

Mode d'emploi DIY

SPERMOGRAMME & CONTRACEPTION MASCULINE THERMIQUE

<i>Présentation</i>	<p>C'est un examen médical permettant d'analyser différentes caractéristiques du sperme. Il consiste à observer une goutte de sperme à l'aide d'un microscope pour y faire un comptage des spermatozoïdes et noter leurs caractéristiques.</p> <p>Non invasif, non douloureux, vous réaliserez cet examen régulièrement pour contrôler que votre concentration de spermatozoïdes est bien en-dessous du seuil contraceptif : concentration de spermatozoïdes < 1 million/ml (OMS 2007).</p>
<i>Indications dans le cadre de la CMT</i>	<ul style="list-style-type: none">• Le premier examen permet d'évaluer la qualité de votre sperme. Si ce dernier ne correspond pas aux normes définies par l'OMS¹, votre médecin vous orientera vers d'autres méthodes contraceptives.• Les 2 suivants se font à 2 ou 3 mois et à 3 semaines d'intervalles après avoir commencé le port du dispositif. Si votre concentration est < 1 million/ml, vous êtes contracepté. Sinon recommencez le contrôle le mois suivant.• Durant les 6 premiers mois, l'examen est mensuel, puis trimestriel.• Attention : En cas d'oubli ou d'irrégularité dans le port, continuez le protocole et prenez un autre contraceptif durant un mois puis faites l'examen.• A l'arrêt de cette contraception, utilisez une autre méthode de contraception et réalisez un examen au bout de 3 mois pour confirmer une reprise normale suivant les normes de l'OMS de votre fertilité avec votre médecin traitant.
<i>Comment vous préparer ?</i>	<p>Délai d'abstinence de 3 jours en général.</p> <p>Boire un litre d'eau la veille et un grand verre d'eau le jour même.</p>

Ce guide n'a qu'une valeur informative et indicative.

¹ WORLD HEALTH ORGANISATION. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth Edition, Genève, WHO, 2010

Aide mémoire : examen microscopique de l'éjaculat pour une concentration inférieure à 50000/ml

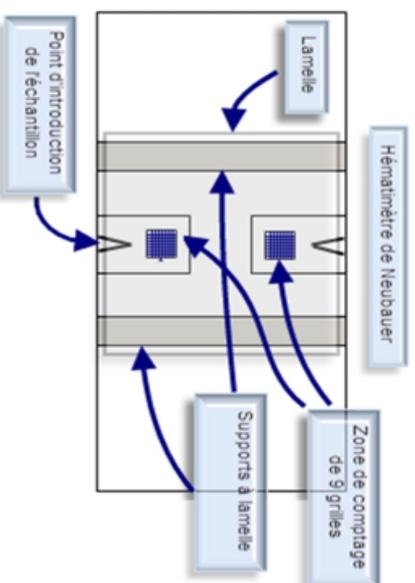
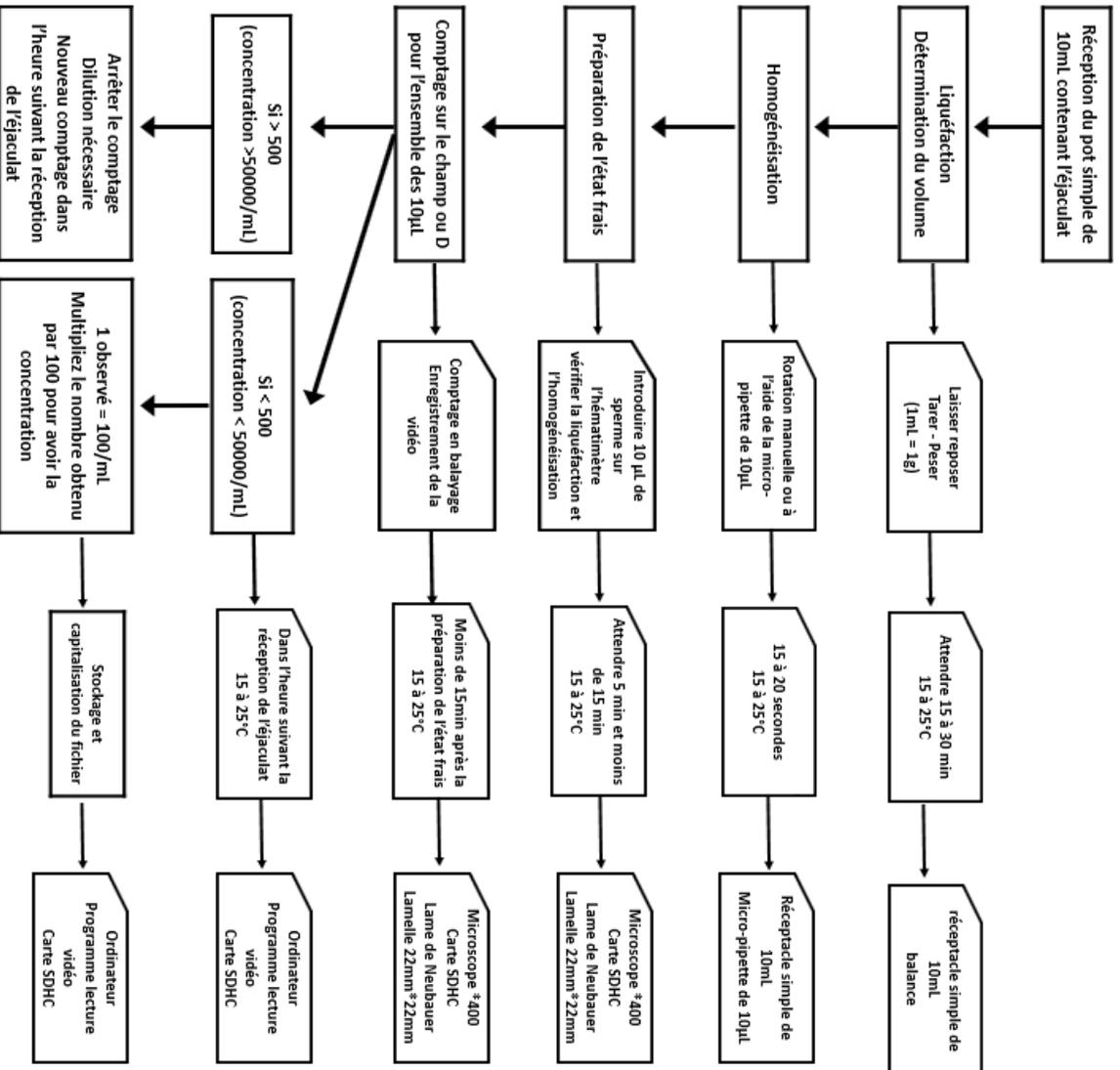


Figure 5: Hémétimètre de Neubauer

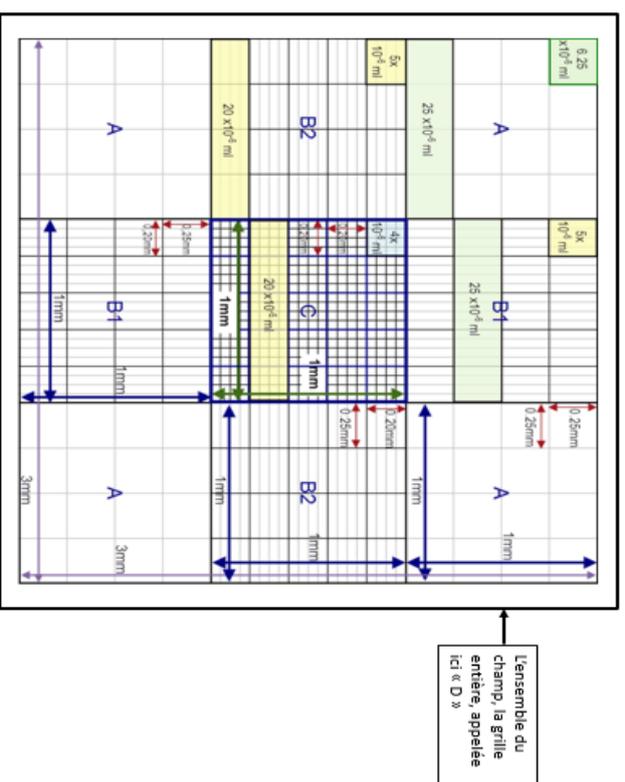


Figure 10 & 11: Zone de comptage de l'hémétimètre de Neubauer

Aide mémoire : examen microscopique de l'éjaculat pour une concentration supérieure à 50000/ml

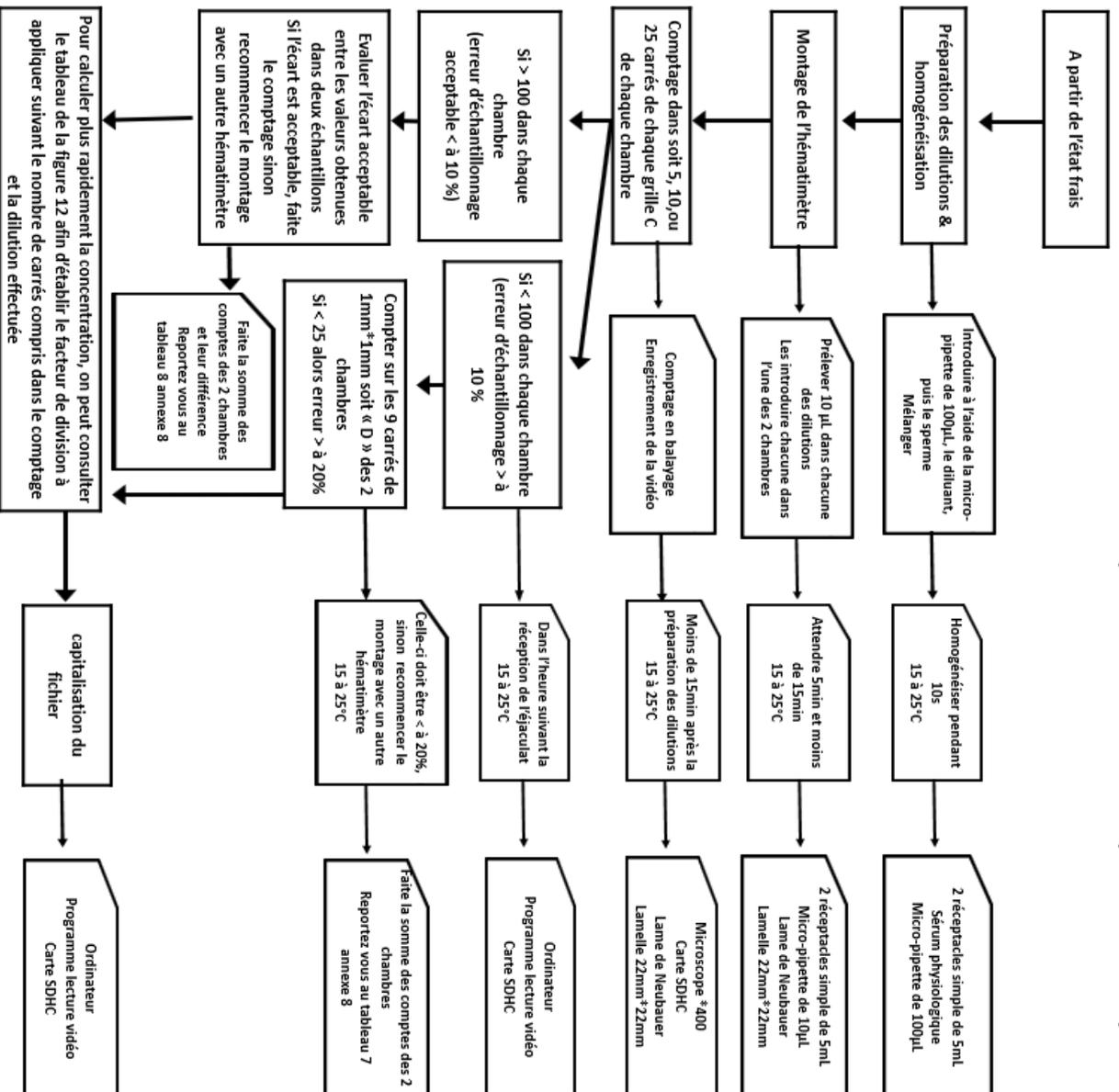


Figure 3 : Déplacement du champ de vision (balayage) permettant d'examiner toute la surface de la lamelle couvrant un volume connu de sperme.

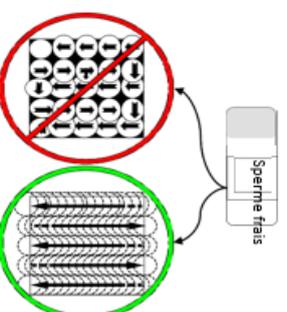
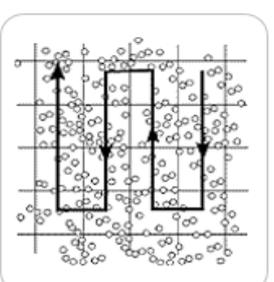


Figure 14 Comptage avec concentration cellulaire élevée.



Nbre de spermatozoïdes par champ, facteur de grossissement de 400	Dilution	Sperme (µl)	Diluant (µl)
Rare	1 : 2	100	100
Moins de 15	1 : 5	100	400
De 15 à 40	1 : 10	50	450
De 41 à 200	1 : 20	50	950
Plus de 200	1 : 50	50	2450

Figure 8 : Dilutions appropriées à l'évaluation de la concentration sur l'hématomètre de Neubauer

Dilution	N ^{bre} de carrés de la grille C (de chaque chambre) comptés dans le comptage			Ensemble du champ, la grille entière appelée « D »
	5	10	25	
	Facteur de division			
1 : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
1 : 10	4	8	20	180
1 : 20	2	4	10	90
1 : 50	0,8	1,6	4	36

Figure 12: Facteurs de division à appliquer au nombre total de spermatozoïdes comptés dans les deux chambres pour calculer la concentration (en x 10⁶/ml)

Table des matières

Matériel.....	5
Mise en main du microscope.....	6
Les composants du microscope & Première manipulation du microscope.....	6
Faire la préparation microscopique, mise au point, observation, rangement du microscope.....	8
Hygiène et prévention des risques d'exposition au liquide biologique.....	9
La stérilisation à l'eau bouillante.....	9
L'entretien.....	9
Lavage des mains avec la solution hydroalcoolique :.....	10
Déroulement.....	10
Données théoriques sur le spermogramme.....	11
Spermogramme.....	11
Données à récupérer.....	11
Pour Information :.....	12
Valeurs de référence selon le guide OMS 2010.....	12
Variabilité de la concentration chez un même sujet.....	13
Variabilité des caractéristiques spermatiques en fonction du délai d'abstinence.....	14
Morphologie du spermatozoïde.....	15
Manipulation du sperme et techniques préparatoires.....	16
Montage standard de l'hématimètre ou cellule de numération de Neubauer :.....	16
Liquéfaction de l'éjaculat.....	17
Homogénéisation de l'éjaculat.....	17
Préparation de l'état frais.....	17
Hématimètre de Neubauer.....	18
Choix de la dilution appropriée à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer.....	20
Evaluation de la concentration de spermatozoïdes.....	21
Homogénéisation et dilution de l'éjaculat.....	21
Montage de l'hématimètre et sédimentation des spermatozoïdes.....	21
Évaluation de la concentration.....	22
Comptage des spermatozoïdes dans chacun des échantillons préparés.....	22
Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons.....	25
Calcul de la concentration.....	25
Limite de détection.....	26
Annexes.....	27
Tableaux des écarts acceptables entre échantillons.....	27
Tableaux des écarts acceptables entre échantillons.....	28
Bibliographie.....	29

Matériel

Type	Quantité	Usage	Coût total	Hygiène
Lingette antiseptique	1 boîte de 100	Matériel à Usage unique	4 €	Non stérile. A conserver dans un endroit propre, à l'abri de la lumière.
Flacon d'eau physiologique stérile	1 boîte de 30 unidoses		8 €	
Compresse stériles	1 boîte de 20 sachets		4€	
Gants d'examen non poudrés	1 boîte de 100		4€	
Papiers lentilles	1 boîte de 30		8€	
Pointes stériles jetables	1 boîte		10€	
Flacon alcool à 70° modifié	1 flacon de 200 ml	Matériel réutilisable	3€	A stériliser avant utilisation et entre chaque nouveau prélèvement.
Solution hydroalcoolique	1 flacon de 75mL		3€	
Réceptacle simple pour recueil de tout l'éjaculat	1 boîte plastique de 10 mL avec couvercle		5€	
Balance numérique précision au gramme	1 neuve		20€	
Réceptacles simples pour faire les 2 échantillons dilués et le pot a sérum phy diluant	3 boîtes en plastiques de 5 mL		5€	
Micro-pipette laboratoire pouvant contenir 10 µl	1 de seconde main		35€	
Micro-pipette laboratoire pouvant contenir 100 µl	1 de seconde main	35€		
Lames Profondeur de champ 0,1 mm Surface des plus petits carrés 0,0025 mm ²	2 cellules de numération de Neubauer avec 100 lamelles couvre-objets		22€	
Carte SDHC	1 de 8 GB		7€	Non stérile, à conserver dans un endroit propre, à l'abri de la lumière.
Ordinateur	1 d'occasion avec lecteur carte SDHC et programme VLC de lecture vidéo		50€	
Microscope	1 BRESSER Microscope d'enseignement LCD 8.9cm (3.5"), 50-500x, 2000 (digital)		189€	
		Total	416€	

La réalisation du spermogramme a un coût non négligeable. Il est conseillé de mutualiser la collecte du matériel pour amortir le coût financier. La réunion de l'ensemble du matériel peut servir à plusieurs usagers durant plusieurs années.

Mise en main du microscope

Les composants du microscope & Première manipulation du microscope



Liste complète des divers éléments (graph. 1-5) :

- 1 Module d'écran
- 2 Écran LCD
- 3 Tube
- 4 Revolver porte-objectifs
- 5 Objectif
- 6 Lamelle porte-objet (ici : échantillon préparé)
- 7 Platine de microscope
- 8 Lentille collectrice
- 9 Éclairage LED (éclairage diascopique)
- 10 Pied du microscope
- 11 Témoin lumineux
- 12 Interrupteur marche-arrêt pour module d'écran
- 13 Éclairage LED pour éclairage épiscopique
(utiliser uniquement avec l'objectif 4x)
- 14 Table à mouvements croisés
- 15 Disque à filtre chromatique
- 16 Molette de mise au point
- 17 Raccordement électrique
- 18 Variateur
- 19 Sélecteur d'éclairage
- 20 Touches d'entrée
- 21 Touche de prise de vues
- 22 Touche de menu
- 23 commutateur
- 24 Échelles verniers
- 25 Vis de serrage
- 26 Molette avant/arrière de la table à mouvements croisés
- 27 Molette droite/gauche de la table à mouvements croisés
- 28 Levier pour dispositif de fixation par serrage
- 29 Dispositif de fixation par serrage
- 30 Diaphragme libre (sans filtre chromatique)
- 31 Filtre chromatique
- 32 Câble USB
- 33 Boîte de 10 lamelles porte-objet, 10 lamelles couvre-objet
et 5 préparations permanentes
- 34 A) Instruments de microscopie; B) Pipette; C) Pincette
- 35 Écloserie de crevettes
- 36 Microtome
- 37 Préparations: A) Levure; B) «Gum-media»; C) Sel de mer;
D) Œufs de crevettes

Il faut faire attention à votre microscope en le tenant avec précaution. Faites attention à ne pas poser vos doigts sur l'oculaire qui est très sensible. Il en est de même pour l'objectif et les préparations que vous aurez à observer pour éviter qu'ils se salissent et nuisent à l'observation.

Eviter les gestes brusques et au contraire prendre soigneusement le microscope par la potence, la poignée ou en soulevant le socle.

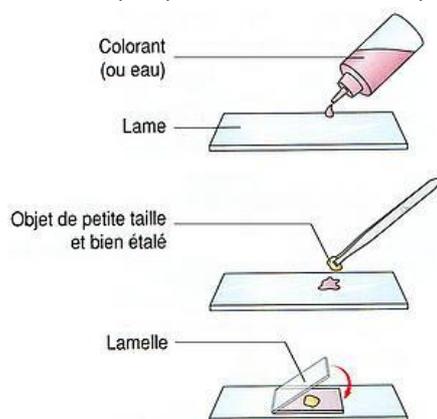
Maintenant allumer l'éclairage et le régler d'abord au maximum.

Ensuite, ouvrir complètement le diaphragme qui permet de régler l'intensité de la lumière. Bien sûr, ces réglages pourront être réajustés suivant l'observation à faire.

Le tube optique peut aussi être abaissé grâce aux vis macrométriques.

Attention : il faut toujours utiliser le plus petit objectif en premier.

Faire la préparation microscopique, mise au point, observation, rangement du microscope



La préparation est constituée d'une lame porte objets, d'une lamelle couvre objets ainsi que l'objet de petite taille à observer.

Déposer la préparation sur la platine, et passer à l'observation.

L'objet à observer est au centre de la platine, élever ensuite la platine au plus proche des objectifs. Faites attention à ce que la lame ne se casse pas.

Pour faire une mise au point au faible grossissement, en regardant dans l'oculaire, abaisser soigneusement la platine avec la vis macrométrique jusqu'à ce que l'objet à observer soit net. Pour améliorer la mise au point, faire un réglage avec la vis micrométrique. Vous pouvez ensuite faire les réglages de l'éclairage en fermant ou en ouvrant petit à petit le diaphragme.

Fixer la préparation grâce aux valets.

Utiliser les vis de déplacement d'avant en arrière et de droite à gauche.

Vous pouvez ensuite regarder votre objet à travers l'oculaire et changer d'objectif si vous en avez besoin. Par exemple si le grossissement n'est pas suffisant, choisissez l'objectif de grossissement supérieur. Refaire alors la mise au point avec la petite vis.

Pour calculer le grossissement, il faut multiplier le grossissement de l'oculaire par le grossissement de l'objectif.

Il faut remettre le microscope sur le plus petit objectif et rouvrir le diaphragme au maximum. Bien nettoyer le microscope surtout sur la platine et effacer les poussières qui auraient pu se déposer sur les lentilles. Pour ce faire,

utiliser le papier lentille préalablement imprégné d'alcool. Enfin, abaisser le tube optique et mettre le microscope dans sa housse ou son étui soigneusement.

Lorsque vous réaliserez votre examen, réglez la focale pour avoir une image nette. Puis balayez l'ensemble de la chambre de comptage lentement pour pouvoir effectuer un comptage différé. A la lecture de ce document, vous comprendrez qu'il est d'abord possible d'évaluer ce que vous voyez pour déterminer la pertinence de l'enregistrement.

Pour aller plus loin, rendez-vous sur :

<https://fr.wikihow.com/utiliser-un-microscope>

<https://www.bresser.de/fr/Microscopie/BRESSER-Microscope-d-enseignement-LCD-8-9cm-3-5.htm>

L'utilisation du microscope demande un temps d'adaptation pour pouvoir réaliser des observations de qualité. Gardez à l'esprit qu'un enregistrement vidéo vous permet, si le protocole est respecté, de pouvoir effectuer un comptage différé, donc de meilleure qualité qu'en direct.

Hygiène et prévention des risques d'exposition au liquide biologique

Le matériel que vous utilisez pour recueillir le sperme doit être stérilisé ou entretenu comme indiqué :

- 1 Réceptacle simple
- 1 Micro-pipette de 3 ml
- 1 Cellule de numération de Neubauer avec 1 lamelle couvre-objet

La stérilisation à l'eau bouillante

C'est le système le plus ancien et le plus simple :

- Prendre une cocotte-minute ou une grande casserole.
- La remplir d'eau aux trois quarts et la faire bouillir pendant au moins un quart d'heure, ou remplir un récipient avec 1/3 d'eau du robinet et 2/3 avec de l'eau préalablement chauffée à la bouilloire électrique.
- Plonger dedans le matériel durant 5 minutes (au-delà, il risque de se déformer).
- L'extraire de l'eau à l'aide de pince.
- Laissez sécher sur des compresses stériles.

L'entretien

- Essuyer délicatement avec un papier lentille pour enlever tout spermatozoïde ou débris.
- Désinfecter à l'alcool à 70° pour limiter le risque de contamination.
- Rincer à l'eau pour enlever le désinfectant.

Lavage des mains avec la solution hydroalcoolique :



N.B. Si vous devez effectuer un spermogramme d'une autre personne que vous, veillez à ne pas entrer en contact cutané. Portez des gants lorsque vous travaillez sur le sperme d'une autre personne.

Déroulement

Etape 1 : Préparation du matériel

Lavez-vous les mains une fois l'installation du matériel faite et la stérilisation du matériel réalisée,

Etape 2 : Recueil de l'éjaculat

Uriner avant d'effectuer le recueil.

Se laver les mains avec la solution hydroalcoolique.

Se désinfecter la verge à l'aide d'une lingette antiseptique.

Se rincer la verge à l'aide du flacon d'eau physiologique stérile de façon à éliminer les traces de désinfectant.

Sécher la verge avec une compresse stérile.

Se laver les mains avec la solution hydroalcoolique.

Ouvrir le réceptacle

Effectuer le recueil de sperme par masturbation dans le réceptacle stérile prévu à cet effet.

N.B. Il est capital de recevoir tout l'éjaculat, et surtout les premiers jets, car ceux-ci contiennent une quantité de spermatozoïdes plus importante que la fin de l'éjaculat. Si une partie n'est pas recueillie, il est préférable de recommencer en respectant un délai d'abstinence de 3 jours.

Bien reboucher le réceptacle

Se laver les mains à l'eau et au savon ou avec la solution hydroalcoolique.

Etape 3 : Prélèvement & observations au microscope & enregistrement vidéo

Mettez vos gants pour le prélèvement à la micro-pipette, la mise en place d'une goutte sur la lame de Neubauer, la pose de la lamelle couvre-objet, la lecture au microscope et l'enregistrement sur la carte SDHC.

Etape 4 : nettoyage du matériel

Gardez vos gants pour le nettoyage du matériel non stérile et la stérilisation du matériel ayant été en contact avec du sperme.

Etape 5 : Comptage & capitalisation données

Lavez-vous les mains. Il n'y a plus de risques d'exposition au liquide biologique (sperme). Récupérez la carte SDHC pour l'introduire dans l'ordinateur. Réalisez une première lecture avec vlc, puis commencez le comptage. Une fois celui-ci réalisé, enregistrez le fichier sur l'ordinateur ou autre en le nommant comme suit : année_mois_jour_nom ou pseudo_J nombre de jour de port depuis J0_nombre de spermatozoïdes_M_ml, y rajouter les informations suivantes au besoin : pathologie 3 mois précédents, épisodes fébriles, traitement en cours, âge.

Suivez le protocole et répétez-le, c'est en vous entraînant que vous acquérez les gestes et la technique. Au-delà du risque d'exposition au liquide biologique, une hygiène irréprochable est nécessaire pour ne pas contaminer l'échantillon et avoir une lecture de la meilleure qualité qui soit.

Données théoriques sur le spermogramme

Spermogramme

Données à récupérer

Volume : Quantité de sperme émis, il varie de 1.5 ml à 5 ml. L'aspect (couleur, viscosité) et le Ph sont des données recueillies en laboratoire. A l'aide d'une balance en gramme, pré-pesez le flacon avant d'y introduire le sperme recueilli. 1 ml de sperme correspondant à 1 gramme, Il est alors simple de déterminer le volume recueilli.

Numération : Elle comprend le comptage des différents éléments présents dans le sperme :

- Spermatozoïdes (million/mL), soit la concentration spermatique,
- Spermatozoïdes sur l'ensemble de l'éjaculat (millions), soit la numération spermatique,
- Cellules rondes (spermatides),
- Leucocytes,
- Hématies,

La concentration spermatique s'obtient en divisant la numération par le volume de l'éjaculat.

La seule donnée attestant d'un état contracepté chez un homme, actuellement, est le nombre de spermatozoïdes (million/mL). Le comptage se réalise à l'aide de la grille de lecture de la lame de Neubauer en comptant tous les spermatozoïdes présents quelques soient leurs mobilités. Ce comptage réalisé, à l'aide d'un simple calcul expliqué plus loin, vous obtiendrez une estimation de votre numération du jour. Il est important de réaliser au minimum 2 comptages 2 lames de Neubauer à partir de 2 gouttes différentes extraites à l'aide la micro-pipette, pour vérifier l'acceptabilité des écarts de mesures entre les différents comptages.

Pour Information :

Mobilité : Elle comprend 4 catégories en fonction du type de déplacement observé :

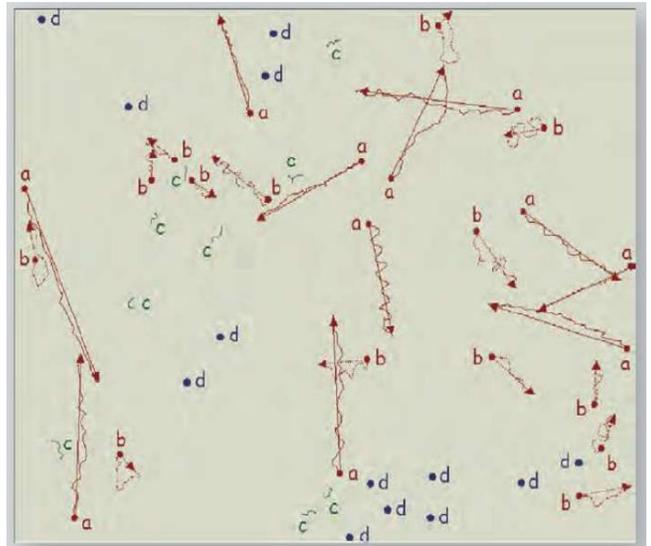
- Type A : progressive, rapide, rectiligne - Progressif
- Type B : progressive lente ou zigzag - Progressif
- Type C : mobilité sur place – Non progressif
- Type D : immobiles

En fonction du nombre de spermatozoïdes comptés, il est intéressant d'évaluer le pourcentage de ceux étant progressifs (A+B). Ce n'est pas indispensable, mais rappelez-vous que les progressifs ont des chances élevées de pouvoir féconder l'ovule.

Vitalité : C'est le pourcentage de spermatozoïdes vivants 1 heure après l'émission. Cet examen se réalise à l'aide d'un produit de contraste.

Morphologie normale des spermatozoïdes : Il existe différentes catégories d'anormalités :

- Anomalie de la tête (allongée, amincie, micro ou macrocéphale, multiple, irrégulière, acrosome anormal ou absent)
- Anomalies cytoplasmiques (reste cytoplasmique, pièce intermédiaire grêle ou épaisse, angulation)
- Anomalie du flagelle (absent, écourté, de calibre irrégulier, enroulé, multiples, isolé)



Il existe encore bien d'autres paramètres. Rappelez-vous que seule la concentration (million/mL) est nécessaire. Certes, l'évaluation de la mobilité et de la vitalité peuvent être des éléments intéressants à calculer, mais ils ne sont pas indispensables actuellement dans l'évaluation de votre pratique de la CMT.

Valeurs de référence selon le guide OMS 2010

CARACTERISTIQUES DU SPERME	VALEURS STANDARDS	VALEURS STANDARDS SOUS CONTRACEPTION MASCULINE THERMIQUE (après 3 mois de port)
VOLUME	> 1,5 ml	> 1,5 ml
CONCENTRATION	>15 millions/ml (seuil d'infertilité)	< 1 million/ml (seuil de contraception)
MOBILES PROGRESSIFS (A+B)	> 32%	< 10%
VITALITE (MOBILITE UNE HEURE APRES L'EJACULATION)	> 58%	< 40%
MORPHOLOGIE NORMALE DES SPERMATOZOIDES	> 4%	< 4%

Variabilité de la concentration chez un même sujet

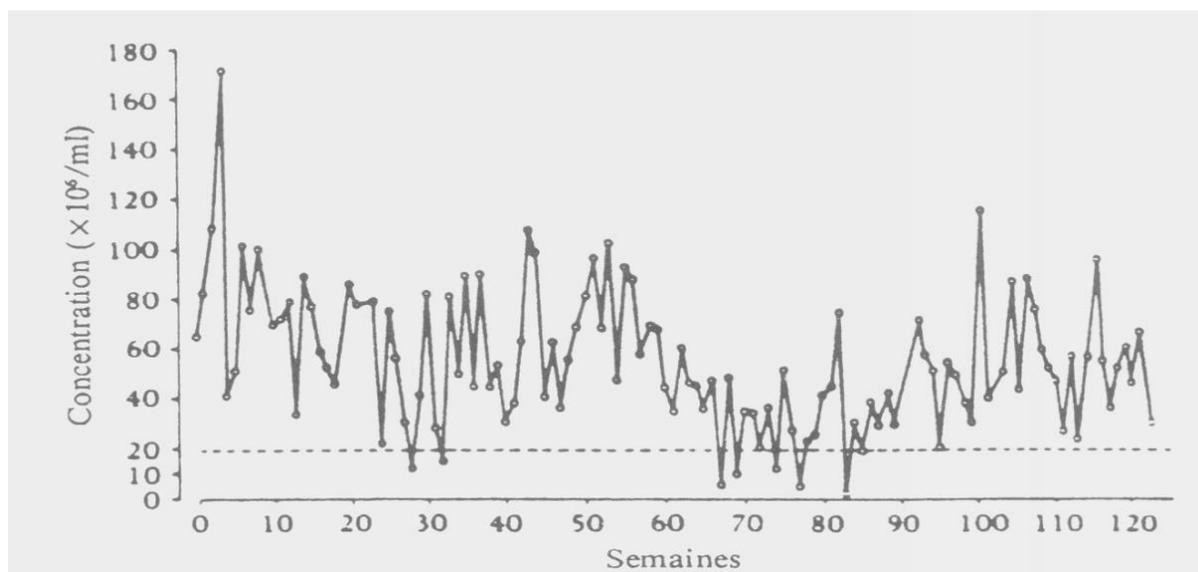


Figure 1 Concentration bihebdomadaire des spermatozoïdes chez un même sujet pendant une période de 120 semaines. Pendant cette période, le sujet n'a reçu aucun traitement et aucun épisode fébrile n'a été noté. (d'après Paulsen, OMS, 1992, données non publiées).

Ayez à l'esprit que votre concentration peut varier énormément sur quelques mois. Des paramètres comme l'âge (surtout au-delà de 50 ans), une pathologie survenue dans les 3 mois précédents, un épisode fébrile, la

prise de traitements ou encore la consommation de drogues peuvent diminuer la quantité et la qualité des spermatozoïdes. Sur tous les examens réalisés sur des hommes pratiquants la CMT, il n'a pas été observé de variations telles. A savoir, qu'un homme en dessous de 1 million/mL ne s'est jamais retrouvé au-dessus de ce seuil s'il respecte le protocole de la CMT. Il est probable que la mise au repos de la spermatogénèse par la CMT entraîne aussi une réduction de l'importance de la variabilité de la concentration.

Variabilité des caractéristiques spermatiques en fonction du délai d'abstinence

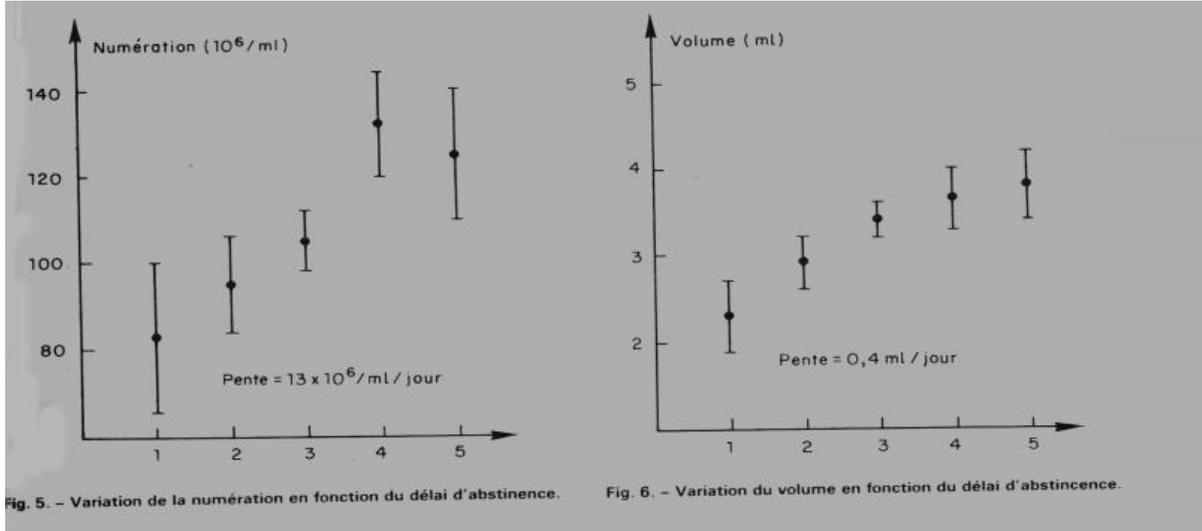


Figure 2 Variabilité des caractéristiques spermatiques en fonction du délai d'abstinence, Paulsen, données non publiées.

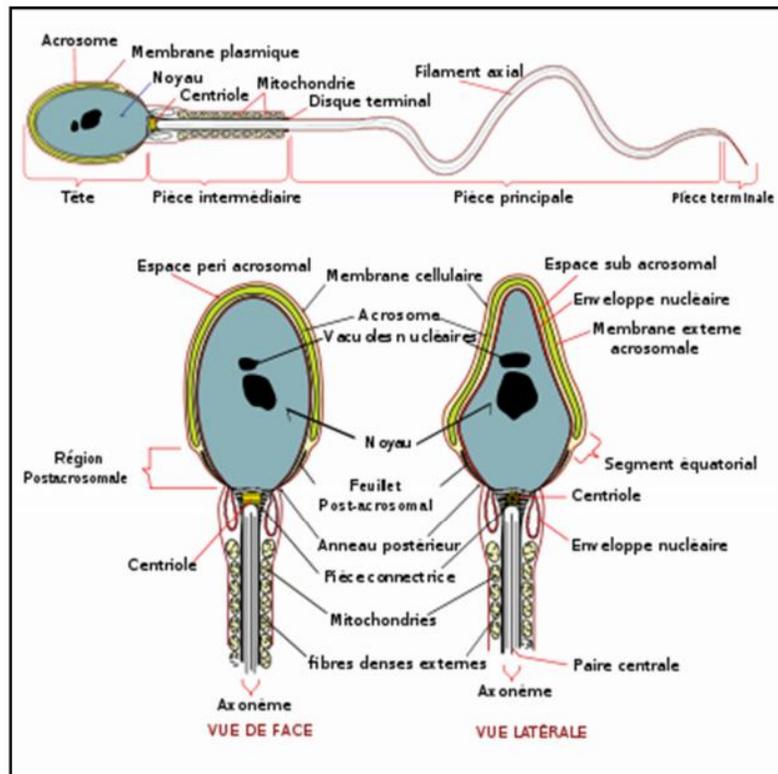
Le délai d'abstinence a un impact sur la concentration et le volume émis. Le délai de 3 jours est donc important à respecter.

Molécules impactants la spermatogénèse

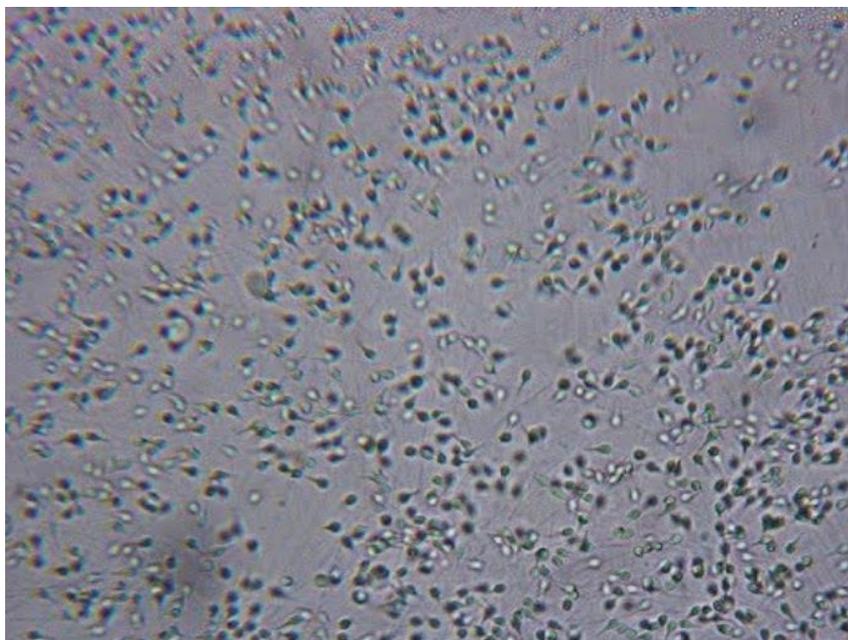
Familles	Molécules & dénominations commerciales pouvant altérer les paramètres spermatiques
Toxiques	Cannabis ; Cocaïne
Anti-amibiens de contact	Bemarsal
Antibiotiques	Bactrim ; furadantine
Antiépileptiques	Di-Hydan ; Dilantin
Antigoutteux	Colchicine ; Zyloric
Antihypertenseurs	Catapressan ; Aldomet ; Equibar ; Hydromet
Anti-inflammatoire	Salazopyrine
Antiulcéreux	Tagamet ; Edalène
Immunothérapies	Chloraminophène ; Stéréocyt ; Endoxan ; Thiothépa ; Misulban ; Méthotrexate ; Ledertrexate
Diurétiques	Aldactone ; Practon ; Rolactone ; Spiroctan
Androgènes	Falutal ; Lutéran ; Androcur ; Andractim ; Halotestin ; Proviron ; Androtardyl ; Lontanil ; Stérandryl ; Testostérone-retard ; Permastril
Hypolipémiants	Lipanthyl ; Befizal ; Lipanor ; Lipur ; Vasten ; Zocor
Régulateurs de l'humeurs	Humoryl ; Marsilid ; Namide ; Tylciprine ; Neurolithium ; Teralithe

Certaines molécules, traitements, pathologies, la fièvre et l'âge (surtout au-delà de 50 ans), peuvent réduire la qualité des valeurs spermatiques. Notez ces données lors du prélèvement est important ainsi que le respect du délai d'abstinence de 3 jours.

Morphologie du spermatozoïde



Ce que verrez au microscope sans la grille de comptage :



Ce que verrez au microscope BRESSER LCD 8.9cm grossissement *400 avec une partie d'un carré de la grille C de comptage Neubauer :

Ceci est un spermatozoïde



Le repérage des spermatozoïdes reste assez simple une fois que vous serez sensibilisé à leur forme caractéristique. Cela demande réellement une certaine implication que se développe par la pratique.

Manipulation du sperme et techniques préparatoires

Travaillez pour cette partie avec la Micro-pipette laboratoire pouvant contenir 10 μ l.

Idéalement conserver tout le long le sperme entre 15°C & 25°C ce qui peut correspondre à la température ambiante de la pièce.

Montage standard de l'hématimètre ou cellule de numération de Neubauer :

- Mettez-le couvre-objet sur l'hématimètre de Neubauer, et mettez-le en position horizontale sur la table, à un endroit où il est facile de manipuler la micro-pipette.
- Introduisez une pointe jetable à l'extrémité de la micro-pipette.
- Ajustez la micro-pipette (pouvant contenir 10 μ l) pour aspirer 10 μ l de liquide. Généralement cet ajustement se réalise en guidant le bouton du piston pour sélectionner le volume souhaité.
- Introduisez la pointe de la micro-pipette dans l'échantillon.
- Appuyez sur le piston doucement jusqu'à ce qu'il arrive à la fin de son parcours.

- Sortez la pointe de la micro-pipette de l'échantillon et maintenez-la toujours en position verticale pour l'emmener jusqu'à l'hématimètre de Neubauer.
- Mettez la pointe de la pipette au bord du couvre-objet, à l'extrémité de l'hématimètre de Neubauer. Il s'agit de laisser le liquide pénétrer entre la plaque et le couvre-objet depuis le côté par capillarité :
- Relâchez le piston document pendant que vous vérifiez que le liquide entre correctement et de manière uniforme dans l'hématimètre.
- Si apparaissent des bulles, ou que le couvre-objet ait bougé ou tout autre anomalie, répétez l'opération.

L'hématimètre de Neubauer est alors monté et prêt pour une lecture au microscope.

Cette procédure est valable à chaque fois que vous montez l'hématimètre de Neubauer d'un échantillon.

Liquéfaction de l'éjaculat

15 à 30 min après l'éjaculation, idéalement attendre 30 min mais peut prendre jusqu'à 1h. Tant que l'éjaculat n'est pas liquéfié, le mouvement des spermatozoïdes, l'homogénéité de l'échantillon et la capacité de bien effectuer les observations au microscope sont limitées. Une méthode simple pour valider la liquéfaction, est d'utiliser une pipette. Si le sperme prélevé dans la pipette s'écoule au goutte à goutte, la liquéfaction est complète, mais si l'écoulement est filant, visqueux, la liquéfaction est incomplète.

Homogénéisation de l'éjaculat

Soit par rotation du récipient : Faire tourner le contenant en décrivant des cercles avec le poignet pendant 15 à 20 secondes.

Ou à la micro-pipette : Aspirer et expulser délicatement l'échantillon (une dizaine de fois) avec la pipette en prenant soin d'éviter la formation des bulles.

Préparation de l'état frais

Introduction de l'échantillon de 10 μ l dans la plaque de Neubauer

Au microscope, examiner rapidement et systématiquement (mouvement de balayage) l'éjaculat à l'état frais afin d'éviter que la préparation ne sèche.

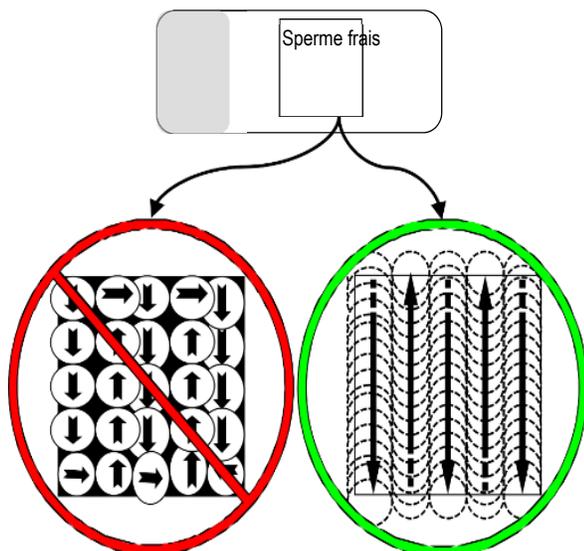


Figure 3 Déplacement du champ de vision (balayage) permettant d'examiner toute la surface de la lamelle couvrant un volume connu de sperme.

Si le nombre de spermatozoïdes par champ varie considérablement, c'est que l'échantillon n'est pas homogène. Il faut jeter la préparation et en refaire une autre en prêtant une attention particulière à l'homogénéisation. L'examen du sperme à l'état frais doit débiter dès que les éléments cellulaires du sperme ont cessé de dériver entre la lame et la lamelle.

Au microscope, on valide aussi la liquéfaction de la préparation de sperme à l'état frais. La présence de courants visqueux indique que la liquéfaction est incomplète et risque de compromettre le dénombrement. L'observation des courants visqueux, comme montrés sur la photo est délicate. S'en tenir à la technique du goutte à goutte pour vérifier la liquéfaction.

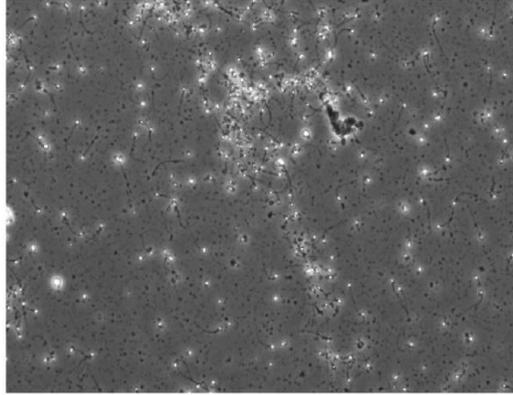


Figure 4 Courants visqueux visibles au microscope témoignant de la liquéfaction incomplète du sperme

Hématimètre de Neubauer

L'hématimètre de Neubauer demeure la chambre de comptage de référence pour évaluer manuellement la concentration des spermatozoïdes et la seule dont l'utilisation sera décrite dans le présent guide.

L'hématimètre de Neubauer est composé de deux chambres de comptage séparées, comprenant chacune une zone de comptage de 3 mm x 3 mm subdivisée en 9 carrés de 1 mm x 1 mm, chacune étant composée de carrés de taille connue (voir les figures 5 et 10). Il est utilisé avec une lamelle déposée sur un support intégré permettant d'obtenir un étalement d'épaisseur constante de 0,1 mm. En multipliant la surface d'un carré par l'épaisseur de l'étalement, on peut obtenir le volume de sperme dans ce carré et calculer la concentration en divisant le nombre de spermatozoïdes dénombrés dans un volume connu (concentration = nombre/volume).

Note : $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml} = 1 \mu\text{l}$.

Il faut compter les spermatozoïdes sur différentes sections de la zone de comptage, suivant la dilution effectuée et le nombre de spermatozoïdes à compter par échantillon

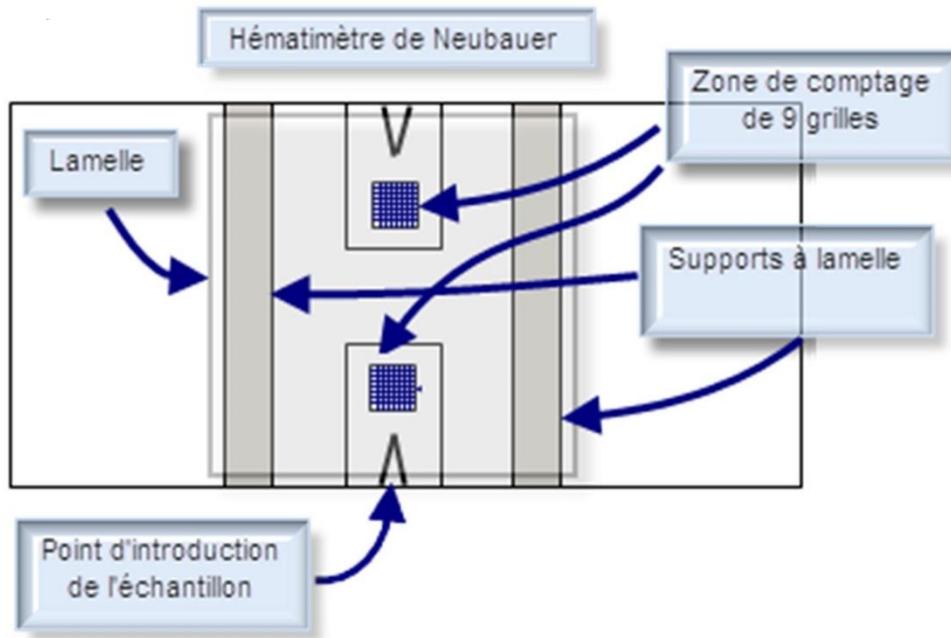


Figure 5 Hématimètre de Neubauer, vue de dessus

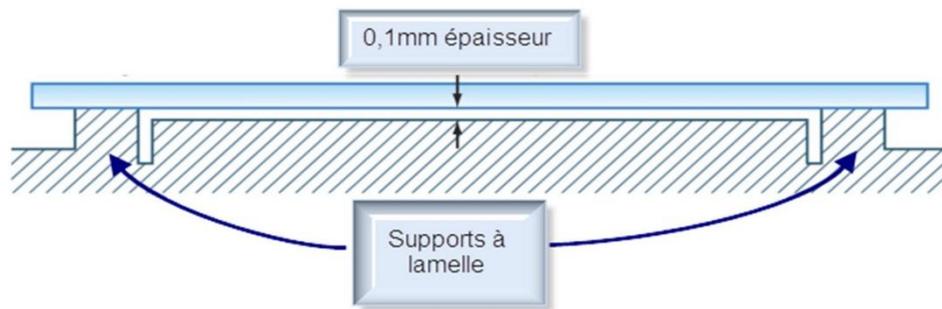


Figure 7 Hématimètre de Neubauer, vue de côté.

Choix de la dilution appropriée à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer

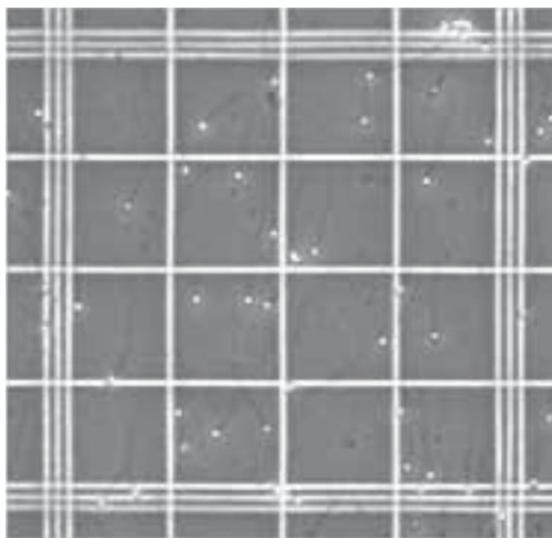


Figure 8 Un des 25 carrés de la zone de comptage centrale de la grille C, subdivisé en 16 autres carrés et bordé de 3 lignes parallèles.

Le sperme examiné sur l'hématimètre de Neubauer doit être dilué pour les raisons suivantes :

- Immobiliser les spermatozoïdes,
- Favoriser l'étalement par capillarité sous la lamelle en rendant le sperme moins visqueux,
- Faciliter le dénombrement quand les spermatozoïdes sont très nombreux et se superposent,
- Faciliter le dénombrement quand l'échantillon contient beaucoup de débris.

Le nombre de spermatozoïdes par champ, évalué dans 10 μl de sperme à l'état frais étalé sous une lamelle de 22 mm x 22 mm, guide le choix de la dilution appropriée au montage de l'hématimètre de Neubauer (tableau de la figure 9) en vue de compter au moins 100 spermatozoïdes par échantillon. La dilution se fait avec du sérum physiologique.

Nbre de spermatozoïdes par champ, facteur de grossissement de 400	Dilution	Sperme (μl)	Diluant (μl)
Rare	1 : 2	100	100
Moins de 15	1 : 5	100	400
De 15 à 40	1 : 10	50	450
De 41 à 200	1 : 20	50	950
Plus de 200	1 : 50	50	2450

Figure 9 Dilutions appropriées à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer.

Evaluation de la concentration de spermatozoïdes

Travaillez pour cette partie avec la Micro-pipette laboratoire pouvant contenir 100 μ l.

La concentration désigne le nombre de spermatozoïdes, exprimé en millions, dans un millilitre ($n^{\text{bre}} \times 10^6/\text{ml}$) d'éjaculat.

Il faut savoir que, si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, la pertinence de l'évaluation de la vitalité et de la morphologie peut être mise en doute. Une précision de 20% est considérée comme acceptable en cas de limites inférieures à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$. Les erreurs entre 20% et 30% sont communes avec cette méthode de comptage dues à la manipulation de la micro-pipette, aux erreurs statistiques pour avoir un échantillon peu représentatif, erreurs de volume de l'échantillon réellement introduit sur la plaque, etc.

Homogénéisation et dilution de l'éjaculat

Étant donné la nature visqueuse du sperme et le volume relativement faible des échantillons dilués, il est primordial de bien homogénéiser le sperme avant de prélever le volume désiré pour faire la dilution. Les deux chambres de comptage de l'hématimètre de Neubauer permettent de faire le comptage sur deux échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat. Pour diminuer le risque d'erreur, on dilue les deux échantillons séparément, dans deux tubes différents (c.-à-d. que l'on ne remplit pas les deux chambres de comptage avec des échantillons provenant d'une même dilution, et on n'effectue pas le comptage deux fois dans la même chambre, sinon on ne pourrait pas détecter les erreurs d'échantillonnage, d'homogénéisation ou de dilution).

Les dilutions peuvent être faites dans des tubes de 5 ml propres (verre ou plastique). Déposer d'abord le diluant, puis le sperme dans le tube de dilution. Avant de transférer le liquide ou le sperme dans le tube de dilution, essuyer l'extérieur de la micro-pipette en prenant soin de ne pas toucher l'ouverture de l'embout pour ne pas absorber de liquide avec le papier. Pour récupérer tout le sperme, rincer l'embout de la micro-pipette dans le diluant (sérum physiologique) en aspirant et en expulsant à quelques reprises.

Si on prévoit un délai entre la préparation de la dilution et le montage de l'hématimètre, il faut prendre des précautions pour éviter l'évaporation.

Montage de l'hématimètre et sédimentation des spermatozoïdes

Bien mélanger la première dilution en l'agitant une dizaine de secondes ou à la micro-pipette. Prélever immédiatement 10 μ l de la dilution et porter le bout de la micro-pipette au point d'introduction de l'hématimètre sans toucher la lamelle. Faire attention de ne pas surcharger ni de soulever la lamelle, sous peine de modifier l'épaisseur de l'étalement.

Répéter l'opération avec la deuxième dilution dans la seconde chambre. Manipuler délicatement l'hématimètre pour éviter de déplacer la lamelle et le laisser à l'horizontale.

Laisser sédimenter les spermatozoïdes à la température ambiante pendant au moins 4 minutes, mais pas plus de 15 minutes, sinon la préparation va sécher et la concentration des spermatozoïdes s'en trouvera plus élevée.

Évaluation de la concentration

Rappelez vous qu'il faut au minimum réaliser 2 comptages sur 2 chambres à partir de deux gouttes différentes de l'échantillon.

Absence de spermatozoïdes dans le sperme frais

Si aucun spermatozoïde n'est observé après l'examen de la lame complète.

Moins de 500 spermatozoïdes dans le sperme frais

Si on dénombre moins de 500 spermatozoïdes à l'examen de la lame complète ou sur les 9 carrés C, noter le nombre de spermatozoïdes observés dans 10 µl de sperme frais (non dilué).

Si on étale le sperme frais sur la lame conformément aux instructions et que l'on fait l'examen de la lame complète, on peut évaluer la concentration par ml comme suit :

Un spermatozoïde observé = 100 spermatozoïdes/ml = $0,0001 \times 10^{-6}/\text{ml}$

Exemple : 12 spermatozoïdes dans 10 µl de sperme équivalent à 1200 spermatozoïdes par ml ($0,0012 \times 10^6/\text{ml}$).

Le seuil de 500 spermatozoïdes a été établi comme suit : comme la présence de 1 spermatozoïde sur une lame de 10 µl équivaut à environ 100 spermatozoïdes par ml, la présence de 500 spermatozoïdes sur la même lame correspond à une concentration de 50 000 spermatozoïdes par ml. La méthode de comptage à l'hématimètre présentée comporte une limite de détection de 56 000 spermatozoïdes par ml. Le seuil de 500 spermatozoïdes dans 10 µl permet donc d'évaluer la concentration, même sous la limite de détection de l'hématimètre.

Au moins 500 spermatozoïdes dans le sperme frais

Dès que l'on atteint le chiffre de 500 spermatozoïdes sur la lame de 10 µl, il faut cesser de compter les spermatozoïdes. Ne pas rapporter le nombre de spermatozoïdes sur cette lame et passer immédiatement au dénombrement sur hématimètre. Seul le résultat du dénombrement sur hématimètre sera rapporté.

Comptage des spermatozoïdes dans chacun des échantillons préparés

Procéder au dénombrement sans délai ni interruption dès que le délai de 4 minutes est passé et pas au-delà de 15 minutes d'attente.

Il est admis que l'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillon et donc une erreur d'échantillonnage de 7,1 % suffisent à assurer la qualité de l'analyse.

Le dénombrement se fait sous grossissement total de 200 ou 400.

La décision de compter un spermatozoïde ou non dépend de la position de sa tête, sans égard pour l'orientation du flagelle. La limite d'un carré correspond à la ligne centrale des trois lignes parallèles qui en bordent les côtés. On compte le spermatozoïde si la plus grande partie de sa tête se trouve entre les deux lignes internes de la bordure à trois lignes. On ne le compte pas si la plus grande partie de sa tête se trouve entre les deux lignes externes de la bordure à trois lignes.

Si la plus grande partie de la tête du spermatozoïde se trouve sur la ligne centrale, on ne comptera que les spermatozoïdes touchant les bordures de deux côtés du carré, par convention, le côté gauche et le côté inférieur (figure 9), pour éviter de compter le même spermatozoïde deux fois dans des carrés

adjacents.

Pour compter les spermatozoïdes touchant les bordures de la grille, voir explications ci-dessus. Les

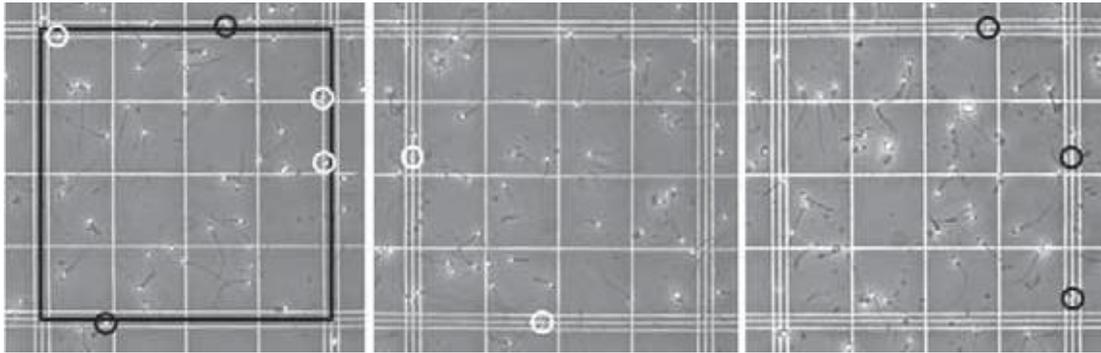


Figure 10 Spermatozoïdes à compter dans un carré de la grille C (délimitée par une bordure à 3 lignes).

spermatozoïdes encerclés en noir ne sont pas comptés alors que les spermatozoïdes encerclés en blanc le sont.

Compter les spermatozoïdes dans 5, 10 ou 25 carrés de la grille C (voir la figure 10 et 11) jusqu'à concurrence d'au moins 100 spermatozoïdes (maximum de 25 carrés, que l'on atteigne 100 spermatozoïdes ou non). Passer à la deuxième chambre de comptage de l'hématimètre et compter les spermatozoïdes dans le même nombre de carrés de la grille C (donc le même volume) que pour le premier échantillon, même si le nombre final de spermatozoïdes comptés est inférieur à 100. Chaque carré de la grille C a un volume de 4×10^{-6} ml.

Si la concentration cellulaire est très élevée, il est facile de se perdre dans le comptage, il est utilisé un ordre de comptage en forme de zigzag comme décrit dans la Fig. 7 et 12.

- Notez sur une feuille les résultats de la quantité de cellules comptées dans le premier cadre.
- Renouvelez le processus pour les autres cadres que vous souhaitez compter, notez le résultat de chacun d'eux. Plus vous comptez de cadres et plus la mesure obtenue sera précise.

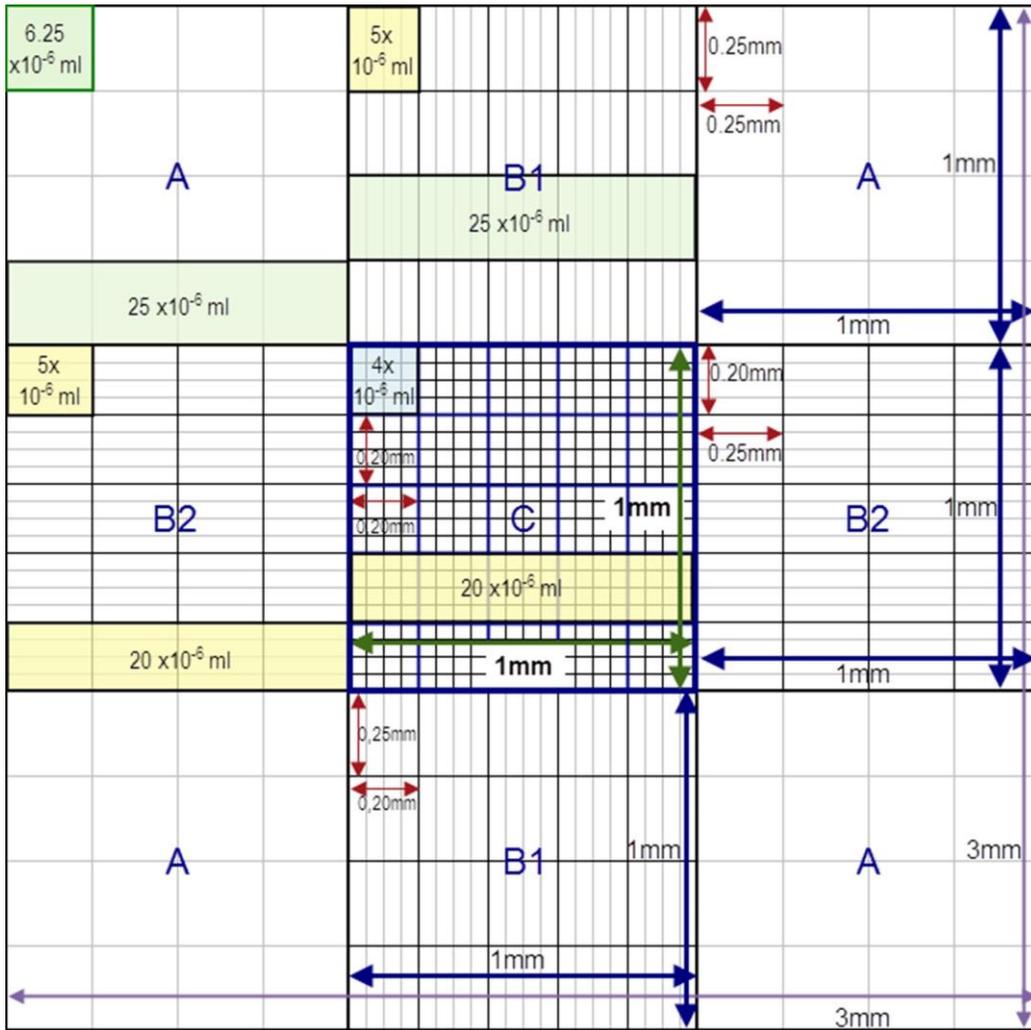


Figure 11 Zone de comptage de la chambre de l'hématimètre de Neubauer.

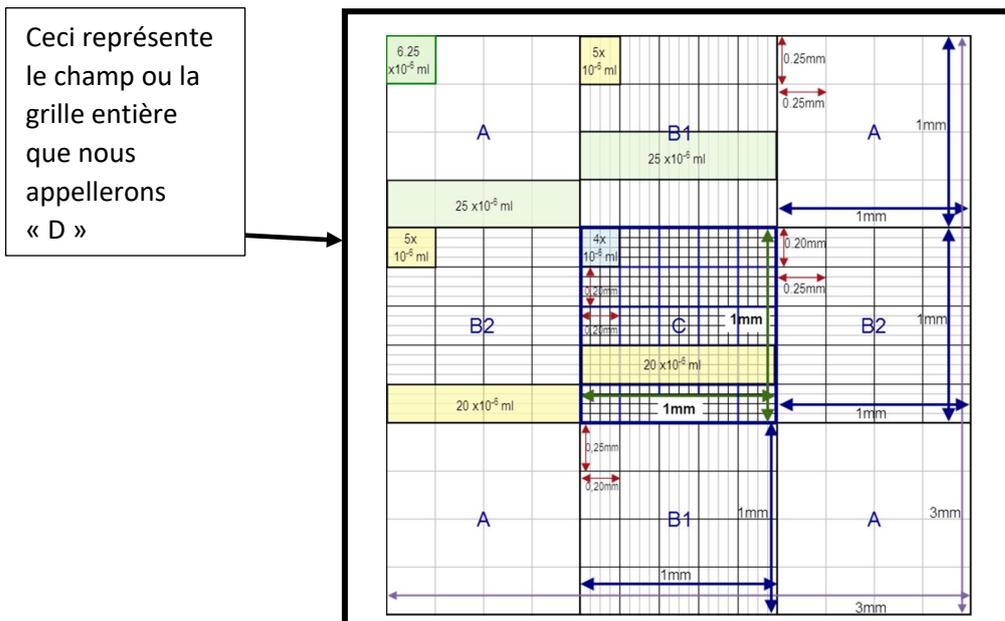


Figure 12 Zone de comptage de la chambre de

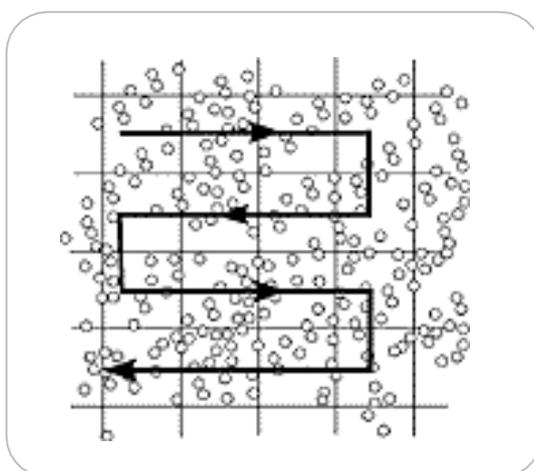


Figure 13 Comptage avec concentration cellulaire élevée.

Toutefois, si on compte moins de 100 spermatozoïdes par échantillon dilué à 1:2, l'erreur d'échantillonnage sera plus grande et le degré de certitude, plus faible. Dans ce cas, il faut examiner les 9 carrés de 1 mm x 1 mm des 2 chambres de comptage (voir figure 11) pour tenter d'obtenir une erreur d'échantillonnage acceptable (20 %).

Calculer la somme des deux comptes (p. ex., 1er échantillon : 75 spermatozoïdes dans les 9 carrés de 1 mm x 1 mm ; 2e échantillon 70 spermatozoïdes dans 9 carrés de 1 mm x 1 mm de la deuxième chambre, totalisant 145).

Voir le tableau 1 de l'annexe pour se renseigner sur le pourcentage d'erreur d'échantillonnage suivant le nombre de spermatozoïdes comptés, si celui-ci est inférieur à 20%, l'erreur d'échantillonnage est considérée comme acceptable.

Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons

Calculer la somme et la différence des deux comptes (p. ex., 1er échantillon : 126 spermatozoïdes dans 10 carrés de la grille C ; 2e échantillon 134 spermatozoïdes dans 10 carrés de la grille C de la deuxième chambre, totalisant 260. Différence entre les deux comptes : 8).

Établir l'acceptabilité de l'écart entre les nombres en consultant le tableau 2 de l'annexe.

Exemple. : Pour 260 spermatozoïdes, la différence acceptable est de 32 ; la différence obtenue ici, de 8, étant inférieure à 32, est acceptable et on peut passer au calcul de la concentration.

Si la différence est trop grande pour être acceptée, il est recommandé de refaire les deux dilutions en prenant soin de bien homogénéiser le sperme à chaque étape, et de refaire le comptage. Répéter cette procédure jusqu'à deux fois (trois séries de deux échantillons). Si l'écart est encore trop grand après trois séries (éjaculat particulièrement visqueux et hétérogène), faire la moyenne des six nombres obtenus.

Calcul de la concentration

La concentration (C) de spermatozoïdes est égale au nombre (N) de spermatozoïdes divisés par le volume (V) de sperme dans lequel ils ont été comptés, multiplié par le facteur de dilution (D).

Exemple :

- $D = 20$ (dilution de 1 : 20).
- $N = 260$ (1re chambre = 126, 2e chambre = 134).
- $V = 10$ carrés (x 2 échantillons) de 4×10^{-6} ml chacun, totalisant 80×10^{-6} ml.
- $C = (N/V) \times D$ ($260/80 \times 10^{-6}$) $\times 20 = 65 \times 10^{-6}$ par ml.

Dilution	N ^{bre} de carrés de la grille C (de chaque chambre) compris dans le comptage			L'ensemble du champ, la grille entière appelée « D »
	5	10	25	
	Facteur de division			
1 : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
1 : 10	4	8	20	180
1 : 20	2	4	10	90
1 : 50	0,8	1,6	4	36

Figure 14 Facteurs de division à appliquer au nombre total de spermatozoïdes comptés dans les deux chambres pour calculer la concentration (en $\times 10^{-6}/\text{ml}$).

Pour calculer plus rapidement la concentration, on peut consulter le tableau de la figure 12 afin d'établir le facteur de division à appliquer suivant le nombre de carrés compris dans le comptage et la dilution effectuée.

Reprenons l'exemple précédent :

- $N = 260$ (2 chambres)
- Facteur de division = 4 (intersection de la colonne 10 carrés et de la ligne dilution de 1 : 20)
- $N/\text{Facteur de division} = C$
- $260/4 = 65$
- $C = 65 \times 10^6/\text{ml}$

Limite de détection

La méthode proposée comporte une limite de détection de 56 000 spermatozoïdes par ml (pour que l'erreur d'échantillonnage ne dépasse pas 20 %). Donc, cette méthode est imprécise s'il y a moins de 25 spermatozoïdes par chambre de comptage (total de 50 spermatozoïdes)

Annexes

Tableaux des écarts acceptables entre échantillons

Le tableau 1 sert à calculer l'erreur d'échantillonnage suivant le nombre de spermatozoïdes comptés à l'hématimètre.

Tableau 1. Erreur d'échantillonnage arrondie (%) selon le nombre total de spermatozoïdes

Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)	Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)	Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)
1	100	25	20	88	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

¹ WORLD HEALTH ORGANISATION. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth Edition, Genève, WHO, 2010

Exemple : On compte 100 spermatozoïdes dans chaque chambre de l'hématimètre. D'après le tableau 7, l'erreur d'échantillonnage est de 7,1 % pour 200 spermatozoïdes.

Tableaux des écarts acceptables entre échantillons

Le tableau 2 sert à établir l'acceptabilité de l'écart de nombre de spermatozoïdes comptés dans deux échantillons à l'hématimètre.

Tableau 2. Écart acceptable entre les valeurs obtenues dans deux échantillons, compte tenu du nombre total de spermatozoïdes

Total	Différence*	Total	Différence*	Total	Différence*
35 à 40	12	144 à 156	24	329 à 346	36
41 à 47	13	157 à 169	25	347 à 366	37
48 à 54	14	170 à 182	26	367 à 385	38
55 à 62	15	183 à 196	27	386 à 406	39
63 à 70	16	197 à 211	28	407 à 426	40
71 à 79	17	212 à 226	29	427 à 448	41
80 à 89	18	227 à 242	30	449 à 470	42
90 à 98	19	243 à 258	31	471 à 492	43
99 à 109	20	259 à 274	32	493 à 515	44
110 à 120	21	275 à 292	33	516 à 538	45
121 à 131	22	293 à 309	34	539 à 562	46
132 à 143	23	310 à 328	35	563 à 587	47

*Basé sur un intervalle de confiance arrondi de 95 %.

¹ WORLD HEALTH ORGANISATION. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth Edition, Genève, WHO, 2010

Exemple : Premier échantillon : 126 spermatozoïdes; deuxième échantillon: 134 spermatozoïdes, totalisant 260. Différence de 8.

D'après le tableau 8, pour un total de 260 spermatozoïdes, l'écart doit être égal ou inférieur à 32. L'écart de 8 est donc acceptable.

Bibliographie

WORLD HEALTH ORGANISATION. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Fifth Edition, Genève, WHO, 2010.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO15189:2012(F) Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence*, troisième édition (version corrigée 2014-08-15), Genève, ISO, 2012.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Conformité des laboratoires de biologie médicale à la norme CAN/CSA-15189 "Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence"*. 2005-03-21.

ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale: Règles de pratique*, deuxième édition, Montréal, OPTMQ, 2009.

ASSOCIATION CANADIENNE DE NORMALISATION. *CAN/CSA-Z15190 Medical laboratories - Requirements for safety (Laboratoires de médecine - Exigences pour la sécurité)*, Mississauga, Association canadienne de normalisation, 2005.

GRUPE CSA. *Z316.7-12 Établissements effectuant la collecte d'échantillons primaires et laboratoires d'analyses de biologie médicale – Sécurité du patient et qualité des soins – Exigences pour la collecte, le transport et la conservation des échantillons*, Mississauga, Groupe CSA, Mise à jour No 1 mars 2014.

CHROMSRIMEK, Natta, et autres. « Effect of Time between Ejaculation and Analysis on Sperm Motility », *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, avril 2008, Vol. 16, No 2.

SUCKCHAROEN N., et autres. « A comparison of Mackler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement », *J Med Assoc Thai*, septembre 1994, Vol. 77, No 9.

CHRISTENSEN, P., et autres. « Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers », *Theriogenology*, mars 2005, Vol. 63, No 4.

HAMAMAH, S. et BARTHELEMY, C. Spermogramme et tests de fécondance: Intérêt et limites. *JTA Chapitre V- Fertilité et stérilité masculine*.

KRUGER, Thinus F. et FRANKEN, Daniel R. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*, London, *Taylor & Francis*, CRC press, 2004, 86.

COOPER, T.G., et autres. « Azoospermia: Virtual Reality or Possible to Quantify? », *Journal of Andrology*, 2006, Vol. 27, No 4.

KORTHORST, Ruben A., et autres. « Clearance after vasectomy with a single semen sample containing < than 100 000 immotile sperm/mL: analysis of 1073 patients », *BJU International*, 2009, Vol. 10.