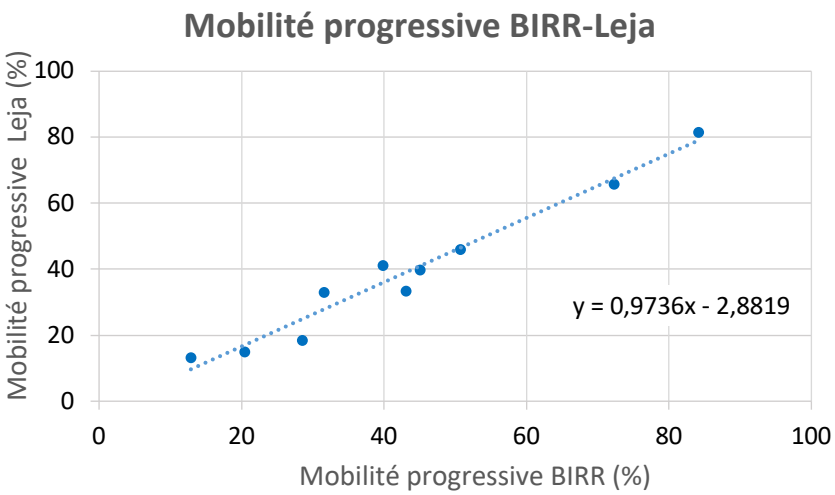


Figure 40 *- Corrélation entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la mobilité progressive : droite de régression*

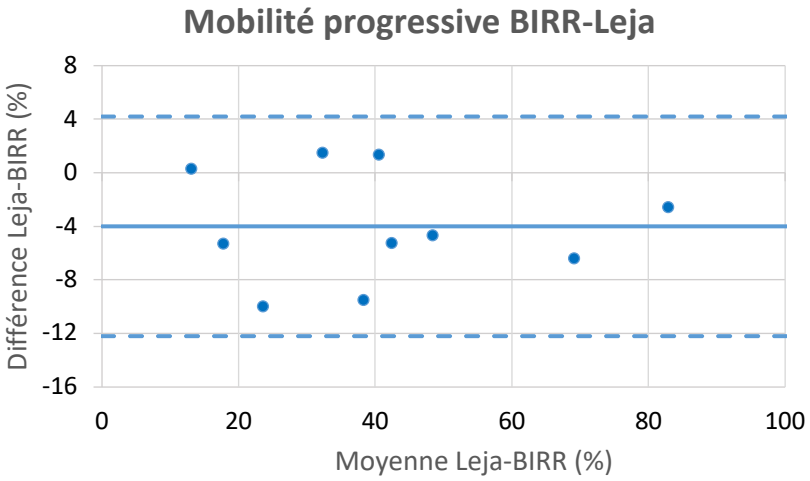


Figure 41 *- Test de concordance de Bland-Altman entre les lames BIRR et les lames Leja® pour la mobilité progressive*

VII. ETUDES SECONDAIRES

A. Les dilutions

	Dilution 1/10	Dilution 1/20	Dilution 1/40	Test statistique (Friedman)
Moyenne des différences (%)	- 20,0	- 24,0	- 25,5	p-value 0,009
Ecart-type des différences (%)	9,8	11,8	8,9	/

Tableau 23 *- Moyenne et écart-types des différences de concentration CASA-Malassez en % pour chaque dilution*

Pour chacune des mesures de concentration réalisée sur le CASA, la différence de concentration entre CASA et méthode manuelle a été calculée en pourcentage de la valeur de la méthode manuelle. Les moyennes des différences et les écart-types des différences ont été calculés (**Tableau 23**). Les écart-types sont similaires et n'indiquent pas une variation plus importante lorsque la

dilution augmente. Un test de Friedman a été réalisé pour comparer les moyennes des différences de concentration (en %) entre CASA et méthode manuelle des 3 dilutions et on retrouve une différence statistiquement significative avec une p-value égale à 0,009. Au vu de ce résultat, un test t Student pour données appariées a été effectué pour comparer les dilutions 2 par 2 : la dilution 1/10ème avec la dilution 1/20ème, la dilution 1/10ème avec la dilution 1/40ème et la dilution 1/20ème avec la dilution 1/40ème. On retrouve ainsi une différence statistiquement significative entre la 1/10ème et la 1/20ème (p-value 0,016) et entre la 1/10ème et la 1/40ème (p-value 0,0003) alors qu'il n'y pas de différence statistiquement significative entre la 1/20ème et la 1/40ème (p-value 0,275).

B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique

N° patient	Technique	Concentration avant dilution	Dilution CASA	Concentration après dilution	Objectif 8-12 millions/mL	Nombre de dilutions Manuelle
1	ICSI	43,8	1/4	9,0	Oui	2
2	FIV	53,2	1/5	8,3	Oui	2
3	ICSI	65,3	1/6	9,0	Oui	1
4	ICSI	58,4	1/5	9,2	Oui	2
5	FIV	39,5	1/4	9,0	Oui	NA
6	ICSI	20,4	1/2	9,8	Oui	NA
7	FIV	25,7	1/1,75	11,4	Oui	2
8	ICSI	103,2	1/10	11,9	Oui	1
9	ICSI	54,4	1/5	9,1	Oui	1
10	FIV	30,1	1/2,75	9,9	Oui	1

Tableau 24 *- Résultats de la comparaison CASA et méthode manuelle pour l'ajustement de la concentration du capacitat à 10 millions/mL (limites acceptables 8-12 millions/mL)*

L'objectif était d'obtenir une concentration après dilution à 10 millions/mL +/- 2 millions/mL. Pour chacun des 10 patients analysés, une seule dilution a été réalisée et dépendait de la concentration obtenue lors de l'analyse sur le CASA du capacitat encore non dilué. Le **tableau 24** résume pour les 10 patients le type de technique (FIV ou ICSI), les concentrations avant et après la dilution, la dilution réalisée pour le CASA ainsi que le nombre de dilutions réalisées lors de la méthode manuelle pour obtenir la concentration cible.

Pour chacun des 10 patients, la concentration obtenue après dilution était comprise dans les limites acceptables entre 8 et 12 millions, avec des valeurs allant de 8,3 à 11,9 millions/mL. Au total, pour les 10 patients analysés la concentration du capacitat après une seule dilution était satisfaisante car comprise dans les limites acceptables fixées à 8-12 millions/mL. Ainsi le CASA permet en une seule dilution de cibler avec une meilleure précision la concentration souhaitée de 10 millions/mL +/- 2 millions/mL.

DISCUSSION

L'installation du système CASA Hamilton Thorne CEROS II Clinical® au sein du laboratoire d'AMP du CHU de Grenoble au niveau du secteur de spermiologie thérapeutique a pour objectif de standardiser la mesure de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes tout en diminuant la variabilité intra et inter-opérateurs ainsi que la possibilité d'analyse fine du mouvement spermatique grâce aux paramètres cinétiques. Comme pour toute nouvelle technique, une vérification ou une validation de la méthode est indispensable avant son application en routine. A partir des résultats obtenus, leur pertinence doit ensuite être évaluée en s'appuyant sur diverses ressources documentaires telles que la documentation du fournisseur, les références bibliographiques mais aussi les conférences de consensus.

Des recommandations d'utilisation des systèmes CASA ont été définis au cours de trois conférences de consensus (OMS 2010):

- 7th symposium on spermatology en octobre 1994 à Cairns: Workshop report Clinical CASA the quest for consensus (Mortimer et al. 1995)
- ESHRE en juin 1995 à Hambourg : Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques, 1996
- ESHRE en avril 1997 à San Miniato, Italie : Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa, 1998.

I. LA VALIDATION DE METHODE

A. Les performances de la méthode CASA

Les performances étudiées de la mesure de la concentration et la mobilité spermatiques par le CASA HT CEROS II retrouvent une répétabilité, une fidélité intermédiaire, une variabilité inter-opérateurs et une exactitude grandement satisfaisantes, excepté pour les valeurs faibles de mobilité progressive (inférieure à 15%) où les CV de répétabilité et de variabilité inter-opérateurs sont non conformes avec des valeurs de CV restant tout de même proches des limites souhaitables de RICOS. Cependant, dans ces deux cas où le CV obtenu est non conforme, l'interprétation du résultat de la mobilité n'est pas modifiée (mobilité progressive inférieure aux valeurs de référence de l'OMS de 32%).

Par ailleurs, on peut comparer les résultats de ces deux échantillons non conformes à la table de Rümke (**Figure 42**) habituellement utilisée en cytologie pour obtenir des limites acceptables d'un pourcentage cellulaire en fonction du nombre de cellules comptées et du pourcentage cellulaire réel.

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0 - 3.6	0 -1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0. 1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2. 0 - l.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 -10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6. 5
7	2.9 - 13.9	3.9 -11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6. 5 - 7. 6
8	3.5 - 15.2	4.6 -12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8. 6
9	4.2 -16.4	5.4 -13.9	6. 6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 -17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38. 0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0
55	44.7 - 65.0	47.8 - 62.0	50.5 - 59.4	51.9 - 58.1	54.0 - 56.0
60	49.7 - 69.7	52.9 - 66.8	55.6 - 64.3	56.9 - 63.1	59.0 - 61.0
65	54.8 - 74.3	58.0 - 71.6	60.6 - 69.2	62.0-68.0	64.0-66.0
70	60.0 - 78.8	63.1 - 76.3	65.8 - 74.0	67.1 - 72.8	69.0 - 70.9
75	65.3 - 83.1	68.4 - 80.8	71.0 - 78.7	72.2 - 77.7	74.1 - 75.9
80	70.8 - 87.3	73.8 - 85.3	76.2 - 83.4	77.4 - 82.4	79.2 - 80.8
85	76.5 - 91.4	79.3 - 89.6	81.6 - 88.0	82.6 - 87.2	84.2 - 85.7
90	82.4 - 95.1	85.0 - 93.8	87.0 - 92.5	88.0 - 91.8	89.3 - 90.6
91	83.6 - 95.8	86.1 - 94.6	88.1 - 93.4	89.1 - 92.7	90.4 - 91.6
92	84.8 - 96.5	87.3 - 95.4	89.3 - 94.2	90.1 - 93.6	91.4 - 92.6
93	86.1 - 97.1	88.5-96.1	90.4 - 95.1	91.2 - 94.5	92.4-93.5
94	87.4 - 97. 8	89.8 - 96.9	91.5 - 95.9	92.3 - 95.4	93.5 - 94. 5
95	88.7 - 98.4	91.0 - 97.6	92.7 - 96.7	93.5 - 96.3	94.5 - 95.5
96	90.1 - 98.9	92.3 - 98.3	93.9 - 97.5	94.6 - 97.1	95.5 - 96.4
97	91.5 - 99.4	93.6 - 98.9	95.1 - 98.3	95.7 - 98.0	96.6 - 97.4
98	93.0 - 99.8	95.0 - 99.4	96.4 - 99.0	96.9 - 98.8	97.7 - 98.3
99	94.6 - 99.9	96.4 - 99.9	97.7 - 99.7	98.2 - 99.5	98.7 - 99.2
100	96.4 - 100	98.2 - 100	99.3 - 100	99.6 - 100	99.9 - 100

Figure 42 *- Table de Rümke : première colonne « a » correspondant au pourcentage cellulaire réel et « n » au nombre de cellules comptées*

Dans notre cas nous considérons un nombre de spermatozoïdes comptés de 200 (recommandations OMS) et le pourcentage cellulaire réel comme la moyenne des valeurs. Chacune des 10 répétitions de l'échantillon 3 de la répétabilité de la mobilité progressive variant entre 9 et 11% est comprise dans les limites acceptables [6,2-15,0%] selon la table de Rümke pour une moyenne de 10,2%. De même, chacune des 5 valeurs de l'échantillon 1 de la variabilité inter-opérateurs de la mobilité progressive variant entre 10 et 13% est comprise dans les limites acceptables [6,2-15,0%] selon la table de Rümke pour une moyenne de 11,4%.

Si l'on compare les performances du CASA à celles de la méthode manuelle obtenues lors de sa validation de méthode, on peut noter pour la concentration spermatique que les CV obtenus pour évaluer la répétabilité, la fidélité intermédiaire et les biais pour l'évaluation de l'exactitude sont comparables (conformes et valeurs similaires). Concernant la mobilité totale et progressive, les CV de fidélité intermédiaire du CASA sont nettement plus satisfaisants que ceux obtenus par la méthode

manuelle (**tableau 25**). En effet pour la mobilité totale en méthode manuelle, sur 5 échantillons évalués seuls 2 échantillons présentaient des CV conformes (l'un selon les limites RICOS souhaitables et l'autre selon les limites RICOS acceptables) et les 3 autres échantillons avaient des CV non conformes alors qu'avec le CASA, on obtient des CV conformes pour les 3 échantillons évalués (2 selon les limites RICOS souhaitables et 1 selon les limites RICOS acceptables).

		FIDELITE INTERMEDIAIRE Mobilité totale		
		CV (%)	Limite RICOS (%)	Conclusion
METHODE MANUELLE	Échantillon 1	9,9	9,2	Conforme (limite acceptable)
	Échantillon 2	5,6	9,2	Conforme
	Échantillon 3	14,1	9,2	Non conforme
	Échantillon 4	20,2	9,2	Non conforme
	Échantillon 5	22,2	9,2	Non conforme
CASA	Échantillon 1	10,5	9,2	Conforme (limite acceptable)
	Échantillon 2	9,2	9,2	Conforme
	Échantillon 3	4,2	9,2	Conforme

Tableau 25 *- Comparaison résultats de fidélité intermédiaire pour mobilité totale entre méthode manuelle et CASA*

De même pour la mobilité progressive en méthode manuelle, seul 1 échantillon présentait un CV conforme selon les limites RICOS acceptables et les 4 autres échantillons avaient des CV non conformes alors qu'avec le CASA, on obtient des CV conformes pour 2 échantillons selon les limites RICOS souhaitables et seulement 1 échantillon avec un CV non conforme (**Tableau 26**). Lors de la validation de la méthode manuelle, une étude de la littérature avait été faite devant ces objectifs RICOS non atteints. Il a été retrouvé des constats similaires (Auger et al. 2000 et Alvarez et al. 2005) avec des CV bien supérieurs à ceux de la table RICOS pour les valeurs faibles de mobilité (pouvant atteindre les 25-30% pour la mobilité totale et 35-40% pour la mobilité progressive) nécessitant donc de diminuer les objectifs pour ces valeurs basses. Le CASA quant à lui permet d'atteindre les objectifs RICOS la majorité du temps même pour des valeurs faibles de mobilité.

		FIDELITE INTERMEDIAIRE Mobilité progressive		
		CV (%)	Limite RICOS (%)	Conclusion
METHODE MANUELLE	Échantillon 1	8,2	7,6	Conforme (limites acceptables)
	Échantillon 2	14,1	7,6	Non conforme
	Échantillon 3	14,4	7,6	Non conforme
	Échantillon 4	28,1	7,6	Non conforme
	Échantillon 5	32,2	7,6	Non conforme
CASA	Échantillon 1	9,8	7,6	Non conforme
	Échantillon 2	6,6	7,6	Conforme
	Échantillon 3	6,0	7,6	Conforme

Tableau 26 *- Comparaison résultats de fidélité intermédiaire pour mobilité progressive entre méthode manuelle et CASA*

Pour l'évaluation de l'exactitude de la mobilité totale et progressive, les biais obtenus pour le CASA à partir des contrôles qualité interlaboratoires sont nettement plus satisfaisants que ceux obtenus à

partir d'EEQ pour la méthode manuelle. En effet, sur les 2 échantillons évaluant la mobilité totale en méthode manuelle, le biais du premier échantillon est conforme selon les limites RICOS acceptables et le biais du second échantillon est quant à lui conforme selon les limites RICOS souhaitables. Pour les 2 échantillons évaluant la mobilité progressive en méthode manuelle, le biais du premier échantillon est conforme selon les limites RICOS souhaitables et le biais du second échantillon est quant à lui non conforme. En comparaison, les biais obtenus pour la mobilité totale et progressive sur le CASA sont tous conformes selon les limites RICOS souhaitables. Cependant, une limite importante de ce contrôle qualité interlaboratoires est le faible effectif de laboratoires participants égal à 5 seulement en raison de la non compatibilité entre certaines versions de logiciel du même fournisseur (Hamilton Thorne) ou également avec les autres automates existants pour des raisons de compatibilité là encore (SCA® de Microptic, SQA-Vision de Medical Electronic Systems). Concernant la répétabilité de la mobilité totale et progressive, aucune évaluation n'a été effectuée pour la méthode manuelle en raison de la détérioration rapide de la mobilité dans le temps.
Nos résultats montrent donc que les performances du système CASA sont donc satisfaisantes ainsi que globalement comparables pour la concentration et nettement meilleures pour la mobilité en comparaison aux performances de la méthode manuelle.

Certaines études ont également étudié les performances du CASA et retrouvent aussi une fidélité et une exactitude satisfaisantes (Tomlinson et al. 2010 ; Lammers et al. 2014 ; Dearing et al. 2014). Tomlinson et al. (2010) retrouvent en effet de très bons CV de répétabilité allant de 1 à 5% pour des concentrations allant 14,16 à 108,33 millions/mL, ce qui est légèrement meilleur que nos résultats obtenus pour le CASA dans cette étude. Pour la mobilité, ils ont évalué le coefficient de corrélation intraclasse (CCIC) qui tient compte de la variabilité intra-opérateur et de la variabilité inter-opérateurs : CCIC = Variance inter-opérateurs/Variance totale, où variance totale est la somme des variances intra-opérateurs et inter-opérateurs. Il varie entre 0 et 1 : plus la variabilité intra-opérateur est faible par rapport à la variabilité inter-opérateurs, plus la corrélation intraclasse sera élevée (proche de 1). Le coefficient de corrélation intraclasse évaluant la répétabilité était égal à 0,93 pour la mobilité progressive et la mobilité non progressive et de 0,98 pour les immobiles. Ils ont également évalué la fidélité intermédiaire à partir des billes Accu-Beads aux concentrations de 23 et 46 millions/mL, les moyennes des différences étaient respectivement de 3,71% et 2,61% avec des coefficients de corrélation intraclasse de 0,97 et 0,94 (contre 0,94 et 0,99 pour la méthode manuelle).

Les incertitudes de mesure élargies pour la concentration restent proches de celles fournies par le fournisseur pour les CIQ Accu-Beads®. En effet, les incertitudes de mesure élargies du CASA sont de

1,5, 3,2 et 6,0 millions/mL pour des concentrations respectivement de 3,0, 18 et 35 millions/mL, de 2,2% et 6,1% pour des mobilités totales respectivement de 14% et 70% et de 2,2% et 8,1% pour des mobilités progressives respectivement de 11% et 63%. En comparaison, les incertitudes de mesure élargies de la méthode manuelle pour des niveaux comparables sont de 3,1, 5,9 et 10,9 millions/mL pour des concentrations respectivement de 3,6, 19,5 et 41,4 millions/mL. De même, les incertitudes de mesure élargies sont de 20,9% et 21,9% pour des mobilités totales respectivement de 16,7% et 64,0% et de 28,3% et 28,6% pour des mobilités progressives respectivement de 9,9% et 63%. Ainsi les incertitudes de mesure obtenues avec le CASA sont meilleures, en particulier concernant la mobilité spermatique. Cette incertitude doit faire l'objet d'une réévaluation régulière (périodicité annuelle recommandée).

Les performances du système CASA sont donc satisfaisantes, ce qui rejoint les données de la littérature.

B. La comparaison de méthode

Concernant la comparaison de méthode effectuée entre le CASA HT CEROS II et la méthode manuelle pour 60 patients, les droites de régression et les graphiques de Bland-Altman montrent respectivement une bonne corrélation et une bonne concordance entre les 2 méthodes pour la mesure de la concentration spermatique et la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes. La majorité des points sur les graphiques de Bland-Altman sont situés dans les limites d'agrément :

- Pour la concentration spermatique seulement 3 points sur les 60 échantillons (soit 5 %) sont en dehors des limites d'agrément (**Figure 25**) et aucun n'implique de changement dans l'interprétation clinique des résultats, ces différences n'étant constatées que pour des fortes concentrations (> 100 millions/mL).
- Pour la mobilité totale, 2 points sur les 60 échantillons (soit 3 %) sont en dehors des limites d'agrément (**Figure 27**), impliquant tous les deux une conséquence clinique car l'interprétation des résultats est modifiée. L'imprécision de ces 2 valeurs déviantes est due à la difficulté du CASA à détecter les spermatozoïdes mobiles sur place lorsque seul le flagelle est mobile et non la tête, et les identifie comme spermatozoïdes immobiles. Cela est à l'origine d'une sous-estimation de la mobilité non progressive et donc de la mobilité totale. En effet, les mobilités non progressives obtenues par la méthode manuelle étaient de 21% (comptage) et de 30% (estimation) concernant ces 2 patients. Cependant, la mobilité progressive est pathologique (inférieure à 32%) pour les 2 méthodes ce qui permet de relativiser cet impact sur l'interprétation. En effet, dans les 2 cas la mobilité des spermatozoïdes est pathologique puisque d'un côté la mobilité non progressive est

importante avec une mobilité progressive altérée et une mobilité totale normale (méthode manuelle) et de l'autre les mobilités totale et progressive sont altérées avec une mobilité non progressive peu importante (CASA). Ce potentiel défaut de distinction entre spermatozoïdes non progressifs et immobiles est un des arguments pour l'utilisation du CASA au secteur de spermiologie thérapeutique où le principal paramètre utilisé est le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs dans le capacitat.

- Enfin, pour la mobilité progressive, 5 échantillons sur les 60 (soit 8%) sont en dehors des limites d'agrément (**Figure 29**). Chacun de ces points déviants reste proche des limites et une seule des 5 valeurs (évaluée par comptage en méthode manuelle) implique une conséquence clinique. Pour cette valeur déviante, la mobilité spermatique en méthode manuelle était normale avec une mobilité totale à 40% avec une mobilité progressive de 40% et une mobilité non progressive nulle alors que sur le CASA, la mobilité totale était normale à 51% mais la mobilité progressive diminuée à 21% et une mobilité non progressive importante à 34%. Ainsi cet impact sur l'interprétation des résultats reste modéré avec une mobilité totale normale dans les deux cas. De plus, la mobilité en méthode manuelle a été évaluée par estimation ce qui implique une subjectivité importante et peut également expliquer la différence en termes de mobilité non progressive entre les deux méthodes. En effet, il existe un risque de sous-estimation de la mobilité non progressive en méthode manuelle par estimation car l'œil humain a tendance à être plus facilement attiré par les spermatozoïdes progressifs que les spermatozoïdes non progressifs. D'autre part, une autre explication à cette différence serait la concentration de cet échantillon : la concentration spermatique était à 65,8 millions/mL en méthode manuelle et 63,3 millions/mL avec le CASA. Or, cette concentration est supérieure à la limite supérieure de linéarité fournie par l'OMS à 50 millions/mL et cet échantillon aurait normalement dû être dilué. En effet, les collisions entre spermatozoïdes sont de plus en plus nombreuses lorsque la concentration augmente et cela a pour conséquence un risque d'erreur lors la reconstruction de la trajectoire des spermatozoïdes par fragmentation des trajectoires.

Concernant la comparaison du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs (millions/mL) entre les deux méthodes, on observe des limites d'agrément plus étroites que celles obtenues pour la comparaison de la concentration spermatique : [-50,1 ; 49,1] et [-73,4 ; 66,2] respectivement. Cela traduit des variations moins importantes. La moyenne des différences obtenue est également meilleure en étant plus proche de 0 : -0,5 et -3,6 millions/mL respectivement. De plus, les points sont globalement plus resserrés autour de la moyenne des différences. La comparabilité est donc plus favorable sur le paramètre « nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs », ce qui est un argument supplémentaire pour une utilisation du CASA au secteur de spermiologie thérapeutique.

D'autre part, ce paramètre permet de s'affranchir des interférences théoriques que sont les spermatozoïdes enroulés (immobiles) et le potentiel défaut de distinction entre spermatozoïdes non progressifs et immobiles. Ainsi, le CASA est adapté au secteur thérapeutique car le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs est le paramètre rendu et utile pour la suite de la prise en charge en aide médicale à la procréation.

Dans la comparaison de l'analyse de la concentration spermatique entre l'hémocytomètre (cellule de Malassez) de la méthode manuelle et la chambre de comptage utilisée pour le CASA, il est indispensable de garder à l'esprit que le volume analysé est différent entre les deux méthodes : la profondeur de l'hémocytomètre est de 100 µm alors que celle de la chambre de comptage est de 20 µm. Le volume de la chambre de comptage est donc moins représentatif de la totalité de l'échantillon, étant le 1/5ème du volume analysé par la méthode de référence (Bompart et al. 2018). Cela peut être à l'origine d'une sous-estimation de la concentration de spermatozoïdes de l'échantillon (Bompart et al. 2018). De plus, la mesure de la concentration à partir d'un aliquote quel que soit son volume provenant d'un échantillon est seulement une estimation de la concentration réelle de cet échantillon (Bompart et al. 2018).

D'autre part, il est important de noter que la méthode de référence pour la mobilité spermatique utilisée pour réaliser la comparaison de méthode est connue pour avoir une variabilité importante qu'elle soit intra ou inter-opérateurs (Auger et al. 2000). En effet, cette méthode consiste en l'évaluation subjective de la mobilité au microscope par un opérateur, qu'il soit novice ou expert. Par exemple, cela peut s'illustrer par la grande variabilité de la mobilité que l'on peut observer sur la **figure 43** ci-dessous représentant le diagramme de Youden de l'EEQ MOBILITE 2019-1 de Biologie Prospective.

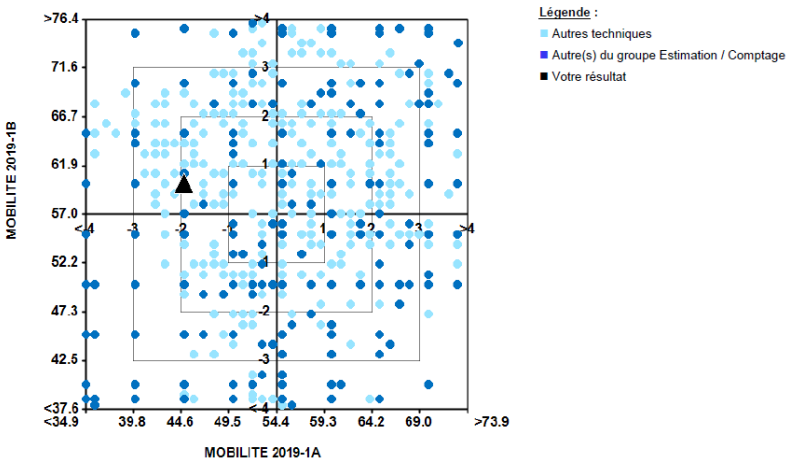


Figure 43 *- Diagramme de Youden de l'EEQ MOBILITE 2019-1 de Biologie Prospective (mobilité progressive)*

Plusieurs études comparatives ont été réalisées pour évaluer la corrélation des résultats entre les systèmes CASA et la méthode manuelle. Certaines de ces études ont observé une relation statistiquement significative des résultats entre CASA et méthode manuelle (Davis & Katz 1992 ; Centola 1996 ; Glenn Proctor et al. 2009 ; Tomlinson et al. 2010 ; Lammers et al. 2014 ; Dearing et al. 2014) alors que d'autres études démontrent l'existence de différences plus ou moins évidentes dans les résultats entre CASA et méthode manuelle et un manque de comparabilité (Neuwinger et al. 1990 ; Davis & Katz 1992 ; Spiropoulos 2001 ; Vested et al. 2011 ; Talarczyk-Desole et al. 2017). En général, la différence concernant les résultats de la concentration spermatique entre les deux méthodes était relativement faible. Pour l'analyse de la mobilité spermatique, les différences étaient principalement expliquées par une surestimation de la mobilité en méthode manuelle liée au fait que l'estimation dépend de la concentration, de la rapidité du balayage visuel de l'opérateur, de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes, de la tendance de l'œil humain à être attiré par les spermatozoïdes rapidement progressifs sous-estimant alors les mobiles sur place et les immobiles (Davis & Katz 1992 ; Tomlinson et al. 2010). D'autre part les résultats obtenus par les systèmes CASA étaient plus exacts et objectifs que ceux obtenus par la méthode manuelle (Garrett et al. 2003). La formation suffisante initiale et continue des opérateurs à l'utilisation du système CASA est également un élément important qui a été souligné par Talarczyk-Desole et son équipe en 2017. En effet, Cooper et Yeung en 2006 ont comparé les résultats de mobilité entre méthode manuelle et CASA sur une période de 43 mois et ont observé que les résultats devenaient de plus en plus comparables avec le temps.

La méthode CASA a su démontrer, en plus de ses bonnes performances, sa concordance avec la méthode manuelle permettant alors son utilisation en routine pour l'analyse des paramètres spermatiques.

II. ETUDES SECONDAIRES

A. Les dilutions

L'analyse statistique des données permettant la comparaison des moyennes des différences en concentration (en %) entre CASA et méthode manuelle pour les 3 dilutions étudiées a retrouvé une différence statistiquement significative entre la dilution 1/10ème par rapport aux 2 autres dilutions 1/20ème et 1/40ème sachant que la dilution 1/10ème présentait la moyenne des différences la plus faible (-20,0% versus -24,0 et 25,5% respectivement). Ainsi, ces résultats démontrent que la dilution au 1/10ème pour toute concentration supérieure à 50 millions/mL est la plus adéquate car elle présente la perte de précision la moins importante et de manière significative par rapport aux 2 autres

dilutions 1/20ème et 1/40ème ainsi que l'avantage non négligeable de minimiser le nombre de champs nécessaire pour atteindre l'effectif minimum de 200 spermatozoïdes comptabilisés selon les recommandations de l'OMS.

B. Exigences selon son application en routine : spermiologie thérapeutique

Pour les 10 patients analysés, le CASA a su démontrer son efficacité pour obtenir avec précision une concentration spermatique finale du capacitat pour FIV ou ICSI satisfaisante car comprise dans les limites acceptables fixées par le laboratoire de 8 à 12 millions/mL et cela grâce à une seule dilution. A partir de ces résultats, un protocole de dilution pour la préparation des capacitats a été établi (**tableau 27**).

Concentration avant dilution	Dilution (avec n = chiffre dizaine de la concentration)
Chiffre unité 0-4	1/(n - 0,25)
Chiffre unité 5-8	1/(n)
Chiffre unité ≥ 9	1/(n + 1)

Tableau 27 *– Protocole pour déterminer la dilution selon la concentration avant dilution*

Dans un second temps ces résultats ont permis de réfléchir à l'apport de la précision du CASA pour le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs par microlitre nécessaire afin de déterminer la quantité exacte de capacitat pour la FIV conventionnelle.

Un taux de fécondation satisfaisant en FIV conventionnelle doit être supérieur ou égal à 50%. De plus, pour une fécondation optimale lors d'une FIV conventionnelle le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs inséminés dans la goutte contenant l'ovocyte doit être compris entre 6500 et 10000. Ce nombre de spermatozoïdes est obtenu à partir de la concentration de spermatozoïdes mobiles progressifs dans le capacitat et le volume de capacitat inséminé dans la goutte contenant l'ovocyte. Ce volume est en général de 1 µL mais peut être ajusté si besoin par le technicien lors de l'insémination de la FIV si la concentration du capacitat n'est pas optimale pour assurer la présence en nombre satisfaisant de spermatozoïdes mobiles progressifs.

Pour ces 4 patients, le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs (« ab ») par microlitre a été calculé à partir de la concentration (obtenue après dilution) et du pourcentage de mobilité progressive pour la méthode manuelle et pour le CASA (**Tableau 28**). Pour les patients 2 et 5, ce nombre était respectivement de 6111 et 5290 pour le CASA versus 8500 et 8000 pour la méthode manuelle. Les taux de fécondation obtenus pour ces 2 patients sont non satisfaisants avec respectivement 44% et 33%, ce qui est cohérent avec les chiffres du CASA (< 6500 spermatozoïdes mobiles progressifs/µL) et non ceux de la méthode manuelle (> 6500 spermatozoïdes mobiles

progressifs/µL). Pour les patients 7 et 10, le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs par microlitre selon le CASA était respectivement de 10259 et 8541 versus 9000 et 10800 pour la méthode manuelle. Les taux de fécondation obtenus pour ces 2 patients sont satisfaisants avec respectivement 66% et 50%, ce qui est cohérent avec les chiffres du CASA et de la méthode manuelle (> 6500 spermatozoïdes mobiles progressifs/µL). On retrouve donc pour ces 4 patients une cohérence du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs par microlitre obtenu grâce au CASA avec les taux de fécondation des FIV conventionnelles, que l'on ne retrouve pas avec la méthode manuelle.

N° patient	Technique	CASA Nombre de spermatozoïdes "ab"/µL	Manuelle Nombre de spermatozoïdes "ab"/µL	FIV : Taux fécondation (%)
2	FIV	6111	8500	44% (4/9)
5	FIV	5290	8000	33% (1/3)
7	FIV	10259	9000	66% (2/3)
10	FIV	8541	10800	50% (6/12)

Tableau 28 *- Comparaison du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs ("ab") par microlitre obtenu par le CASA et par la méthode manuelle par rapport au taux de fécondation pour les FIV conventionnelles*

Ces résultats sont à interpréter avec prudence d'une part en raison d'une faible puissance (effectif insuffisant : 4 patients) et d'autre part du fait de l'existence d'autres facteurs ayant pu influencer sur le taux de fécondation (maturité ovocytaire, qualité des gamètes, …).

Toutefois, ces premiers résultats montrent que cette étude mérite d'être poursuivie avec un nombre plus important de patients. Cela pourrait être un argument fort du bénéfice apporté par le CASA en FIV à travers une meilleure précision des résultats des paramètres spermatiques en comparaison à la méthode manuelle subjective :

- D'une part dans le choix de la technique entre FIV conventionnelle et ICSI,
- D'autre part dans le choix de la quantité de capacitat pour la FIV conventionnelle.

III. AVANTAGES DU CASA

Les avantages de la méthode CASA sont une meilleure réponse aux exigences qualité du COFRAC grâce à une standardisation et une objectivité des résultats ainsi qu'une meilleure précision en comparaison à une méthode manuelle subjective et d'une forte variabilité.

De plus, cette méthode est plus rapide en permettant l'analyse simultanée de la concentration et de la mobilité spermatique. Une traçabilité améliorée des résultats est possible grâce à l'enregistrement informatique des résultats ainsi que des séquences vidéo correspondantes pouvant être réanalysées à distance, ce qui n'est pas possible avec la méthode manuelle en raison de l'impossibilité de

renouveler l'analyse d'un échantillon de sperme frais au-delà d'une heure suivant le recueil. Une partie de la méthode étant automatisée, cela permet de réduire les erreurs d'origine humaine mais aussi de simplifier la formation des techniciens.

Le système CASA a également un rôle majeur dans la démarche qualité à travers la création de CIQ, EEQ ou encore CQIL (contrôle qualité interlaboratoires) grâce à la possibilité de générer des séquences vidéo de tout type de profil de sperme. Cela permet d'ailleurs une comparaison entre laboratoires beaucoup plus simple par l'envoi de vidéos. En effet, ces vidéos enregistrées grâce au CASA ont l'avantage de permettre l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes devant l'absence actuelle de CIQ pour la mobilité et l'absence d'EEQ. Tous ces différents avantages ont été évoqués dans plusieurs études (Tomlinson et al. 2010 ; Lammers et al. 2014 ; Dearing et al. 2014).

Cela illustre l'apport positif de l'utilisation d'un système CASA en routine pour la mesure de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes.

IV. LIMITES DU CASA

A. Facteurs influençant les performances du CASA

Plusieurs facteurs affectent les performances des systèmes CASA tels que la préparation de l'échantillon, la viscosité, la profondeur de la chambre de comptage, la fréquence d'acquisition d'images et la concentration spermatique (Davis & Katz 1992 ; Mortimer 1995 ; Kraemer et al. 1998).

La préparation de l'échantillon (principalement l'homogénéisation à la pipette) et la viscosité peuvent influer sur l'homogénéité du sperme et donc la mesure de la concentration spermatique. Le suivi du mode opératoire permet de contrôler l'influence de ces facteurs.

Concernant la fréquence d'acquisition, celle-ci dépend principalement de la qualité de la caméra vidéo et du paramétrage du logiciel (Mortimer et al. 2000). Sa valeur a un effet direct sur la trajectoire du mouvement du spermatozoïde, ce qui peut par la suite influer sur les paramètres cinétiques (Lu et al. 2014 ; Boryshpolets et al. 2013). Il est également décrit que les catégories de mobilité « a » et « b » peuvent être analysées correctement par les systèmes CASA commercialisés avec des fréquences d'acquisition de 30-60 Hz alors qu'une évaluation précise de la catégorie « c » nécessite une fréquence plus élevée (Lu et al. 2014). De plus, la distinction des catégories de mobilité « a » et « b » ne fait plus partie des recommandations de l'OMS car l'œil humain n'est pas capable de les différencier. Le CASA pourra peut-être à l'avenir faire renaitre l'utilité de ces deux catégories de

mobilité. Il est actuellement admis que les systèmes CASA avec une fréquence de 60 Hz peuvent satisfaire aux exigences d'analyse des paramètres cinétiques du spermatozoïde humain (Lu et al. 2014).

Pour ce qui est de la profondeur de la chambre de comptage, les résultats des paramètres spermatiques obtenus par les systèmes CASA peuvent être affectés en raison de la grande variabilité des résultats entre les différentes chambres de comptage (Hu et al. 2006), selon la profondeur de chambre également (Le Lannou et al. 1992). L'analyse de l'hyperactivation des spermatozoïdes nécessite en effet une profondeur de 20 µm au minimum (Le Lannou et al. 1992). Selon Mortimer et al (2000), la profondeur de 20 µm affecte tout de même le mouvement du flagelle, qui nécessiterait au minimum une profondeur de 30 µm. Cependant, la netteté de l'image du spermatozoïde est affectée à cette profondeur, le spermatozoïde se trouvant sur plusieurs niveaux. De plus, il a été montré que l'effet Segré-Silberberg peut être à l'origine d'une sous-estimation de la concentration jusqu'à 30% par rapport à un liquide aqueux, effet dépendant de la viscosité du sperme (Douglas-Hamilton et al. 2005b).

La mesure de la concentration spermatique par les systèmes CASA a un impact sur la précision de la mesure de la mobilité et des paramètres cinétiques. En effet, cela est dû à la fréquence des collisions entre spermatozoïdes augmentant avec la concentration et influe alors sur la précision de la reconstruction de la trajectoire de chaque spermatozoïde affectant par conséquence les paramètres cinétiques et possiblement la catégorie de mobilité (Lu et al. 2014). On peut cependant nuancer cette perte de précision par l'impact négligeable de la précision des concentrations élevées sur l'interprétation des résultats et la prise en charge en aide médicale à la procréation.

De plus, d'autres facteurs interviennent lors de l'analyse de l'image et peuvent être à l'origine d'erreurs dans la discrimination entre spermatozoïde et autres « objets » non spermatiques ou entre spermatozoïdes mobiles et immobiles (Mortimer et al. 2015) :

- Agrégats/agglutinats : lorsque les spermatozoïdes sont agrégés entre eux, mobiles ou non, ou avec des débris, cela résulte en une non prise en compte lors de l'analyse de l'image car les spermatozoïdes ne sont pas assez individualisés pour être détectés et la taille de l'agrégat est trop grande pour être classifié comme une tête spermatique. Cela entraîne une sous-estimation de la concentration et surestimation de la mobilité progressive, les spermatozoïdes étant typiquement immobiles dans ce cas voire mobiles non progressifs. Malheureusement, ces agrégats/agglutinats sont très fréquents dans les échantillons de

sperme humain. Cependant, ce facteur a tout autant d'impact lors de l'analyse par la méthode manuelle.

- Erreur d'identification des débris ou cellules rondes comme étant des spermatozoïdes, surtout lorsque le CASA utilise un contraste de phase négatif (fond noir), surestimant alors la concentration spermatique. Le système CASA installé au laboratoire du CHU de Grenoble limite ces erreurs en utilisant la présence d'un flagelle dans l'algorithme de détection et d'identification des spermatozoïdes (Manuel fournisseur HT).
- Les spermatozoïdes immobiles voire même les débris ayant la taille appropriée (similaire à une tête spermatique) peuvent être mis en mouvement suite au contact avec un flagelle mobile d'un spermatozoïde adjacent, à l'origine d'une classification à tort d'un spermatozoïde immobile en spermatozoïde mobile ou d'un débris en spermatozoïde mobile. Cela peut surestimer la mobilité (spermatozoïde immobile) ou le nombre total de spermatozoïdes (débris) respectivement.
- L'existence de collisions entre spermatozoïdes mobiles peut être à l'origine d'une fragmentation des trajectoires, entraînant alors une surestimation de la concentration et la proportion de spermatozoïdes mobiles et mobiles progressifs. Malgré l'existence d'algorithmes intelligents de correction des collisions, ce phénomène peut persister et perturber les trajectoires et par conséquent les valeurs cinétiques correspondantes.

La présence de spermatozoïdes enroulés a été identifiée dans notre étude comme une interférence potentielle pouvant être à l'origine théoriquement d'une sous-estimation de la concentration et une surestimation de la mobilité : notre étude retrouve une légère sous-estimation de la concentration et l'absence de surestimation (ou sous-estimation) de la mobilité. Une valeur seuil de pourcentage d'enroulés a ensuite été recherchée dans l'objectif d'associer un commentaire aux résultats dont ce pourcentage dépasse cette valeur seuil qui préviendrait du risque de sous-estimation de la concentration et de surestimation de la mobilité. Cependant, cette valeur seuil n'a pas été mise en évidence ni pour la concentration ni pour la mobilité malgré une tendance observée à la sous-estimation de la concentration par le CASA lorsque le pourcentage d'enroulés augmente.

A noter, il existe deux types d'enroulés : le premier possède son flagelle enroulé autour de la tête et le second présente un flagelle enroulé en dehors de la tête. Le premier type d'enroulé n'est pas détecté par le CASA, le flagelle étant confondu avec la tête. En effet, la détection du spermatozoïde par le CASA nécessite la présence de la tête mais aussi du flagelle. En revanche, le deuxième type d'enroulé peut être détecté par le CASA si le flagelle reste identifiable malgré qu'il soit enroulé. Etant donné que la classification de David ne fait pas la distinction entre ces deux types d'enroulés, cela

peut expliquer pourquoi nous n'avons pas trouvé de lien entre le pourcentage de spermatozoïdes enroulés et les paramètres étudiés (concentration et mobilité).

Le contrôle visuel de l'opérateur sur l'écran lors de la capture apparait comme essentiel comme moyen de maîtrise : cela permet la détection de ces interférences puis leur prise en compte dans l'interprétation des résultats par le biologiste. Dans les cas où l'impact sur les résultats a une conséquence sur l'interprétation, un contrôle par la méthode manuelle est possible. Une solution future serait également la possibilité de pouvoir identifier manuellement les spermatozoïdes enroulés sur le logiciel et les intégrer dans le compte des spermatozoïdes.

L'influence de la présence de cellules rondes sur l'analyse de la concentration spermatique a été évaluée. Les premières générations de systèmes CASA avaient des difficultés à distinguer les spermatozoïdes des débris ou cellules rondes pouvant impacter sur la mesure de la concentration des spermatozoïdes (ESHRE 1998 ; Zinaman et al, 1996). Notre étude réalisée sur 5 patients avec une concentration en cellules rondes supérieure à 1 million/mL a montré que ces cellules rondes n'ont pas entraîné une surestimation de la concentration des spermatozoïdes. D'autre part, on peut noter grâce au contrôle visuel par l'opérateur sur le logiciel que les cellules rondes contenues dans ces 5 échantillons n'étaient effectivement pas identifiées comme spermatozoïde (**Figure 44**), ce qui justifie l'analyse de seulement 5 patients. La **figure 44** ci-dessous illustre l'absence de détection des cellules rondes comme spermatozoïdes : si elles avaient été identifiées il y aurait un point rouge sur la cellule (code couleur du logiciel pour les spermatozoïdes immobiles).

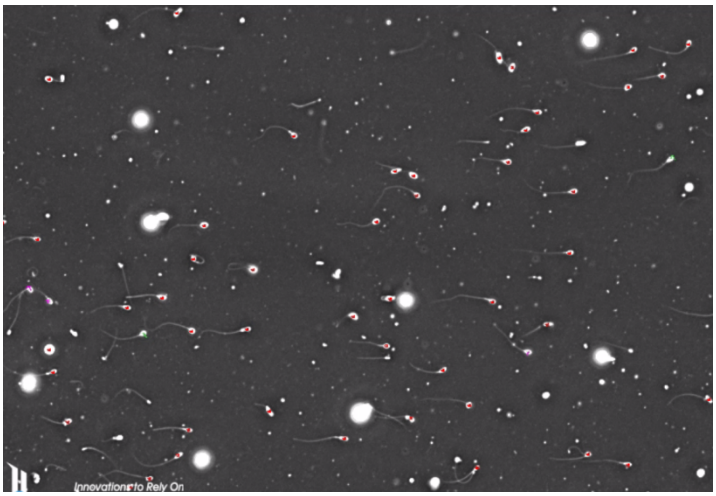


Figure 44 *- Capture d'écran du logiciel CASA avec présence de cellules rondes*

D'autre part, concernant le modèle de CASA acquis au CHU de Grenoble, les modules supplémentaires de vitalité et morphologie ne sont pas installés et les systèmes CASA ne permettent pas la mesure de la concentration en cellules rondes. Cela peut apparaitre comme des limites

potentielles selon le secteur choisi pour son utilisation (spermiologie diagnostique ou thérapeutique) et les exigences attendues correspondantes.

B. Les contrôles qualité et leurs limites

Comme pour toute analyse en biologie médicale, les recommandations de l'ESHRE en 1998 soulignent la nécessité de l'existence de contrôles qualité internes et externes pour tout système CASA.

Les contrôles qualité disponibles pour la méthode de mesure de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes par le système CASA au sein du laboratoire sont :

- Un contrôle interne de qualité : Accubeads® (Hamilton Thorne)
- Une comparaison interlaboratoires mise en place par le laboratoire : envoi de vidéos

a. CIQ et commutabilité

Les CIQ Accu-Beads® correspondent à une suspension de billes de latex de la taille d'une tête de spermatozoïde commercialisées par Hamilton Thorne (Accu-Beads®) à trois niveaux de concentration spermatozoïde à trois niveaux de concentration connue (3, 18 et 35 millions/mL). Les billes sont dans un milieu contenant des protéines afin de recréer l'environnement des spermatozoïdes : le plasma séminal.

Parmi les exigences de la norme concernant les CIQ, une notion importante abordée est celle de la commutabilité. En effet, il est recommandé que les échantillons de contrôle aient un comportement le plus proche possible de celui des échantillons de patients, voire identique (SH GTA 06). Dans un premier temps, des contrôles qualité à partir de sperme humain ont été testés mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats fiables pour un usage quotidien sur le système CASA (Johnson et al. 2003). Dans ce contexte, plusieurs études (Zuvela et al. 2011 ; Vernon et al. 2013) ont donc évalué la précision et l'exactitude de ces billes de latex Accu-Beads® et ainsi déterminer la pertinence de leur utilisation en tant que contrôles qualité (CIQ et EEQ). Ces études ont montré que l'utilisation de suspension de billes de latex (Accu-Beads®) à une concentration définie en tant que substitut au sperme est un excellent outil dans le cadre des CIQ et programme d'EEQ en permettant une évaluation objective à la fois de l'opérateur et de l'équipement. En effet, les billes de latex Accu-Beads® remplissent les critères d'un bon matériel de contrôle qualité (Vernon et al. 2013) :

- Caractéristiques similaires du matériel à celles de l'échantillon patient en question : taille des billes (4 µm de diamètre) similaire à celle d'une tête de spermatozoïde (Johnson et al. 2003),
- Disponibilité en grande quantité pour permettre une évaluation sur une longue période,

- Concentrations représentatives des valeurs normales et/ou des seuils cliniques d'interprétation : 3 niveaux de concentrations connues avec 3 millions/mL (proche de la limite de quantification de 2 millions/mL (OMS, 2010)), 18 millions/mL (proche de la valeur normale de 15 millions/mL (OMS, 2010)) et 35 millions/mL (proche de la limite supérieure de linéarité de 50 millions/mL (OMS, 2010)),
- Précision (similarité de la concentration d'une goutte à une autre goutte, d'un vial à un autre vial) (Zuvela et al. 2011 ; Vernon et al. 2013),
- Stabilité sur une longue période, stockage à température ambiante.

Concernant l'utilisation des billes Accu-Beads®, il est important de bien homogénéiser le vial avant de prélever un aliquot pour analyse afin d'obtenir des résultats reproductibles ainsi que de bien refermer le vial pour prévenir l'évaporation pouvant être à l'origine d'une fausse augmentation de la concentration en billes de latex (Vernon et al. 2013).
Des erreurs de mesure dues à l'intervention du technicien lors de l'analyse peuvent survenir à plusieurs niveaux : homogénéisation, dilution, pipetage, chargement de l'échantillon dans la chambre de comptage, utilisation du logiciel (capture des champs, …) (Alvarez et al. 2005 ; Keel et al. 2000). Dans ce contexte, l'utilisation de ces billes Accu-Beads® permet la formation initiale et continue des techniciens à travers la détection des dérives ou erreurs de manipulation notamment. Cela permet de s'assurer de la réalisation correcte de l'analyse par le technicien mais aussi une harmonisation des pratiques entre techniciens (Vernon et al. 2013).

Par ailleurs, les billes de latex Accu-Beads® ont également démontré d'autres avantages tels que (Zuvela et al. 2011) :

- La comparaison de l'exactitude de différentes chambres de comptage (Seaman et al. 1996) et l'identification des sources d'erreur liées aux chambres de comptage.
- Concernant les EEQ, le calcul du biais à partir d'une valeur cible connue et non de la moyenne des participants.

Toutefois, ces billes Accu-Beads® présentent plusieurs inconvénients :

- L'absence d'évaluation de la mobilité (Vernon et al. 2013)
- Et une commutabilité non optimale. En effet, les billes de latex schématisent uniquement la tête des spermatozoïdes et non leur flagelle, alors que leur présence est intégrée dans les critères pour l'identification du spermatozoïde par le CASA.
    - Cela implique que le CIQ n'évalue pas la distinction entre spermatozoïde et débris/cellules rondes : cependant lors de la recherche d'interférences potentielles

pour cette validation de méthode, il a été montré que les cellules rondes n'ont pas d'impact sur l'analyse de la concentration par le CASA car elles ne sont pas identifiées par le logiciel comme spermatozoïde.

- Néanmoins, il persiste tout de même l'absence de distinction entre spermatozoïde non enroulé et spermatozoïde enroulé : en effet le type d'enroulés non détecté par le CASA est celui ayant le flagelle enroulé autour de la tête, flagelle qui devient alors indétectable par le logiciel.

b. Limites du CQIL

Aucun organisateur ne proposant d'évaluation externe de qualité comme moyen de comparaison pour cette analyse, une comparaison interlaboratoires a été mise en place par le laboratoire de Grenoble grâce à l'envoi de séquences vidéos à d'autres laboratoires en France possédant un système CASA compatible avec le format de vidéos. L'utilisation de vidéos a l'avantage de permettre l'analyse de la concentration ainsi que de la mobilité des spermatozoïdes. Cette démarche a permis de compenser l'absence de CIQ pour la mobilité et l'absence d'EEQ à ce jour en fournissant une évaluation de l'exactitude de la méthode. En effet, l'un des avantages du système CASA est de pouvoir enregistrer des séquences vidéo d'échantillons de sperme pouvant être utilisées comme support en tant que contrôle de qualité, notamment pour l'évaluation de la mobilité.

Cependant, des inconvénients persistent : cela ne permet pas d'évaluer la phase pré-analytique ainsi qu'une partie de la phase analytique ainsi que la capture des champs par l'opérateur. En effet, cela n'évalue pas l'étape d'homogénéisation de l'éjaculat après liquéfaction suffisante, la gestion d'une viscosité importante ou encore l'insertion correctement réalisée de l'échantillon de sperme par capillarité dans la chambre de comptage : tous ces facteurs peuvent en effet avoir un impact sur l'analyse des paramètres spermatiques en raison d'une mauvaise répartition des spermatozoïdes dans la chambre (non homogène). Le type de lames de comptage utilisées et leur profondeur de chambre ne sont pas non plus considérés lors de ces vidéos : il s'agit pourtant de facteurs importants à travers notamment la profondeur qui doit permettre un équilibre entre le focus adéquat et l'espace nécessaire au mouvement flagellaire du spermatozoïde. De plus, la capture des champs par l'opérateur n'est également pas prise en compte. En effet, des recommandations quant à cette capture sont fournies par l'OMS et doivent être respectées : 2 chambres analysées par patient ainsi que 6 champs minimum par chambre et 200 spermatozoïdes par chambre. En plus du nombre minimum de champs à analyser, la localisation des champs est tout aussi importante : ils doivent être à différentes distances du site de dépôt de l'échantillon dans la chambre (appelé point d'entrée), et principalement le long de l'axe central formé par les point d'entrée et point de sortie de la lame

(Amann et Waberski 2014), car la distribution des spermatozoïdes dans la chambre n'est pas homogène (Douglas-Hamilton et al. 2005a). Cela permet ainsi de s'assurer que l'estimation des paramètres spermatiques soit la plus représentative possible des valeurs réelles de l'échantillon. Une autre limite de ce CQIL est le faible effectif de laboratoires participants égal à 5 en raison d'une part du nombre limité de laboratoires équipés d'un système CASA en France mais aussi en raison d'un problème de compatibilité entre les différentes versions de logiciel des systèmes CASA du même fournisseur (Hamilton Thorne) ainsi qu'avec les automates d'autres fournisseurs (SCA® de Microptic, SQA-Vision de Medical Electronic Systems).

V. EXIGENCES ATTENDUES

Le système CASA HT CEROS II Clinical® acquis par le laboratoire a pour objectif son application en routine dans le secteur de spermiologie thérapeutique. Seule la mesure de la concentration et de la mobilité spermatiques sont réalisées, contrairement au secteur diagnostique où la vitalité, la morphologie, la recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (MAR-Test) et la concentration en cellules rondes sont également nécessaires. De plus, les capacitats obtenus après préparation de sperme (gradient de densité) sont typiquement peu visqueux, avec une concentration faible en cellules rondes et débris et une mobilité spermatique importante (Mortimer et al. 2015) : cela constitue ainsi des échantillons de prédilection au vu des performances mais aussi des limites du système CASA qui ont été évoquées. En effet, la viscosité peut être à l'origine d'une difficulté lors de l'insertion du prélèvement dans la chambre de comptage mais aussi avoir un impact sur l'homogénéité de l'échantillon. La concentration faible en cellules rondes et en débris permet de limiter leur détection comme spermatozoïde lorsqu'ils sont de taille et d'apparence similaires à la tête spermatique. Toutefois, il a été montré dans cette étude que la présence de cellules rondes n'impacte pas la mesure de la concentration et par conséquent de la mobilité. Enfin, une mobilité spermatique importante permet de limiter la perte de précision que le CASA pourrait présenter pour des valeurs faibles de mobilité spermatique (cf les 2 échantillons évaluant respectivement la répétabilité et la fidélité intermédiaire de la mobilité progressive non conformes). L'évaluation de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes étant jusqu'alors réalisée par une simple estimation au microscope par un opérateur dans le secteur de spermiologie thérapeutique du laboratoire, l'apport de la précision des résultats par le CASA est considérable.

La précision des résultats de concentration et de mobilité apportée par le système CASA est une amélioration majeure d'une part à travers la facilité technique apportée par le CASA pour cibler plus précisément la concentration finale du capacitat en une seule dilution pour la FIV conventionnelle et

d'autre part pour le calcul du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs dans le capacitat, ce nombre intervenant comme un seuil décisionnel dans le choix de prise en charge en aide médicale à la procréation. En effet, une insémination intra-utérine est réalisable si ce nombre est strictement supérieur à 1 million de spermatozoïdes mobiles progressifs dans le capacitat, dans l'idéal supérieur à 2 millions. Cette amélioration de la précision des résultats est également importante dans le cadre de la FIV conventionnelle à travers un calcul précis du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs à inséminer en goutte avec chaque ovocyte. Ce chiffre peut en effet constituer un élément explicatif lors d'un défaut de fécondation : une quantité insuffisante de spermatozoïdes mobiles progressifs peut expliquer un défaut de fécondation et à l'inverse, une quantité suffisante fera rechercher une autre cause à ce défaut de fécondation.

De plus, on peut citer l'analyse des paramètres cinétiques qui pourrait être un outil supplémentaire dans le cadre de la FIV conventionnelle notamment grâce à la possibilité d'étudier l'hyperactivation des spermatozoïdes, élément essentiel à la fécondation. Certains centres utilisent des cut-off de paramètres cinétiques pour le choix de technique entre FIV conventionnelle et ICSI.

Ainsi, ce système convient aux exigences attendues en vue de son utilisation avec un apport considérable par rapport à la méthode manuelle utilisée jusqu'ici à travers une standardisation et une haute précision des résultats, une amélioration de la variabilité inter-opérateurs.

VI. GESTION DES RISQUES

Plusieurs facteurs pouvant être des sources d'erreur dans l'analyse des paramètres spermatiques ont été identifiés dans ce travail ainsi que d'autres facteurs reconnus dans la littérature ont été cités. Une bonne maîtrise des risques est donc nécessaire pour garantir des résultats de qualité malgré l'existence de ces facteurs. En effet, des résultats précis peuvent être obtenus lorsque des procédures appropriées sont respectées avec notamment l'importance des paramétrages du CASA et le suivi des recommandations d'utilisation (Davis & Katz 1992 ; Mortimer 1994b ; ESHRE 1998).

A. Principe de la gestion des risques

Pour respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit tout mettre en œuvre pour réduire et/ou éliminer les risques potentiels identifiés. Les risques potentiels dans un laboratoire de biologie médicale sont de fournir des résultats erronés, trop tardifs, inexacts ou accompagnés d'une interprétation inappropriée pouvant avoir un impact sur le diagnostic ou le traitement médical (SH GTA 04).

La gestion des risques comporte plusieurs étapes (SH GTA 04) :

- L'identification des risques potentiels
- L'estimation du risque (gravité, fréquence, détectabilité) selon l'échelle de criticité définie selon la procédure du laboratoire de Grenoble (GES.FTE.001)
- La maîtrise du risque grâce au développement de moyens de maîtrise

Les risques potentiels peuvent être identifiés soit à partir des analyses de tendance (contrôles de qualité interne, …), soit à partir de l'étude minutieuse des processus en mettant en évidence les étapes sensibles lors de leur réalisation (SH GTA 04).
L'estimation du risque permet de hiérarchiser / prioriser les actions de maîtrise à mettre en place. Une échelle de criticité pourra alors être établie en tenant compte notamment de la fréquence, de la gravité et de la détectabilité des évènements indésirables afin de les maîtriser. Le laboratoire s'appuiera sur des actions préventives destinées à les réduire ou à les éliminer.

La maîtrise des risques dans le cadre de la vérification / validation de méthodes consistera alors à identifier les critères de qualité de la méthode et les étapes critiques de la phase analytique à maîtriser. Cette analyse de risque peut s'effectuer selon la méthode 5M qui consiste à identifier tous les points critiques selon cinq aspects différents :

- La matière : sperme frais, sperme congelé, capacitat
- Le milieu : l'environnement (agencement, température…)
- Le matériel :
    - Equipement (CASA, lames de comptage, pipettes) : respect des modes opératoires et instructions fournisseur, maintenance, étalonnage, raccordement métrologique
    - Réactifs (cryoprotecteur pour le sperme congelé, réactifs nécessaires à la préparation des gradients de densité pour les capacitats) : préparation, variations lot à lot et stabilité
- La méthode : critères de performance et limites de la méthode, les causes d'incertitude de mesure
- La main d'œuvre : la formation et l'évaluation des compétences du personnel

B. Les risques identifiés et leur moyen de maîtrise

Les principaux risques potentiels identifiés lors de cette analyse de risque pouvant avoir une influence significative sur les résultats sont l'identitovigilance, l'inhomogénéité, le délai de prise en charge, la dilution, les interférences (spermatozoïdes enroulés), le matériel (pipette, chambre de comptage), le milieu (étuves, réactifs) et les dérives de l'analyseur. Ces risques sont maîtrisés grâce à

une formation adéquate du personnel (pré-analytique et analytique), l'existence de procédures techniques et modes opératoires respectés par l'opérateur, le suivi métrologique, l'entretien et maintenance du matériel et la surveillance des dérives grâce aux contrôles qualité. Les tableaux correspondants de la maîtrise des risques pour la concentration et la mobilité des spermatozoïdes sont disponibles en annexe (**Tableau 1** et **Tableau 2**).

VII. PERSPECTIVES ET APPLICATIONS

A. Perspectives

a. Amélioration des nouveaux systèmes

L'état de l'art des systèmes CASA a considérablement progressé ces deux dernières décennies notamment avec la disparition des « boites noires », ce qui a permis la visibilité voire la modification des paramétrages du système.

En effet, les avancées technologiques ont permis l'amélioration du fonctionnement et de la précision des résultats telles qu'une meilleure résolution d'images des numériseurs, une amélioration du système microscopique, une plus grande puissance du matériel informatique combinée à de nouvelles fonctionnalités des logiciels comme le contrôle de l'illumination interactif et/ou automatique, le filtre avancé du mouvement Brownien (permet d'éliminer le mouvement Brownien, mouvement aléatoire de toute particule en suspension dans un fluide), le filtre de dérive (permet de contrecarrer l'effet du mouvement de dérive de l'échantillon mais aussi empêcher la détection comme étant mobile d'un spermatozoïde immobile mis en mouvement suite à une collision avec un autre spermatozoïde mobile), la détection du flagelle, le repérage intelligent des collisions, le lissage adaptatif pour obtenir la trajectoire moyenne et l'introduction de la dimension fractale comme valeur cinétique (Mortimer et al. 2015 ; Daloglu & Ozcan, 2017).

Certains systèmes CASA tels que le IVOS-II (Hamilton Thorne®) et le SCA-6 (Microptics®) par exemple permettent l'analyse de ces paramètres cités ci-dessus. On peut supposer que leur intégration beaucoup plus large dans les laboratoires en routine pourrait permettre un nouvel apport dans la prise en charge en aide médicale à la procréation, encore peu développé à ce jour. Cela permettrait alors de mieux définir la qualité de l'échantillon de sperme quantitativement et objectivement, basé sur des tests de capacités fonctionnelles du sperme qui pourront être complètement automatisés (Mortimer et al. 2015).

Il est possible d'espérer encore mieux avec certains systèmes CASA qui utilisent des sondes fluorescentes permettant la détection des spermatozoïdes grâce à leur noyau hautement condensé. Le principe est basé sur la coloration du noyau du spermatozoïde par un fluorochrome spécifique de l'ADN, améliorant ainsi la distinction des spermatozoïdes par rapport aux débris cellulaires et permettant une mesure de la concentration spermatique plus précise (Zinaman et al. 1996). Cependant, notre CASA ne possède pas ce système de sondes fluorescentes.

b. Le SQA

En comparaison aux systèmes CASA qui requièrent toujours l'intervention d'un opérateur dans l'analyse des paramètres spermatiques, Amann & Katz (2004) décrivent le système CASA idéal : il aurait besoin d'un opérateur seulement pour le maintien du bon fonctionnement du système, placer l'échantillon de sperme dans l'appareil, lancer l'analyse et ensuite interpréter directement les résultats. Finalement cette description semble correspondre au SQA (Sperm Quality Analysers). Contrairement aux systèmes CASA basés sur l'analyse d'images, le principe d'analyse du SQA repose sur la détection de signaux électro-optiques générés par le mouvement des spermatozoïdes puis sont interprétés par des algorithmes (Lammers et al. 2014). Il s'agit d'un automate simple d'utilisation combinant la détection optique ainsi qu'un ordinateur intégré permettant l'interprétation des signaux (Akashi et al. 2005).

Plusieurs études comparatives ont été réalisées pour évaluer la corrélation des résultats entre le SQA (différentes versions selon les études : SQA IIB, IIC SQA-V Gold ou SQA Vision) et la méthode manuelle (Suzuki et al. 2002 ; Akashi et al. 2005 ; Fuse et al. 2005 ; Agarwal & Sharma. 2007 ; Lammers et al. 2014 ; Engel et al. 2019). Une corrélation significative a été retrouvée entre le SQA et la méthode manuelle pour la concentration spermatique (Akashi et al. 2005 ; Fuse et al. 2005 ; Agarwal et Sharma 2007 ; Lammers et al. 2014), la mobilité (Akashi et al. 2005 ; Fuse et al. 2005 ; Agarwal et Sharma 2007 ; Lammers et al. 2014), la vélocité (Akashi et al. 2005 ; Fuse et al. 2005) et le pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale (Fuse et al. 2005 ; Agarwal et Sharma 2007 ; Lammers et al. 2014). Une étude récente réalisée par l'équipe d'Engel en 2019 a observé des résultats comparables entre la dernière version du SQA (SQA Vision®) et la méthode manuelle pour la concentration spermatique et la mobilité totale. Cependant une faible concordance pour la mobilité progressive ainsi qu'une absence de concordance pour la morphologie sont retrouvés dans cette étude.

D'autres études ont également comparé les résultats entre le SQA et le CASA. Sukuzi et son équipe en 2002 retrouvent une corrélation significative pour la concentration, la mobilité et la concentration en spermatozoïdes mobiles entre le SQA IIC et le CASA. Dans l'étude publiée en 2014, Lammers et

son équipe ont démontré une concordance acceptable du SQA-V Gold et du CASA CEROS avec la méthode manuelle, le SQA-V Gold ayant la plus haute précision et la meilleure concordance. En contraste avec le volume d'échantillon utilisé de 10-50 µL pour la méthode manuelle et le CASA, le SQA-V Gold analyse un aliquote de sperme pur de 0,5 mL plus représentatif, ce qui améliore probablement la précision (Lammers et al. 2014).

Au total, les différentes études concluent que le SQA peut être utilisé en routine pour l'analyse du sperme dans l'exploration de l'infertilité masculine en fournissant rapidement des résultats précis et objectifs et en ayant un impact positif au niveau du laboratoire à travers la standardisation des résultats (Akashi et al. 2005 ; Agarwal et Sharma 2007 ; Lammers et al. 2014). Cependant, le SQA présente plusieurs désavantages à prendre en compte. D'une part, le coût des réactifs est important. D'autre part, le volume d'échantillon minimum pour analyse à 0,5 mL est certes plus représentatif mais correspond à un volume important pour des volumes d'éjaculat de 2 à 3 mL en moyenne. De plus, il ne peut être utilisé lorsque les valeurs des paramètres spermatiques sont en dehors du domaine de mesure.

c. Perspectives

Les systèmes CASA actuels utilisent presque exclusivement l'analyse de la trajectoire de la tête spermatique pour la mesure de la mobilité. Seuls quelques nouveaux systèmes commencent à prendre en compte la présence du flagelle pour la mesure de la mobilité dans l'objectif d'améliorer l'exclusion des débris de l'analyse (Gallagher et al. 2018). Cette prise en compte du mouvement flagellaire introduit l'utilité de la mesure de la viscosité pouvant impacter sur des aspects cinétiques du spermatozoïde tels que le mouvement flagellaire, la trajectoire. Une mesure améliorée de la viscosité par le système CASA pourrait fournir un paramètre diagnostique supplémentaire, notamment à travers son effet sur la mobilité spermatique (Gallagher et al. 2018). L'analyse du mouvement flagellaire pourrait également permettre des investigations concernant les besoins métaboliques d'un spermatozoïde (Gallagher et al. 2018).

La plus récente des nouveautés dans le domaine des systèmes CASA est une analyse diagnostique automatisée du sperme grâce à une application sur smartphone permettant la mesure de la concentration et de la mobilité spermatiques (Kanakasabapathy et al. 2017). Cette analyse utilise un petit volume de sperme (< 35 µL) déposé dans un dispositif jetable microfluidique qui est ensuite inséré dans le dispositif optique attaché au smartphone pour la mesure de la concentration et la mobilité spermatiques grâce à la caméra du smartphone. L'application enregistre ensuite une vidéo d'une seconde de 30 images (30 Hz). Cela pourrait être intéressant dans l'objectif de donner accès au diagnostic à une plus large population en visant des pays aux ressources limitées.

Figure 45 *- Procédure d'utilisation de l'analyse de sperme utilisant le dispositif lié au smartphone (Kanakasabapathy et al. 2017)*

B. Applications cliniques

a. Utilisation en routine

Dans un premier temps, les recommandations d'utilisation pour les systèmes CASA décrites par l'ESHRE en 1998 ont précisé que la détermination de la concentration et de la mobilité ne devait pas être la raison première pour l'acquisition d'un CASA, nécessitant dans ce cas une démarche préalable de comparaison avec une méthode de référence avant utilisation du CASA. Par la suite, grâce aux différents avancements technologiques ayant permis d'améliorer les techniques de détection des spermatozoïdes et d'analyse du mouvement (résolution d'images, puissance du matériel informatique et des fonctionnalités des logiciels, amélioration des algorithmes…) et à condition d'une préparation minutieuse de l'échantillon et d'une utilisation adéquate du logiciel, le CASA a démontré son aptitude à réaliser différentes analyses avec une haute précision et donc son utilité en routine (Mortimer et al. 2015 ; Lammers et al. 2014 ; OMS 2010) :

- **Analyse des paramètres spermatiques** (spermogramme) : la concentration de cette sous-population de spermatozoïde ayant les bons critères cinétiques pour pénétrer le mucus cervical
- **Analyse de la préparation de sperme avant technique** : concentration et catégories de mobilité
- **Évaluation de l'aptitude à la fécondation** : à travers l'évaluation de l'hyperactivation du spermatozoïde, une capacité essentielle pour la fécondation à la fois in vivo et in vitro.

b. *Analyse des spermatozoïdes hyperactivés*

Bien que l'hyperactivation soit un phénomène flagellaire, la trajectoire de la tête spermatique est un bon moyen pour modéliser le mouvement flagellaire (Mortimer et al. 2015). Le système CASA se présente alors comme une option pratique pour l'étude de l'hyperactivation du spermatozoïde. Bien que la relation entre hyperactivation des spermatozoïdes et taux de fécondation ne soit pas clairement identifiée, l'évaluation des caractéristiques dynamiques du spermatozoïde hyperactivé grâce au système CASA pourrait permettre de prédire l'aptitude du spermatozoïde à la fécondation in vivo et in vitro ainsi qu'orienter la prise en charge de l'infertilité (Mortimer et al. 2000). Ainsi, l'évaluation de l'hyperactivation pourrait être intéressante mais cela nécessite certaines conditions à respecter telles que la fréquence d'acquisition (Lu et al. 2014) ou encore la profondeur de chambre (20 µm) par exemple (Mortimer et al. 2015). De plus, certaines difficultés persistent à ce jour dans l'établissement des algorithmes permettant l'analyse de cette hyperactivation (Mortimer et al. 2015).

c. *Prédiction du succès de la fécondation in vitro*

Plusieurs études ont démontré que la mesure de la concentration et les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes mobiles progressifs par les systèmes CASA sont liés de manière significative aux taux de fécondation in vitro et in vivo, ainsi que le délai nécessaire pour concevoir (Liu et al. 1991a ; Barratt et al. 1993 ; Irvine et al. 1994 ; Krause 1995 ; Donnelly et al. 1998 ; Larsen et al. 2000 ; Garrett et al. 2003 ; Shibahara et al. 2004 ; Fréour et al. 2010). En effet, il a été montré que la VCL (Hirano et al. 2001; Li et al. 2003; Shibahara et al. 2004), la VSL (Liu et al. 1991; Hirano et al. 2001; Li et al. 2003; Ren et al. 2004), le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides (Hirano et al. 2001; Shibahara et al. 2004), l'ALH (Hirano et al. 2001; Fréour et al. 2010), la LIN (Liu et al. 1991) et la VAP (Liu et al. 1991; Li et al. 2003) sont les paramètres qui peuvent prédire le succès ou non de la fécondation in vitro. L'augmentation modérée mais actuelle de l'utilisation des systèmes CASA en routine dans les laboratoires d'aide médicale à la procréation pourrait alors permettre d'intégrer ces paramètres cinétiques en routine et ainsi évaluer l'impact de leur utilisation sur les résultats de FIV dans l'objectif d'améliorer et de mieux adapter la prise en charge des couples.

THÈSE SOUTENUE PAR : Lucie POST

TITRE : Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermiologie.

CONCLUSION :

Le besoin d'une analyse rapide, objective et fiable des différents paramètres spermatiques a conduit au développement de systèmes semi-automatisés pour l'analyse du sperme (CASA) durant ces 40 dernières années, qui sont aujourd'hui de plus en plus utilisés en routine pour évaluer les caractéristiques du sperme (Engel et al. 2019). L'utilité de ces systèmes CASA est d'autant plus mise en avant devant la grande variabilité et subjectivité de la méthode manuelle ainsi que son manque de standardisation (Keel et al. 2000, Auger et al. 2000 ; Alvarez et al. 2003 ; OMS 2010). Cependant, il est important de noter qu'il existe une condition optimale de fonctionnement pour tout système CASA et qu'en dessous de cette condition, des variations minimes dans les résultats peuvent être observées. Par conséquent, le réglage des paramètres et le fonctionnement des différents systèmes CASA doivent être standardisés et surveillés notamment grâce aux contrôles qualité (Lu et al. 2014).

L'objectif de cette étude était la validation de la méthode de mesure de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes par le système CASA du laboratoire du CHU de Grenoble. Cette méthode a su démontrer ses performances satisfaisantes en termes de répétabilité, de fidélité et d'exactitude et une bonne concordance a été retrouvée avec la méthode manuelle de référence. Longtemps peu recommandé pour l'évaluation de la concentration spermatique, il répond dorénavant plus facilement aux exigences qualité du COFRAC qu'une méthode manuelle subjective et d'une forte variabilité. Il permet en effet une standardisation et une traçabilité des résultats ainsi qu'une comparaison interlaboratoires facilitée grâce à la possibilité d'enregistrer des séquences vidéo. De plus, notre système CASA est adapté à nos exigences et les risques identifiés sont maîtrisés. Au total, le système CASA peut donc être utilisé en routine pour l'analyse des paramètres spermatiques dans le laboratoire de spermiologie thérapeutique et sera pleinement adapté à ce secteur compte tenu de ses performances et de ses limites.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 16/09/2019

LE DOYEN
Pr. Patrice MORAND

Pour le Président
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
Pr. Sylviane HENNEBICQ

BIBLIOGRAPHIE

Agarwal A, Sharma RK. Automation is the key to standardized semen analysis using the automated SQA-V sperm quality analyzer. Fertil Steril. 2007 Jan;87(1):156–62.

Akashi T, Mizuno I, Okumura A, Fuse H. Usefulness of sperm quality analyzer-V (SQA-V) for the assessment of sperm quality in infertile men. Arch Androl. 2005 Nov-Dec;51(6):437–42.

Álvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. Hum Reprod. 2003 Oct;18(10):2082–8.

Álvarez C, Castilla JA, Ramírez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernández A et al. External quality control program for semen analysis : Spanish experience. J Assist Reprod Genet. 2005 Dec;22(11/12):379–87.

Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA After 25 Years. J Androl. 2004 May 6;25(3):317–25.

Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology. 2014 Jan;81(1):5–17.e1–3.

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod. 2000 Nov;15(11):2360–8.

Auger J, Jouannet P, Eustache F. Another look of human sperm morphology. Hum Reprod. 2016;31(1):10–23.

Bailey E, Fenning N, Chamberlain S, Devlin L, Hopkisson J, Tomlinson M. Validation of Sperm Counting Methods Using Limits of Agreement. J Androl. 2007 May-Jun;28(3):364–73.

Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. Fertil Steril. 1993 Sep;60(3):520–5.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1986 Feb 8;1:307–10.

Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, Núñez de Murga M et al. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. Reprod Fertil Dev. 2018 Jun;30(6):810–9.

Boryshpolets S, Kowalski RK, Dietrich GJ, Dzyuba B, Ciereszko A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. Theriogenology. 2013 Oct 15;80(7):758–65.

Centola GM. Comparison of Manual Microscopic and Computer-Assisted Methods for Analysis of Sperm Count and Motility. Arch Androl. 1996 Jan-Feb;36(1):1–7.

Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) Andrology Special Interest Group. Hum Reprod. 1996 Jul;11(7):1463–79.

Cooper TG, Yeung CH. Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. Fertil Steril. 2006 Jan;85(1):220–4.

Daloglu MU, Ozcan A. Computational imaging of sperm locomotion. Biol Reprod. 2017 Aug 1;97(2):182–8.

Davis RO, Katz DF. Standardization and Comparability of CASA Instruments. J Androl. 1992 Jan-Feb;13(1):81–6.

Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. Hum Fertil. 2014 Mar;17(1):37–44.

Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. Fertil Steril. 1998 Aug;70(2):305–14.

Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. Capillary-Loaded Particle Fluid Dynamics: Effect on Estimation of Sperm Concentration. J Androl. 2005 Jan-Feb;26(1):115–22.

Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. Particle Distribution in Low-Volume Capillary-Loaded Chambers. J Androl. 2005 Jan-Feb;26(1):107–14.

Engel KM, Grunewald S, Schiller J, Paasch U. Automated semen analysis by SQA Vision® versus the manual approach-A prospective double-blind study. Andrologia. 2019 Feb;51(1):e13149.

Filimberti E, Degl’Innocenti S, Borsotti M, Quercioli M, Piomboni P, Natali I et al. High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. Andrology. 2013 May;1(3):401–7.

Fuhrman C, Chouaïd C. Concordance de deux variables : les approches numériques. Rev Mal Respir. 2004 Feb;21(1):123–5.

Fuse H, Akashi T, Nozaki T, Nishio R, Mizuno I. Assessment Of Sperm Quality Analyzer II B: Comparison With Manual Semen Analysis And CASA. Arch Androl. 2005 Jan-Feb;51(1):65–7.

Gallagher MT, Smith DJ, Kirkman-Brown JC. CASA: tracking the past and plotting the future. Reprod Fertil Dev. 2018 Jun;30(6):867–74.

Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HWG. Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. Hum Reprod. 2003 Aug;18(8):1643–9.

Glenn Proctor J, Boone WR, Lee Higdon III H. Comparison of the Manual, IVOS, and SCA Methods for Semen Analysis Reporting. The Journal of Clinical Embryology. 2009 Aug;12(4):5–7.

Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. ESHRE Andrology Special Interest Group. European Society for Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod. 1998 Jan;13(1):142–5.

Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C et al. Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. J Assist Reprod Genet. 2001 Apr;18(4):213–8.

Hu YA, Lu JC, Shao Y, Huang YF. Comparison of four methods for sperm counting. Zhonghua Nan Ke Xue (National Journal of Andrology). 2006 Mar;12(3):222–4, 227.

Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA, Masterton A, Taylor A. Andrology: A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. Hum Reprod. 1994 Dec;9(12):2324–34.

Johnson JE, Blackhurst DW, Boone WR. Can Westgard quality control rules determine the suitability of frozen sperm pellets as a control material for computer automated semen analyzers? J Assist Reprod Genet. 2003 Jan;20(1):38–44.

Jouannet P, Serres C. Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. Médecin/sciences. 1995;4(11):555–62.

Kanakasabapathy MK, Sadasivam M, Singh A, Preston C, Thirumalaraju P, Venkataraman M, Bormann CL, Draz MS, Petrozza JC, Shafiee H. An automated smartphone-based diagnostic assay for point-of-care semen analysis. Sci Transl Med. 2017 Mar;9(382):eaai7863.

Keel BA, Quinn P, Schmidt CF, Serafy NT, Serafy NT, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. Hum Reprod. 2000 Mar;15(3):680–6.

Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. Hum Reprod. 1998 Mar;13(3):611–9.

Krause W. Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. Hum Reprod. 1995 Oct;10(Suppl 1):60–6.

Lammers J, Splingart C, Barrière P, Jean M, Fréour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. J Assist Reprod Genet. 2014 Jan;31(1):35–43.

Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. Hum Reprod. 2000 Jul;15(7):1562–7.

Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. Hum Reprod. 1992 Nov;7(10):1417–21.

Li L, Ning Y, Yin H, Sun Z. The application of computer assisted sperm analysis on in vitro fertilization. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2003 Jan;34(1):112–4, 154.

Liu DY, Clarke GN, Baker WG. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates In Vitro. J Androl. 1991 Jul-Aug;12(4):231–9.

Lu JC, Huang YF, Lü NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. Andrologia. 2014 May;46(4):329–38.

Mallidis C, Cooper TG, Hellenkemper B, Lablans M, Ückert F, Nieschlag E. Ten years' experience with an external quality control program for semen analysis. Fertil Steril. 2012 Sep;98(3):611–6.e4.

Manuel fournisseur Hamilton Thorne du CASA Hamilton Thorne CEROS II

Mortimer D, Aitken R, Mortimer S, Pacey A. Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. Reprod Fertil Dev. 1995;7(4):951–9.

Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. Hum Reprod. 1988 Jul;3(5):621–5.

Mortimer D, Serres C, Mortimer ST, Jouannet P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. Gamete Res. 1988. Jul;20(3):313–27.

Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. Asian J Androl. 2015 Jul-Aug;17(4):545–53.

Mortimer ST. CASA – Practical Aspects. J Androl. 2000 Jul-Aug;21(4):515–24.

Neuwinger J, Knuth UA, Nieschlag E. Evaluation of the Hamilton-Thorn 2030 motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic. Int J Androl. 1990 Apr;13(2):100–9.

Ren SS, Sun GH, Ku CH, Chen DC. Comparison of four methods for sperm preparation for IUI. Arch Androl. 2004 May-Jun;50(3):139–43.

Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, Fisch H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads*. Fertil Steril. 1996 Oct;66(4):662–5.

Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A et al. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. Int J Androl. 2004 Apr;27(2):63–8.

Spiropoulos J. Computerized semen analysis (CASA): effect of semen concentration and chamber depth on measurements. Arch Androl. 2001 Jan-Feb;46(1):37–42.

Suzuki T, Shibahara H, Tsunoda H, Hirano Y, Taneichi A, Obara H, et al. Comparison of the Sperm Quality Analyzer IIC variables with the computer-aided sperm analysis estimates. Int J Androl. 2002 Feb;25(1):49–54.

Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? Ginekol Pol. 2017;88(2):56–60.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod. 1991 Jul;6(6):811–6.

Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, Newton T, Hopkisson J, Jayaprakasan K, et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. Fertil Steril. 2010 Apr;93(6):1911–20.

Vernon DD, Johnson JE, Houwing AM, Higdon III HL, Boone WR. Accu-Beads as a quality control measure for manual and automated methods of measuring sperm concentration—an observational study. J Assist Reprod Genet. 2014 Jan;31(1):25–33.

Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G. A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. Asian J Androl. 2011 May;13(3):453–8.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. p. 271.

Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, Fisher SG, Clegg ED. Evaluation of CASA with IDENT Stain to determine sperm concentration. J Androl. 1996 May-Jun;17(3):288–92.

Zuvela E, Junk S, Moska N, Matson P. The use of latex beads in external quality assurance and internal quality control for routine semen analysis. Reprod Biol. 2011 Nov;11(3):264–75.

ANNEXES

***Tableau 29** - Maîtrise des risques pour la concentration spermatique*

MAITRISE DES RISQUES – CONCENTRATION SPERMATIQUE							
5M	**Points critiques**	**Fréquence**	**Gravité**	**Détectabilité**	**Échelle de criticité[1]**	**Éléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Matière (échantillons)	Identité	2	5	2	20	Identité du patient Identification du réceptacle Identité sur feuille de paillasse Identité sur dossier du logiciel MediFrist	- Procédure d'identitovigilance du laboratoire (IDENT.MAQ.001) - HCEBPC.PRO.003 : Circuit et identification des prélèvements au laboratoire de biologie de la reproduction → Identification et horaire du prélèvement notés sur le réceptacle et feuille de paillasse. - HCEBPC.MOP.021 : Accueil des patients en vue d'analyse de sperme - HCEBPC.MOP.023 : Accueil des patients le jour de l'AMP - HCEBPC.MOP.031 : Accueil des patients pour recherche de spermatozoïdes dans les urines
	Préparation du patient	2	3	2	12	Information des patients et formation du personnel Conditions de prélèvement : consignes de recueil	- HCEBPC.MOP.021 : Accueil des patients en vue d'analyse de sperme - HCEBPC.MOP.023 : Accueil des patients le jour de l'AMP - HCEBPC.MOP.031 : Accueil des patients pour recherche de spermatozoïdes dans les urines - HCEBPC.MOP.016 : Consignes de recueil - HCEBPC-MOP.018 : Consignes de recueil en couple
	Type de contenants	2	3	1	6	Non toxicité du contenant pour Sperme, urines (frais) : réceptacles pour recueil de sperme (JCD)	Réceptacle : emballage unique, stérile, date de fabrication et d'expiration, format conforme aux recommandations de l'OMS (OMS. 5ème édition, 2010), MEA (test embryotoxicité), HSMA (test motilité) et LAL (test endotoxines)

[1] Cf « échelle de criticité » : GES.FTE.001

		2	3	1	6	Non toxicité du contenant pour <u>Sperme congelé</u> : paillettes CBS haute sécurité (Cryo Bio System)	<u>Paillettes Haute Sécurité</u> : en résine ionomère résistante aux ultra-basses températures, soudées, différentes couleurs, identifiées au nom du patient. Marquage CE
	Nature et volume de l'échantillon	2	3	1	6	Contrôle à réception par technicien : - Recueil complet - Quantité - Information si problème lors du recueil	Contrôle à réception : identité (étiquette CHU sur réceptacle), quantité suffisante, problèmes lors du recueil HCEBPC.PRO.006 : Liste et gestion des prélèvements non conformes
		3	3	1	6	Inhomogénéité de l'échantillon	Respect de la procédure (HCEBPC.PRO.008 : Spermogramme : procédure) : - Homogénéisation - Deux mesures de concentrations pour chaque patient Analyse de plusieurs champs (6 minimum : recommandations manuel de l'OMS 2010, 5ème édition)
	Délai et température avant traitement analytique	2	2	1	4	Délai de prise en charge	Respect de la procédure (HCEBPC.PRO.008) : - Liquéfaction du sperme 20 à 30 minutes à 37°C à l'étuve avant traitement analytique - Lecture dans l'heure de la concentration
	Prétraitement :	3	3	2	18	<u>Dilution</u>	Métrologie des milieux (cf Milieu) et des pipettes (cf Matériel)
		1	4	2	8	<u>Sperme congelé</u> : décongélation avant traitement analytique	- HCEBPC.MOP.057 : Décongélation du sperme - HCEBPC.MOP.002 : Consignes de sécurité liées à la manipulation de l'azote
		2	2	1	4	<u>Capacitats</u> : centrifugation sur gradient de densité - Tubes de centrifugation coniques 11 mL (Nunc™) - Milieux : • PureSperm®100 (Nidacon) • Sperm Preparation Medium (Origio), Ver.8, 03/01/2017 - Centrifugeuse	- HCEBPC.MOP.055 : Préparation des colonnes pour le test de migration-survie - HCEBPC.PRO.010 : Test de migration-survie - HCEBPC.MOP.044 : Préparation des capacitats pour la FIV - HCEBPC.MOP.056 : Préparation des capacitats pour IIU Tubes Nunc™ : marquage CE, stériles, en polystyrène, enregistrement des lots et de la date de péremption. Métrologie des milieux (cf Milieu) Maintenance des centrifugeuses (annuelle)

	Interférences	3	3	1	9	Présence de spermatozoïdes enroulés : non comptés par le logiciel → sous-estimation de la numération spermatique	- Contrôle visuel par l'opérateur sur l'ordinateur de la présence d'enroulés - Possibilité de contrôle manuel sur cellule de Malassez si besoin
		3	3	1	9	Viscosité : risque de non homogénéité de l'échantillon et difficulté de manipulation	Respect de la procédure à suivre en cas de viscosité augmentée (HCEBPC.MOP.005)
	Informations	2	2	2	8	Recueil des données pré-analytiques : - Heure du recueil - Délai d'abstinence sexuelle - Identité des personnes ayant installé le patient pour le recueil, réception du prélèvement - Problèmes lors du recueil	- Recueil des informations par le personnel lors de l'installation du patient (HCEBPC.MOP.016 : Consignes de recueil) et lors de la réception du recueil de sperme (HCEBPC.PRO.006 : Liste et gestion des prélèvements non conformes, HCEBPC.PRO.003 : Circuit et identification des prélèvements au laboratoire de biologie de la reproduction) - Traçabilité des informations : feuille de paillasse puis saisie informatique dans MediFirst
						Sauvegarde des données : papier et informatique	- Papier : traçabilité papier sur feuille de paillasse (HCEBPC.PRO.008 : Spermogramme : procédure) - Informatique : sauvegarde quotidienne par le CRIH sur disque indépendant de la localisation de l'application (HCEBPC.PRO.014 Gestion du système informatique au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS)
						Saisie informatique des résultats	Double vérification de la saisie (concordance feuille de paillasse et logiciel MediFirst) : technicien puis biologiste lors de la validation (HCEBPC.PRO.015 Validation biologique des examens de spermiologie diagnostique)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, …)	1	1	1	1	Délai de réanalyse	Pas de réanalyse possible après un délai supérieur à 1h suivant le recueil Conservation des échantillons à température ambiante après traitement analytique

	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, …)	2	3	1	6	Métrologie des réactifs utilisés pour les capacitats : - Sperm Preparation Medium (Origio), - PureSperm®100 (Nidacon)	- Sperm Preparation Medium (Origio), Ver.8, 03/01/2017 : diluant pour la préparation des gradients de densité. Adapté des recommandations de l'OMS (manuel 2010, 5e édition) - PureSperm®100 (Nidacon) : solution de silice pour préparation des gradients de densité. Marquage CE, tests osmolalité, pH, endotoxines, survie des spermatozoïdes. Conditions de conservation et d'utilisation conformes aux données du fournisseur. Dates d'ouverture notées sur le flacon. Enregistrement des lots.
						Métrologie du réactif utilisé pour le sperme congelé : SpermFreeze™	SpermFreeze™ = milieu pour la congélation du sperme humain, cryoprotecteur, Marquage CE, stériles ; tests osmolalité, pH, endotoxines, survie des spermatozoïdes. Conditions de conservation et d'utilisation conformes aux données du fournisseur. Date d'ouverture notée sur le flacon. Enregistrement des lots.
		2	2	1	4	Contrôle et traçabilité des étuves : cartographie et suivi des températures (BD53 Binder Sodipro (02DL20), BM200 (Memmert) (02DL38))	Suivi métrologique des étuves : contrôle et traçabilité continus en température (cible 37°C / EMT=1) par le logiciel de supervision SIRIUS. Cartographie tous les 5 ans, étalonnage annuel de la sonde.
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	2	1	2	Plan HCE, Bâtiment 7 : Assistance Médicale à la Procréation, tranche 1, niveau 2 : - Pièces de recueil de sperme : 02DL14, 17, 18, 19, pièces sanitaires recueil : 02DL15, 16 - Pièce technique de spermiologie thérapeutique : 02DL38	Pièce de spermiologie thérapeutique pour les préparations de sperme en vue d'AMP : dans le secteur thérapeutique séparé des autres locaux par 2 SAS (02DL28 et 02DL41), ouverture par badges nominatifs, zone à atmosphère contrôlée (ZAC) HCEBPC.MOP.017 : Tenue vestimentaire et comportement dans la zone thérapeutique du laboratoire ou ZAC (Zone à Atmosphère Contrôlée)
Matériel (équipement)	Surveillance des dérives	1	4	1	4	Surveillance des dérives du logiciel analyseur du CASA (HT CASA II Human Clinical Software (N° série 7183))	Contrôles de qualité : • CIQ : Contrôles de qualité internes Accu-beads® (Hamilton Thorne) quotidiens • CQIL : Contrôles de qualité inter-laboratoires (vidéos)
		1	2	1	2	Entretien et maintenance du Microscope HT Zeiss Axio Lab.A1 et de la caméra CM-040 GE (JAI®)	Entretien et maintenance du microscope HT Zeiss Axio Lab.A1 et de la caméra CM-040 GE (JAI®) : cf notice fournisseur (Operating Manual Axio Lab.A1)

		2	3	1	6	Surveillance métrologique des pipettes	Métrologie des pipettes : GBAQMMM.MOP.001 : Contrôle des pipettes de laboratoire et maintenance (annuelle)
		2	2	1	4	Contrôle et traçabilité des étuves (BD53 Binder Sodipro (02DL20), BM200 (Memmert) (02DL38))	Suivi métrologique des étuves (cf Milieu)
		2	3	1	6	Périodicité des maintenances des centrifugeuses (5804 (eppendorf) et C412 (Jouan)) et des hottes à flux laminaire pour la manipulation du sperme (2 PSM II et 1 HFLV (Techgen))	Hottes, centrifugeuse : maintenance annuelle
	Pipettes	2	3	2	12	Volumes utilisés de sperme non dilué : risque faible sans dilution	- Surveillance métrologique des pipettes (GBAQMMM.MOP.001) - Contrôle de l'estimation de la concentration - Deux mesures de concentrations pour chaque patient par 2 dilutions indépendantes
						Volumes utilisés de sperme dilué : criticité augmente avec la dilution	- Surveillance métrologique des pipettes (GBAQMMM.MOP.001) - Contrôle de l'estimation de la concentration - Deux mesures de concentrations pour chaque patient par 2 dilutions indépendantes
	Analyse des vidéos	1	3	1	3	Paramétrage de la caméra	- Utilisation des paramètres fournisseur de la caméra - Contrôle qualité interlaboratoires - Contrôle visuel sur le logiciel par le technicien : concordance entre le résultat fourni par le CASA et l'estimation visuelle sur l'écran
	Lames de comptage : Lames Leja® (Leja Products B.V.) profondeur de 20µm, 2 chambres	1	4	1	3	Faible volume de la chambre : 6µL	- Marquage CE - Respect des recommandations fournisseur - CIQ : contrôle entre différents lots de lames
		2	3	2	12	<u>Inhomogénéité</u> : Chargement de l'échantillon dans la chambre par capillarité : effet sur répartition des spermatozoïdes dans la chambre de comptage	- Analyse de 2 chambres par patient (manuel de l'OMS 2010) - Analyse de 6 champs minimum par chambre (manuel de l'OMS 2010) dont 3 champs au niveau d'une zone proximale, d'une zone centrale et d'une zone distale par rapport à la zone de chargement de l'échantillon (Dearing et al. 2014) - Capture des champs à une distance d'au moins 3 champs des bords de la chambre (cf manuel fournisseur)

	Contamination	1	3	2	6	Contamination inter-échantillons et inter-réactifs : NA car lame à usage unique et pas de réactif	/
	Informatique embarquée	2	2	2	8	Enregistrement et saisie résultats dans le logiciel informatique MediFirst	Qualification du système informatique (HCEBPC.PRO.014 Gestion du système informatique au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS) Formation du personnel à la saisie
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation des contrôles qualité	2	3	1	6	Contrôles internes de qualité	CIQ : Accu-beads® (Hamilton Thorne) - 3 niveaux de concentration : 3, 18 et 35 millions/mL - Passage de 2 niveaux par jour - Conditions de conservation (température ambiante) et d'utilisation conformes aux données du fournisseur - Traçabilité d'ouverture des flacons, des nouveaux lots.
	Gestion des stocks	2	2	1	4	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	- Utilisation du logiciel Sapanet pour acceptation à réception et gestion des stocks (HCEGCH.PRO.019 Gestion des stocks et des commandes) - Possibilité de recours à la méthode manuelle si besoin
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, …)	3	2	1	6	Limite de détection	<u>Limite de détection théorique</u> (200 spermatozoïdes comptés dans toute la chambre de comptage de 6µL soit 0,03 Million/mL) : en pratique, screening manuel si concentration < limite de quantification de 2 M/mL
		3	2	1	6	Limite de quantification	<u>Limite de quantification</u> : 2 M/mL d'après l'OMS 2010 5ème édition et 2.1 M/mL d'après l'étude expérimentale réalisée au laboratoire. Screening manuel au microscope si concentration < limite de quantification de 2 M/mL
		3	2	1	8	Limite supérieure de linéarité	<u>Limite supérieure de linéarité</u> : 50 M/mL d'après l'OMS 2010 5ème édition, dilution nécessaire au-delà de 50 M/mL
		3	2	1	6	Interférences : spermatozoïdes enroulés, viscosité	- Spermatozoïdes enroulés : • Contrôle visuel par l'opérateur sur l'ordinateur de la présence d'enroulés • Contrôle manuel sur cellule de Malassez si besoin - Viscosité : respect de la procédure à suivre en cas de viscosité augmentée (HCEBPC.MOP.005)
	Causes d'incertitude de mesure	3	3	1	9	Calcul des incertitudes de mesure	Calcul des incertitudes de mesure à partir de la méthode CIQ/EEQ (SH GTA 14) Réévaluation régulière (périodicité annuelle recommandée (SH GTA 14))

Main d' œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	2	3	1	6	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Habilitation	Enregistrements des compétences du personnel Traçabilité de l'occupation des postes de travail GBAQGRH.PRO.001 : Habilitation du personnel par poste de travail (procédure générale) HCEBPC.FDP.002 : Fiche de poste – spermiologie thérapeutique HCEBPC.FOR.005 : Fiche d'habilitation – spermiologie thérapeutique Connaissance et maîtrise des modes opératoires cités ci-dessus Contrôles de qualité internes

Tableau 30 - Maîtrise des risques pour la mobilité spermatique

MAITRISE DES RISQUES – MOBILITE SPERMATIQUE							
5M	**Points critiques**	**Fréquence**	**Gravité**	**Détectabilité**	**Échelle de criticité[2]**	**Éléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Matière (échantillons)	Identité	2	5	2	20	Identité du patient Identification du réceptacle Identité sur feuille de paillasse Identité sur dossier du logiciel MediFrist	- Procédure d'identitovigilance du laboratoire (IDENT.MAQ.001) - HCEBPC.PRO.003 : Circuit et identification des prélèvements au laboratoire de biologie de la reproduction → Identification et horaire du prélèvement notés sur le réceptacle et feuille de paillasse. - HCEBPC.MOP.021 : Accueil des patients en vue d'analyse de sperme - HCEBPC.MOP.023 : Accueil des patients le jour de l'AMP - HCEBPC.MOP.031 : Accueil des patients pour recherche de spermatozoïdes dans les urines
	Préparation du patient	2	3	2	12	Information des patients et formation du personnel Conditions de prélèvement : consignes de recueil	- HCEBPC.MOP.021 : Accueil des patients en vue d'analyse de sperme - HCEBPC.MOP.023 : Accueil des patients le jour de l'AMP - HCEBPC.MOP.031 : Accueil des patients pour recherche de spermatozoïdes dans les urines - HCEBPC.MOP.016 : Consignes de recueil - HCEBPC-MOP.018 : Consignes de recueil en couple
	Type de contenants	2	3	1	6	Non toxicité du contenant pour Sperme, urines (frais) : réceptacles pour recueil de sperme (JCD)	Réceptacle : emballage unique, stérile, date de fabrication et d'expiration, format conforme aux recommandations de l'OMS (OMS. 5ème édition, 2010), MEA (test embryotoxicité), HSMA (test motilité) et LAL (test endotoxines)
		2	3	1	6	Non toxicité du contenant pour Sperme congelé : paillettes CBS haute sécurité (Cryo Bio System)	Paillettes Haute Sécurité : en résine ionomère résistante aux ultra-basses températures, soudées, différentes couleurs, identifiées au nom du patient. Marquage CE

[2] Cf « échelle de criticité » : GES.FTE.001

	Nature et volume de l'échantillon	2	3	1	6	Contrôle à réception par technicien : - Recueil complet - Quantité - Information si problème lors du recueil	Contrôle à réception : identité (étiquette CHU sur réceptacle), quantité suffisante, problèmes lors du recueil HCEBPC.PRO.006 : Liste et gestion des prélèvements non conformes
		3	3	1	6	Inhomogénéité de l'échantillon	Respect de la procédure (HCEBPC.PRO.008 : Spermogramme : procédure) : - Homogénéisation - Deux mesures de mobilité pour chaque patient Analyse de plusieurs champs (6 minimum : recommandations manuel de l'OMS 2010, 5ème édition)
	Délai et température avant traitement analytique	2	4	1	8	Délai de prise en charge : délai pour lecture de la mobilité	Respect de la procédure (HCEBPC.PRO.008) : - Liquéfaction du sperme 20 à 30 minutes à 37°C à l'étuve avant traitement analytique - Lecture dans l'heure de la mobilité
	Prétraitement :	3	1	2	6	<u>Dilution</u>	Métrologie des milieux (cf Milieu) et des pipettes (cf Matériel)
		1	4	2	8	<u>Sperme congelé</u> : décongélation avant traitement analytique	- HCEBPC.MOP.057 : Décongélation du sperme - HCEBPC.MOP.002 : Consignes de sécurité liées à la manipulation de l'azote
		2	3	1	6	<u>Capacitats</u> : centrifugation sur gradient de densité - Tubes de centrifugation coniques 11 mL (Nunc™) - Milieux : • PureSperm®100 (Nidacon) • Sperm Preparation Medium (Origio), Ver.8, 03/01/2017 - Centrifugeuse	- HCEBPC.MOP.055 : Préparation des colonnes pour le test de migration-survie - HCEBPC.PRO.010 : Test de migration-survie - HCEBPC.MOP.044 : Préparation des capacitats pour la FIV - HCEBPC.MOP.056 : Préparation des capacitats pour IIU Tubes Nunc™ : marquage CE, stériles, en polystyrène, enregistrement des lots et de la date de péremption. Métrologie des milieux (cf Milieu) Maintenance des centrifugeuses (annuelle) Peu d'impact sur la mobilité tant que la vitesse de centrifugation respecte les recommandations OMS 2010 (300-500 pour lavage, 300-400g puis 200g pour gradient de densité)

	Interférences	3	3	1	9	Présence de spermatozoïdes enroulés : non comptés par le logiciel → surestimation de la mobilité spermatique par sous-estimation du nombre de spermatozoïdes immobiles	- Contrôle visuel par l'opérateur sur l'ordinateur de la présence d'enroulés - Possibilité de contrôle manuel sur cellule de Malassez si besoin
		3	3	1	9	Viscosité : risque de non homogénéité de l'échantillon et difficulté de manipulation	Respect de la procédure à suivre en cas de viscosité augmentée (HCEBPC.MOP.005)
	Informations	2	2	2	8	Recueil des données pré-analytiques : - Heure du recueil - Délai d'abstinence sexuelle - Identité des personnes ayant installé le patient pour le recueil, réception du prélèvement - Problèmes lors du recueil	- Recueil des informations par le personnel lors de l'installation du patient (HCEBPC.MOP.016 : Consignes de recueil) et lors de la réception du recueil de sperme (HCEBPC.PRO.006 : Liste et gestion des prélèvements non conformes, HCEBPC.PRO.003 : Circuit et identification des prélèvements au laboratoire de biologie de la reproduction) - Traçabilité des informations : feuille de paillasse puis saisie informatique dans MediFirst
						Sauvegarde des données : papier et informatique	- Papier : traçabilité papier sur feuille de paillasse (HCEBPC.PRO.008 : Spermogramme : procédure) - Informatique : sauvegarde quotidienne par le CRIH sur disque indépendant de la localisation de l'application (HCEBPC.PRO.014 Gestion du système informatique au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS)
						Saisie informatique des résultats	Double vérification de la saisie (concordance feuille de paillasse et logiciel MediFirst) : technicien puis biologiste lors de la validation (HCEBPC.PRO.015 Validation biologique des examens de spermiologie diagnostique)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, …)	1	1	1	1	Délai de réanalyse	Pas de réanalyse possible après un délai supérieur à 1h suivant le recueil Conservation des échantillons à température ambiante après traitement analytique

	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, …)	2	3	1	6	Métrologie des réactifs utilisés pour les capacitats : - Sperm Preparation Medium (Origio), - PureSperm®100 (Nidacon)	- Sperm Preparation Medium (Origio), Ver.8, 03/01/2017 : diluant pour la préparation des gradients de densité. Adapté des recommandations de l'OMS (manuel 2010, 5e édition) - PureSperm®100 (Nidacon) : solution de silice pour préparation des gradients de densité. Marquage CE, tests osmolalité, pH, endotoxines, survie des spermatozoïdes. Conditions de conservation et d'utilisation conformes aux données du fournisseur. Dates d'ouverture notées sur le flacon. Enregistrement des lots.
						Métrologie du réactif utilisé pour le sperme congelé : SpermFreeze™	SpermFreeze™ = milieu pour la congélation du sperme humain, cryoprotecteur, Marquage CE, stériles ; tests osmolalité, pH, endotoxines, survie des spermatozoïdes. Conditions de conservation et d'utilisation conformes aux données du fournisseur. Date d'ouverture notée sur le flacon. Enregistrement des lots.
		2	3	1	6	Contrôle et traçabilité des étuves : cartographie et suivi des températures (BD53 Binder Sodipro (02DL20), BM200 (Memmert) (02DL38))	Suivi métrologique des étuves : contrôle et traçabilité continus en température (cible 37°C / EMT=1) par le logiciel de supervision SIRIUS. Cartographie tous les 5 ans, étalonnage annuel de la sonde.
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	2	1	2	Plan HCE, Bâtiment 7 : Assistance Médicale à la Procréation, tranche 1, niveau 2 : - Pièces de recueil de sperme : 02DL14, 17, 18, 19, pièces sanitaires recueil : 02DL15, 16 - Pièce technique de spermiologie thérapeutique : 02DL38	Pièce de spermiologie thérapeutique pour les préparations de sperme en vue d'AMP : dans le secteur thérapeutique séparé des autres locaux par 2 SAS (02DL28 et 02DL41), ouverture par badges nominatifs, zone à atmosphère contrôlée (ZAC) HCEBPC.MOP.017 : Tenue vestimentaire et comportement dans la zone thérapeutique du laboratoire ou ZAC (Zone à Atmosphère Contrôlée)
Matériel (équipement)	Surveillance des dérives	1	4	1	4	Surveillance des dérives du logiciel analyseur du CASA (HT CASA II Human Clinical Software (N° série 7183))	Contrôles de qualité : • CQIL : Contrôles de qualité inter-laboratoires (vidéos)

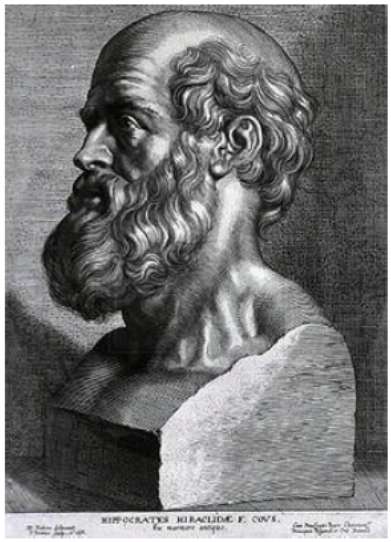
		1	2	1	2	Entretien et maintenance du Microscope HT Zeiss Axio Lab.A1 et de la caméra CM-040 GE (JAI®)	Entretien et maintenance du microscope HT Zeiss Axio Lab.A1 et de la caméra CM-040 GE (JAI®) : cf notice fournisseur (Operating Manual Axio Lab.A1)
		2	3	1	6	Surveillance métrologique des pipettes	Métrologie des pipettes : GBAQMMM.MOP.001 : Contrôle des pipettes de laboratoire et maintenance (annuelle)
		2	3	1	6	Contrôle et traçabilité des étuves (BD53 Binder Sodipro (02DL20), BM200 (Memmert) (02DL38))	Suivi métrologique des étuves (cf Milieu)
		2	3	1	6	Périodicité des maintenances des centrifugeuses (5804 (eppendorf) et C412 (Jouan)) et des hottes à flux laminaire pour la manipulation du sperme (2 PSM II et 1 HFLV (Techgen))	Hottes, centrifugeuse : maintenance annuelle
	Pipettes	2	2	2	8	Volumes utilisés de sperme non dilué : risque faible sans dilution	- Surveillance métrologique des pipettes (GBAQMMM.MOP.001) - Contrôle de l'estimation de la concentration - Deux mesures de concentrations pour chaque patient par 2 dilutions indépendantes
						Volumes utilisés de sperme dilué : criticité augmente avec la dilution	- Surveillance métrologique des pipettes (GBAQMMM.MOP.001) - Contrôle de l'estimation de la concentration - Deux mesures de concentrations pour chaque patient par 2 dilutions indépendantes
	Analyse des vidéos	1	3	1	3	Paramétrage de la caméra	- Utilisation des paramètres fournisseur de la caméra - Contrôle qualité interlaboratoires - Contrôle visuel sur le logiciel par le technicien : concordance entre le résultat fourni par le CASA et l'estimation visuelle sur l'écran
	Lames de comptage : Lames Leja® (Leja Products B.V.) profondeur de 20µm, 2 chambres	1	4	1	3	Faible volume de la chambre : 6µL	- Marquage CE - Respect des recommandations fournisseur - Contrôle entre différents lots de lames (CIQ)

		2	3	2	12	<u>Inhomogénéité</u> : Chargement de l'échantillon dans la chambre par capillarité : effet sur répartition des spermatozoïdes dans la chambre de comptage	- Analyse de 2 chambres par patient (manuel de l'OMS 2010) - Analyse de 6 champs minimum par chambre (manuel de l'OMS 2010) dont 3 champs au niveau d'une zone proximale, d'une zone centrale et d'une zone distale par rapport à la zone de chargement de l'échantillon (Dearing et al. 2014) - Capture des champs à une distance d'au moins 3 champs des bords de la chambre (cf manuel fournisseur)
	Contamination	1	3	2	6	Contamination inter-échantillons et inter-réactifs : NA car lame à usage unique et pas de réactif	/
	Informatique embarquée	2	2	2	8	Enregistrement et saisie résultats dans le logiciel informatique MediFirst	Qualification du système informatique (HCEBPC.PRO.014 Gestion du système informatique au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS) Formation du personnel à la saisie
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation des contrôles qualité	2	3	1	6	NA car pas de contrôles internes de qualité pour la mobilité	/
	Gestion des stocks	2	2	1	4	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	- Utilisation du logiciel Sapanet pour acceptation à réception et gestion des stocks (HCEGCH.PRO.019 Gestion des stocks et des commandes) - Possibilité de recours à la méthode manuelle si besoin
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, …)	3	2	1	6	Interférences : spermatozoïdes enroulés, viscosité	- Spermatozoïdes enroulés : • Contrôle visuel par l'opérateur sur l'ordinateur de la présence d'enroulés • Contrôle manuel sur cellule de Malassez si besoin - Viscosité : respect de la procédure à suivre en cas de viscosité augmentée (HCEBPC.MOP.005)
	Causes d'incertitude de mesure	3	3	1	9	Calcul des incertitudes de mesure	Calcul des incertitudes de mesure à partir de la méthode CIQ/EEQ (SH GTA 14) avec les résultats des CQIL Réévaluation régulière (périodicité annuelle recommandée (SH GTA 14))

Main d' œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	2	3	1	6	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Habilitation	Enregistrements des compétences du personnel Traçabilité de l'occupation des postes de travail GBAQGRH.PRO.001 : Habilitation du personnel par poste de travail (procédure générale) HCEBPC.FDP.002 : Fiche de poste – spermiologie thérapeutique HCEBPC.FOR.005 : Fiche d'habilitation – spermiologie thérapeutique Connaissance et maîtrise des modes opératoires cités ci-dessus Contrôles de qualité internes

Tableau 31 *- Comparaison de méthodes : résultats de concentration et mobilité*

N°	MANUELLE				CASA			
	Concentration (M/mL)	Mobilité totale (%)	Mobilité progressive (%)	Mobilité non progressive (%)	Concentration (M/mL)	Mobilité totale (%)	Mobilité progressive (%)	Mobilité non progressive (%)
1	240,5	80	80	0	241,4	88	86	2
2	11,7	50	45	5	8,0	36	34	2
3	103	80	80	0	76,2	81	80	1
4	177	90	90	0	373,8	87	82	5
5	32,75	85	85	0	52,6	85	73	12
6	95,5	70	70	0	101,1	56	48	8
7	321	50	45	5	267,7	65	57	7
8	163	95	95	0	138,0	91	87	4
9	26,5	80	80	0	27,9	93	86	6
10	23,75	60	50	10	17,1	64	38	26
11	125	95	95	0	135,7	95	91	4
12	86	85	85	0	77,3	84	76	7
13	3,08	7	7	0	2,9	8	7	1
14	132	85	80	5	106,6	87	83	4
15	174	80	75	5	198,0	77	74	2
16	75	50	50	0	66,3	62	40	22
17	40	65	60	5	26,7	70	59	11
18	8,6	17	13	4	6,6	44	20	24
19	66,4	90	90	0	59,5	90	85	5
20	22,5	20	20	0	17,0	15	10	5
21	210	60	60	0	327,1	70	65	4
22	102,5	75	75	0	96,6	79	72	7
23	54	80	80	0	68,6	81	76	5
24	24,6	70	70	0	19,4	70	61	9
25	39,5	50	45	5	29,7	50	44	6
26	23,2	90	90	0	26,0	94	93	2
27	34,6	85	80	5	34,9	90	86	5
28	15	80	80	0	12,1	77	73	4
29	6,1	80	75	5	6,9	82	78	4
30	4,55	62	59	3	3,1	59	56	3
31	7,9	34	32	2	6,2	26	24	2
32	65,75	40	40	0	63,3	55	21	34
33	20,6	46	25	21	14,6	19	16	3
34	52	21	8	13	39,8	7	5	2
35	113,5	35	35	0	103,6	42	35	7
36	27,7	35	25	10	15,7	29	24	4
37	50	65	65	0	46,3	80	71	9
38	157	25	20	5	110,4	34	31	3
39	53,5	45	40	5	38,2	38	34	5
40	99	40	40	0	86,2	35	31	4
41	15	25	22	3	11,9	23	21	2
42	157	40	35	5	79,3	33	29	4
43	32,4	45	40	5	36,6	40	34	6
44	22,6	60	60	0	30,4	50	44	6
45	115	50	50	0	82,0	44	39	5
46	8,3	37	20	17	6,8	26	24	2
47	56	55	55	0	41,8	50	47	4
48	1,37	36	30	6	1,8	39	28	12
49	12,3	25	20	5	7,6	18	16	2
50	6,7	19	13	6	5,8	13	9	4
51	36,5	15	10	5	24,0	20	5	15
52	18,6	10	10	0	15,8	7	3	4
53	52	20	15	5	42,1	17	11	7
54	171	40	35	5	138,4	42	36	7
55	122	60	60	0	106,9	61	53	8
56	71	15	15	0	25,5	17	8	10
57	11	55	55	0	8,7	43	35	8
58	52,5	40	10	30	40,1	7	3	4
59	48,5	35	25	10	30,4	29	21	8
60	21,8	15	10	5	17,1	14	12	2



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME

Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermiologie

Introduction : Lors du bilan d'infécondité d'un couple, le spermogramme est l'examen clé pour l'exploration des facteurs masculins. Devant la grande variabilité et le manque de standardisation de la méthode manuelle de référence (OMS 2010) et l'accréditation obligatoire pour tout laboratoire de biologie médicale, le développement de systèmes semi-automatisés d'analyse du sperme (CASA) est apparu comme une alternative plus précise.

Matériels et Méthodes : L'objectif principal de cette étude était la validation de méthode du système CASA Hamilton Thorne CEROS II® à travers une évaluation des critères de performance et une comparaison avec la méthode manuelle réalisée selon les recommandations de l'OMS 2010 pour l'analyse de la concentration et la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes.

Résultats : Les critères de performances sont jugés satisfaisants. L'incertitude de mesure élargie est de 1,5 à 6,0 millions/mL selon le niveau de concentration, de 2,2 à 6,1% pour la mobilité totale et 2,2 à 8,1% pour la mobilité progressive selon les valeurs. La comparaison de méthode avec le test de concordance de Bland-Altman et la droite de régression ont montré des résultats comparables. Des interférences ont été identifiées et leurs impacts sur les résultats peuvent être maîtrisés principalement grâce à la maîtrise des risques.

Conclusion : Le système CASA présente des performances satisfaisantes, supérieures à la méthode manuelle, notamment améliorées grâce à la détection du flagelle intégrée dans les algorithmes. Il répond plus facilement aux exigences qualité COFRAC qu'une méthode manuelle subjective et d'une forte variabilité. De plus, il permet une standardisation, une traçabilité et une comparaison interlaboratoires.

Mots clés : CASA, Validation de méthode, Qualité, Analyse de sperme, Concentration des spermatozoïdes, Mobilité des spermatozoïdes

ABSTRACT

Validation of a CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) system Hamilton Thorne CEROS II for routine semen analysis

Introduction: Semen analysis is fundamental in the assessment of male infertility. Despite high inter- and intra-operator variability and the lack of standardization, the standard manual sperm analysis is still the gold standard (WHO 2010). In the context of mandatory accreditation for any biomedical laboratory, emergence of computer aided semen analysis (CASA) systems is considered as a more precise alternative.

Materials and Methods: The aim of this study was to evaluate the CASA Hamilton Thorne CEROS II® system performance compared to the standard manual semen analysis according to the WHO guidelines for sperm assessment and the Cofrac accreditation guidelines.

Results: Repeatability, intermediate precision and accuracy were all acceptable. Uncertainty of measurement was about 1,5 to 6,0 millions/mL for sperm concentration, 2,2 to 6,1% for total motility and 2,2 to 8,1% for progressive motility depending on the values. Furthermore, Bland-Altman plots and regression analysis revealed good correlation and agreement between CASA system and standard manual semen analysis. Potential interferences were identified and their impact can be controlled using risks management.

Conclusion: In conclusion, CASA system achieves satisfactory performances, better than manual analysis, notably through the flagellum detection in the algorithms. In addition, CASA provides required qualities for Cofrac accreditation easier than a subjective manual method with high inter-operator variability. Moreover, CASA enables standardization, data traceability and inter-laboratory comparison.

Key words: CASA, Method validation, Quality, Semen analysis, Sperm count, Motility