



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**UTILISATION DE L'ANALYSE SPERMATIQUE ASSISTEE PAR  
ORDINATEUR (CASA) EN REPRODUCTION  
DES ANIMAUX DOMESTIQUES**

Présenté par  
**BOURAHMOUNE Dalia**

**Devant le jury :**

|                    |           |     |      |
|--------------------|-----------|-----|------|
| <b>Président :</b> | YAHIMI A. | MCB | ISVB |
| <b>Examineur :</b> | DJOUDI M. | MCB | ISVB |
| <b>Promoteur :</b> | BELALA R. | MCA | ISVB |

**Année : 2019/2020**

# Remerciements :

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu, le tout puissant qui m'a donné la santé et la volonté pour arriver à ce stade.

Mes vifs remerciements vont à tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin à réaliser ce travail, en particulier, mon promoteur, Mr. BELALA chargé de cours au centre universitaire de Blida pour son aide, ces conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire de biotechnologie de la reproduction qui m'a assisté tout le long de ce travail.

- B DALIA

## Dédicaces:

Je dédie ce travail à mes très chers parents,

Ma soeur,

Mes amies,

Et à tous ceux qui y trouveront intérêt.

# Résumé:

L'analyse spermatique assisté par ordinateur(CASA) se fait une place dans les laboratoires de biotechnologie de la reproduction chez les animaux domestiques, alors que certain doute toujours de son efficacité, ce travail vise à explorer les différents usages de CASA au cours des vingt dernières années.

Le problème principal est lié à la standardisation et à l'optimisation des équipements et des procédures. Les différents instruments CASA ont tous démontré des niveaux élevés de précision et de fiabilité en utilisant différentes méthodes de classification des spermatozoïdes. Leur disponibilité nous donne un excellent outil pour comparer objectivement la motilité et la morphologie des spermatozoïdes et pour améliorer nos connaissances et notre capacité à les manipuler.

Mots clés: Analyse spermatique assisté par ordinateur(CASA), applications cliniques, animaux domestiques

# Abstract:

Computer-assisted sperm analysis (CASA) is making a place for itself in the laboratories of reproductive biotechnology in domestic animals while some still doubt its effectiveness, this work aims to explore the different uses of CASA over the past twenty years.

The main problem is related to the standardization and optimization of the equipment and procedures. The different CASA instruments have all demonstrated high levels of precision and reliability using different sperm classification methodology. Their availability gives us a great tool to objectively compare sperm motility and morphology and to improve our knowledge and ability to manipulate spermatozoa.

Key-words: Computer aided sperm analysis (CASA), clinical applications, domestic animals

## ملخص:

تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر (CASA) يجعل مكاناً لنفسه في مختبرات التكنولوجيا الحيوية الإيجابية في الحيوانات الأليفة بينما لا يزال البعض يشك في فعاليته ، ويهدف هذا العمل إلى استكشاف الاستخدامات المختلفة لـ CASA على مدار العشرين عاماً الماضية.

وتتعلق المشكلة الرئيسية بتوحيد وتحسين المعدات والإجراءات. أظهرت جميع أدوات CASA المختلفة مستويات عالية من الدقة والموثوقية باستخدام منهجية مختلفة لتصنيف الحيوانات المنوية. يمنحنا توفرها أداة رائعة للمقارنة الموضوعية بين حركة الحيوانات المنوية وتشكلها ولتحسين معرفتنا وقدرتنا على التعامل مع الحيوانات المنوية.

الكلمات المفتاحية: تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الحاسوب (CASA) ، التطبيقات السريرية ، الحيوانات الأليفة

## Listes des Figures :

**Figure 01:** Equipement pour L'analyse Spermatique assistée par ordinateur, CASA, Hamillton Thorn IVOS II

**Figure 02:** Les principales mesures cinématiques impliquées dans le suivi des spermatozoïdes.  
Modifié à partir de l'OMS, 2010.

## Liste des Abréviations :

**ALH** : Amplitude of lateral head displacement  
**ART**: Assisted Reproductive Technology  
**BCF**: Beat/cross frequency  
**CASA**: Computer-aided sperm analysis  
**CAT**: Catalase  
**DNA**: Deoxyribonucleic acid  
**ESHRE**: European Society of Human Reproduction and Embryology  
**FC**: Frequence de capture  
**FITC**: Fluorescein isothiocyanate  
**G**: Gramme  
**HREC**: Health Research Ethics Committee  
**ICSI**: Intracytoplasmic Sperm Injection  
**ISNT**: Situ nick translation  
**IUI**: Intrauterine insemination  
**IVF**: In vitro fertilization  
**L**: Litre  
**LIN**: Linearity  
**MAD**: Mean angular displacement  
**MDA** : Malondialdehyde  
**Min** : Minute  
**µM** : Millimolar  
**NAFA** : Nordic Association for Andrology  
**nm**: Nanometre  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**ROS**: Reactive Oxygen Species  
**SCA®**: Sperm Class Analyzer  
**SCD**: Sperm chromatin dispersion test  
**SCSA**: Sperm chromatin structure assay  
**SD**: Standard D  
**SPMI**: seminal plasma motility inhibitor  
**STR**: Straightness  
**SURRG**: Stellenbosch University Reproductive Research Group  
**TAC**: total antioxidant capacity  
**VAP**: Average-path velocity  
**VCL**: Curvilinear velocity  
**VSL**: Straight-line velocity  
**WOB** : Wobble

## Table Des Matières :

|  |    |
|--|----|
| <b>Remerciements :</b> .....   | 2  |
| <b>Dédicaces:</b> .....  | 3  |
| <b>Listes des Figures :</b> .....  | 7  |
| <b>Liste des Abréviations :</b> .....  | 8  |
| <b>Introduction</b> .....  | 1  |
| <b>Chapitre 01 : Revue de la Littérature</b> .....   | 2  |
| <b>1.1 Présentation et historique : CASA (Analyse Spermatique Assisté par Ordinateur)</b> .....        | 2  |
| <b>1.2. Paramètres étudiés avec CASA</b> .....   | 4  |
| <b>1.2.c. Cinématique.</b> .....   | 5  |
| <b>1.3. Avantages de CASA</b> .....  | 9  |
| <b>1.4. Corrélation des résultats fournis par CASA avec les résultats de l'analyse manuelle.</b> ..... | 11 |
| <b>1.5. Utilisation de CASA dans le diagnostic clinique</b> .....                                      | 15 |
| <b>1.5.a. Définition des facteurs à risque affectant la motilité :</b> .....                           | 16 |
| <b>2.5.c. Analyse des spermatozoïdes hyperactifs due au phénomène de capacitation :</b> .....          | 17 |
| <b>1.6. Autres applications</b> .....  | 19 |
| <b>1.7. Facteurs influençant les résultats fournis par CASA :</b> .....                                | 19 |
| <b>2.7.a. La vitesse de capture :</b> .....  | 19 |
| <b>2.7.d. La concentration spermatique de l'échantillon :</b> .....                                    | 22 |
| <b>1.9. Future potentiel de CASA</b> .....   | 25 |
| <b>2. Méthodes complémentaires d'analyse spermatique :</b> .....                                       | 26 |
| <b>2.1. Cryométrie en flux</b> .....   | 26 |
| <b>2.2. L'analyse Protéomique</b> .....  | 28 |
| <b>2.3. Analyse des spermatozoïdes par microscopie à épifluorescence</b> .....                         | 30 |
| <b>Conclusion :</b> .....  | 32 |



## Introduction

L'analyse spermatique est d'une grande importance lors de l'évaluation de l'infertilité d'un couple, car l'échantillon de sperme est très complexe, une variété de cellules entre dans sa composition, en particulier, les spermatozoïdes. Ces cellules hautement différenciées, sont capables de se déplacer librement, activement dans un milieu liquide en dehors du corps masculin, leur permettant de franchir les barrières anatomiques et physiologiques du tractus génital féminin. (Suarez et Pacey, 2006) et de féconder l'ovocyte.

L'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA) a été mise au point vers la fin des années 1980 pour étudier les caractéristiques du mouvement ou la cinématique des spermatozoïdes et s'est avérée très efficace dans le domaine de la recherche. CASA a également été utilisé avec un grand succès pour relever les caractéristiques du sperme telles que la concentration et les proportions de motilité progressive dans de nombreuses espèces animales, y compris une large application dans les laboratoires de reproduction d'animaux domestiques ainsi que la toxicologie de la reproduction. L'exploitation des résultats obtenus permet une grande avancée dans le domaine de la reproduction des animaux de compagnie et surtout d'apporter des solutions à la menace de disparition des animaux par extinction de la race (Van Der Horst et *al.*, 2020)

Cette revue vise à documenter ce que la communauté scientifique a accompli ces dernières années d'une part, et a suggéré de nouveaux domaines d'utilisations et d'améliorations pour CASA afin de mieux interpréter la complexité qui entoure l'échantillon spermatique.

# Chapitre 01 : Revue de la Littérature

## 1.1 Présentation et historique : CASA (Analyse Spermatique Assisté par Ordinateur)

CASA est un système automatisé composé d'un hardware et d'un software qui sert à visualiser et numériser une séquence d'images de sperme. Il permet l'obtention de résultats clairs, précis, qui nous informent sur différentes qualités de paramètres spermatiques, notamment la concentration, la motilité, la morphologie, et la morphométrie (Talarczyk-Desol et al. 2017).

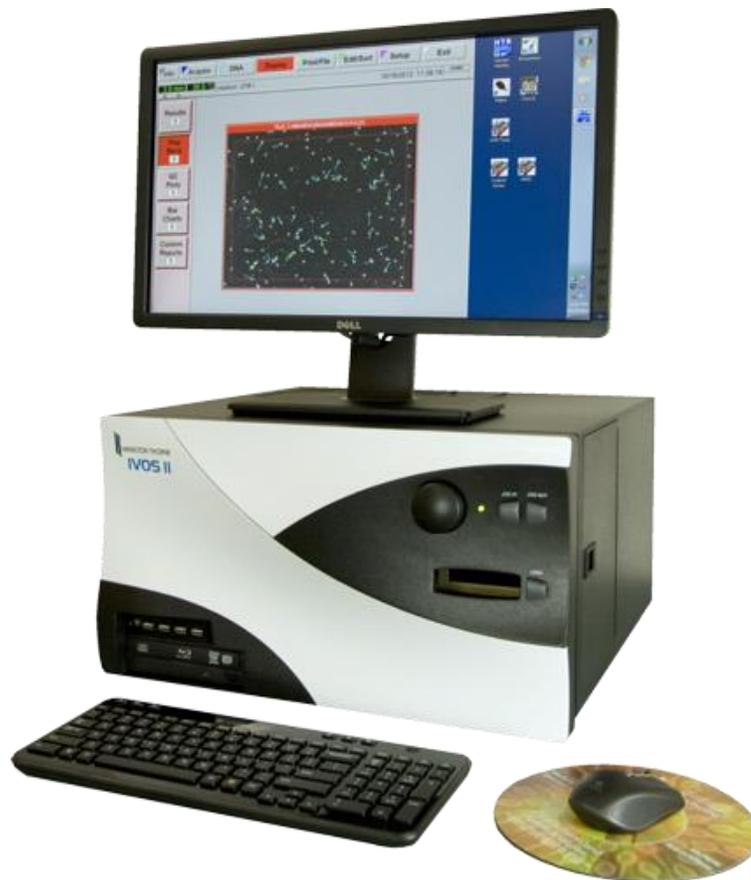
Après numérisation des spermatozoïdes et mise en place des coordonnées  $(x, y)$  sur le champ d'observation, la même procédure est répétée lors des captures successives suivantes. Ensuite, un algorithme est utilisé afin d'analyser toutes les données et de reconstruire les trajectoires individuelles des spermatozoïdes.

La première étape de ce processus consiste à identifier toutes les têtes de spermatozoïdes et à les enregistrer. Certains systèmes CASA reconnaissent la tête du spermatozoïde comme une série de pixels, calculant le centre d'une structure appelé « centriole »; tandis que d'autres utilisent la numérisation des pixels circonférentiels d'un objet pour calculer le centriole. Ainsi, le point le plus brillant sur la tête du spermatozoïde ou le centre de la tête est utilisé et est considéré comme point de référence (Lu et al, 2014).

Le développement de l'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA) au cours des années 1980 a suscité une grande excitation, bien que les systèmes ne fussent que des boîtes noires capables de suivre le mouvement du sperme, sans pour autant pouvoir générer des données vérifiables avec un nombre de captures limité à 30 captures par seconde (Mortimer, 1990 : Amann et Waberski, 2014 : Mortimer et *al.*, 2015). Dans les années 1990 et au début des années 2000, les progrès en informatique ont entraîné plusieurs améliorations aux systèmes CASA. Pendant ce temps, CASA a gagné de la valeur, en particulier dans le domaine de la recherche.

Dans les premiers stades de développement du système CASA, divers problèmes sont apparus, par exemple, initialement, CASA ne pouvait pas différencier les spermatozoïdes des particules de même taille. Pour résoudre ce problème, diverses approches ont été essayées à travers des modifications et des améliorations du logiciel, par exemple, la présence du flagelle comme condition préalable (Neuwinger et al. 1990; Wijchman et al. 1995) ou l'utilisation de colorants pour la coloration de l'ADN des spermatozoïdes (Zinaman et al. 1996).

De nouveaux modèles CASA, plus développés avec une fréquence de capture de 50 à 60Hz ont été commercialisés vers 1990. On cite, Hamilton-Thorn et Motion Analysis (Etats-Unis), le Sperm Class Analyze de Microptics SL (Espagne), Hobson Tracker (UK), le SpermMotility Quantifier (Afrique du Sud), SpermVision (Allemagne) et Proiser/ISAS (Espagne) et tant d'autre.



**Figure 01 : Equipement pour L'analyse Spermatique assistée par ordinateur, CASA, Hamillton Thorn IVOS II**

## **1.2. Paramètres étudiés avec CASA**

Le système CASA permet l'évaluation de nombreux paramètres, dont on cite :

### **1.2.a. La Concentration**

La concentration est certainement l'un des paramètres les plus importants lors de l'évaluation du sperme, car l'infertilité a été associée à un faible nombre de spermatozoïdes chez de nombreuses espèces (Bielsa MA et al, 1994. Boatman DE et al, 1984). L'évaluation précise de la concentration de sperme à l'aide des systèmes CASA reste un problème pour toutes les espèces dans lesquelles ce paramètre a été étudié. En effet, la surestimation semble être une observation courante (Comhaire FH et al, 1992, Iguer-Ouada M et al, 2001). Cela a été attribué par différents auteurs à des collisions entre les spermatozoïdes ; ce qui mène à des évaluations multiples du même spermatozoïde faussant le résultat (Coetzee K et al, 2001) (Douglas-Hamilton et al., 2005).

### **1.2.b. Motilité**

L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes est une partie fondamentale de l'analyse du sperme car elle fournit des informations essentielles sur la compétence fonctionnelle et le potentiel fertilisant des spermatozoïdes (Gunalp et al., 2001; Simon et Lewis, 2011).

Les paramètres de motilité dérivés de CASA comprennent la motilité totale, la motilité progressive, la motilité non progressive, statique, progressive rapide [type a], lente progressive [type b], non progressive [type c] et immobile [type d]). De plus, les systèmes CASA permettent d'obtenir des données vérifiables, car les images vidéo précédemment analysées peuvent être réexaminées pour des évaluations périodiques de contrôle de qualité interne et externe.

Les systèmes CASA-Mot actuels se focalisent presque exclusivement sur l'analyse et le suivi de la tête du spermatozoïde, certains systèmes plus récents commençant à rechercher la présence du flagelle afin d'aider à exclure les débris et autres objets étrangers des analyses. Cependant, mécaniquement, c'est le flagelle qui propulse le spermatozoïde et, à ce titre, le

comportement du flagelle est la caractéristique fondamentale gouvernant la motilité des spermatozoïdes.

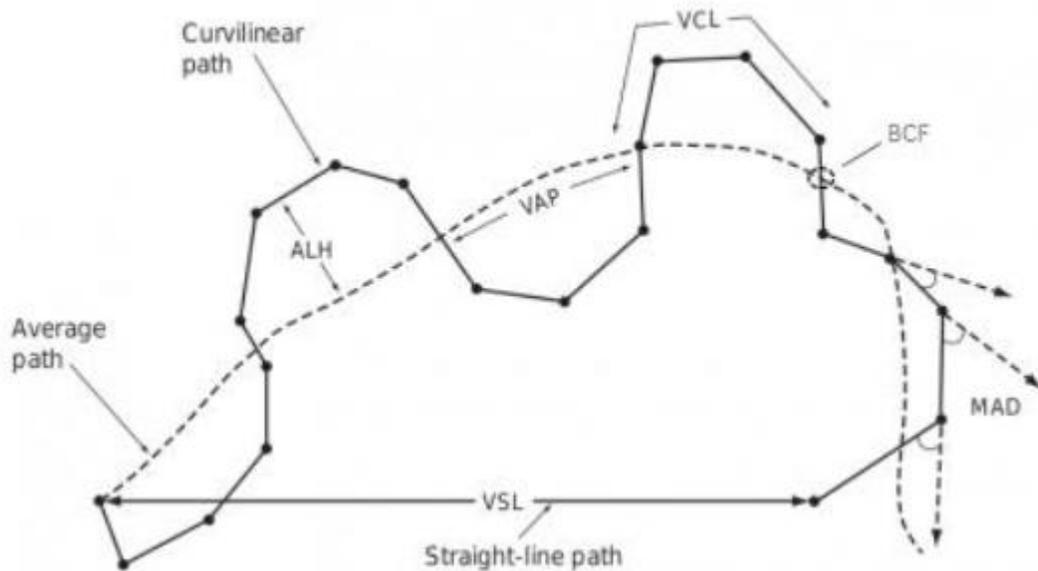
Le flagelle est souvent traité comme une simple « roue », contribuant uniquement au mouvement de la cellule, plusieurs études ont démontré que cela est faux. En effet, la tête du spermatozoïde n'est qu'un poids qui cause une trainée avant d'atteindre le lieu de fécondation, le flagelle agit comme un moteur à travers l'axonème (Machin 1958), comme un appareil de détection (Brokaw 1991), réagissant à la présence de viscosité (Smith et al. 2009b), permettant un comportement rhéotaxique (Miki et Clapham 2013) et guidant la migration grâce à la détection des bords le long de passage du tractus génital femelle (Denissenko et al., 2012).

En prenant en considération cela, nous pensons que le moyen le plus efficace pour développer CASA-Mot, et ainsi agrandir le cercle d'utilisation des analyses assistées par ordinateur dans le diagnostic clinique est l'introduction du suivi flagellaire, comme l'ont fait les pionniers Hiramoto et Baba (1978).

### **1.2.c. Cinématique.**

En plus d'être de puissants outils analytiques pour évaluer la motilité des spermatozoïdes, les systèmes CASA fournissent des détails supplémentaires sur le mouvement des spermatozoïdes en déterminant leurs caractéristiques cinématiques. Chaque sperme individuel dans le champ de vision est identifié, une série d'images numériques du mouvement de la tête des spermatozoïdes est ensuite capturée. Cela permet de reconstituer leurs trajectoires individuelles (Mortimer et al. 2015).

Le suivi de la progression de la tête du spermatozoïde nous a toujours renseigné sur les différents paramètres cinématiques, et cela bien avant l'introduction de l'ordinateur dans l'analyse spermatique (Katz and Overstreet 1981; Holt et al. 1985).



**Figure 02 : Les principales mesures cinématiques impliquées dans le suivi des spermatozoïdes.**

**Modifié à partir de l'OMS, 2010.**

Les différents mouvements individuels du spermatozoïde évalués par CASA sont :

**Curviline Velocity (VCL)** : s'exprime en micromètre par second ( $\mu\text{m/s}$ ), la VCL mesure la vitesse moyenne en temps du centroïde de la tête du spermatozoïde le long de son chemin curviligne réel. Il est calculé en trouvant la distance totale entre le premier et le dernier point de tête divisée par le temps écoulé, La VCL peut être un indicateur du dynamisme du spermatozoïde.

**Straight Line Velocity (VSL)** : exprimé en  $\mu\text{m/s}$ , elle est définie comme la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête de spermatozoïde le long de sa trajectoire en ligne droite entre le premier et dernier point où il a été capturé. Il est calculé en trouvant la distance totale parcourue le long du chemin linéaire divisée par le temps d'acquisition.

**Average Path Velocity (VAP)** : exprimé en  $\mu\text{m/s}$ , c'est la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête du sperme le long de la trajectoire lissée, qui est construite en faisant la moyenne de plusieurs points sur la trajectoire curviligne réelle, le lissage se fait par des

algorithmes de l'analyseur CASA ; ces algorithmes varient selon l'équipement, ce qui conduit à des variations de résultats entre divers systèmes et laboratoires. La VAP est calculé en divisant la longueur de la piste lissée par le temps d'acquisition.

**Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH):** exprimée en  $\mu\text{m}$ , définie comme l'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde par rapport à sa trajectoire moyenne et exprimée en maximum ou en moyenne de ces déplacements; comme les algorithmes utilisés dans le calcul de ce paramètre varient d'un équipement à l'autre, ses valeurs peuvent ne pas être comparables entre divers systèmes et laboratoires.

**Linearity (LIN):** ou linéarité du chemin curviligne, définie comme le rapport VSL: VCL.

**Wobble (WOB):** défini comme le rapport VAP: VCL, qui est une mesure de l'oscillation du chemin réel par rapport au chemin moyen.

**Rectitude (STR):** définie comme le rapport VSL: VAP, qui exprime la linéarité du chemin moyen.

**Beat Cross Frequency (BCF):** exprimée en Hz et fournissant la vitesse moyenne à laquelle le chemin curviligne croise le chemin moyen.

**Mean Angular Displacement (MAD):** ou le déplacement angulaire moyen exprimé en °(degrés) et fournissant les valeurs absolues moyennées en temps de l'angle de rotation instantané de la tête du sperme le long de sa trajectoire curviligne.

#### **1.2.d. Morphologie**

Les spermatozoïdes sont des cellules spécialisées très différenciées qui ont subis des modifications de forme et de taille. Le lien possible entre la morphologie des spermatozoïdes et la fertilité a déjà été reconnu depuis le milieu du siècle précédent (Macleod et Gold 1951). Cependant, la valeur prédictive de la morphologie des spermatozoïdes dans la fertilité masculine a toujours été une question controversée ; principalement en raison de la grande variabilité de l'évaluation manuelle de la morphologie au sein et entre les laboratoires, ce qui a

ensuite limité son application pratique (Eustache et Auger, 2003; Maree et al., 2010; Van der Horst et Du Plessis, 2017).

La morphologie est un paramètre soumis à de fortes variations inter-laboratoires, à tel point que certains la considèrent comme l'un des paramètres les plus subjectifs des tests spermatiques (Punjabi et al., 2016) et d'ailleurs certains s'interrogent sur son importance (Gatimel, Moreau, Parinaud, et Léandri, 2017).

Les auteurs ont révélé que les changements de classification et les modifications standard dans les éditions successives de la classification de l'OMS ont tous joué un rôle dans le maintien de ce paramètre en territoire flou. En fait, la première édition du manuel de l'OMS (1980) considérait un pourcentage normal de formes normales au-delà de 80%. Pour la deuxième édition (1987) et la troisième (1992), pourcentages étaient respectivement de 50% et 30%. La quatrième édition (1999) recommandait les critères stricts de Tygerberg qui sont limités aux têtes de sperme. Ce paramètre était alors considéré comme normal au-dessus de 14% des formes normales. En 2010, la cinquième édition, tout en conservant la même procédure et la même classification, a une fois de plus changé le standard et considéré comme normale, la morphologie des spermatozoïdes au-dessus de 4% des formes normales (Menkveld, 2010) Ainsi, les valeurs standard ont considérablement évolué en 30 ans et la confiance en ce paramètre a nécessairement été minée.

#### **1.2.e. Morphométrie :**

Une mauvaise morphologie des spermatozoïdes a été associée à de faibles taux de fertilité (Chandler et al., 1988; Jasko et al., 1990; Barth et al., 1992). Cependant, les estimations subjectives de la morphologie des spermatozoïdes souffrent d'un manque de précision, de répétabilité et d'exactitude (Hidalgo et al., 2006). Par exemple, les programmes de contrôle de la qualité d'échantillons humains ont montré un coefficient de variation inter-technicien allant de 10 à 80% (Cooper et al., 2002; Alvarez et al., 2005; Filimberti et al., 2013). Ces variations ont limité l'utilité d'une telle évaluation morphologique en tant que prédicteur de la qualité du sperme pour la reproduction (Ombelet et al., 1995). Pour réduire la subjectivité de l'évaluation

de la morphologie des spermatozoïdes, des systèmes d'analyse de la morphométrie des spermatozoïdes assistés par ordinateur (CASMA ou ASMA, génériquement CASA) ont été développés et sont apparus pour la première fois sur le marché dans les années 1990 (Davis et al., 1992; Kruger et al., 1993) .

De nombreuses techniques peuvent évaluer la morphométrie des spermatozoïdes, mais CASA-Morph est devenu le choix principal pour cette tâche, car il offre une fiabilité et une répétabilité accrues et une subjectivité réduite. (Kruger et al., 1999 ; Gago et al., 1998 ; Yaniz et al., 2015) Les études qui évaluent les différentes sources de variation affectant CASA-Morph sont essentielles pour garantir sa répétabilité et cohérence entre les laboratoires. Les principales sources de variation de CASA-Morph, autres que le logiciel et l'analyse des données, sont la préparation des échantillons, la méthode de fixation, la méthode de coloration, le système microscopique (optique et caméra) et le technicien. Toutes ces étapes peuvent affecter non seulement la répétabilité des expériences, mais également la reproductibilité et la comparaison des résultats entre laboratoires, qui sont nécessaires pour l'utilisation pratique des analyses morphométriques des spermatozoïdes.

### **1.3. Avantages de CASA**

Les premiers systèmes électroniques ou multi-images pour la visualisation des spermatozoïdes ont été développés pour fournir des informations objectives sur le mouvement ou la morphologie des spermatozoïdes (Ruestow EG 1983 : Amann RP et al, 1980). Au fur et à mesure que la précision s'améliorait, on pensait que les valeurs mesurées devraient permettre une prédiction précise de la « fertilité » potentielle d'un sujet (généralement exprimée en pourcentage de femelles gestantes, proportion de femelles ayant des petits ou taille de portée).

Aujourd'hui, la plupart des andrologues reconnaissent que cette notion était insensée et irréaliste pour des raisons biologiques liées au sperme en soi, aux événements chez un sujet féminin et aux problèmes de mesure de la fertilité (Boyers SP et al., 1989 : Ruestow EG 1983). Néanmoins, CASA joue un rôle important et croissant dans l'assurance de la qualité des produits de semence commercialisés pour l'IA de bovins, de chevaux ou de porcs. Chez

les sangliers, des mesures simultanées de la concentration de spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles facilitent l'identification des doses commercialisables de sperme et rejet du sperme inapproprié.

Peut-être que la plupart des cliniciens actuels évaluant des taureaux ou des étalons destinés à être utilisés par accouplement naturel ont une pratique pour laquelle la partie sperme des évaluations andrologiques (qualité de la reproduction) peut apparemment être effectuée avec un microscope binoculaire comprenant : (1) contraste de phase et objectifs en champ clair ; (2) condenseur approprié ; et (3) de platines chauffées permettant des examens à la température recommandée. Bien que le biais et l'inexactitude des estimations visuelles du pourcentage de spermatozoïdes mobiles soient bien connus et affectent dans une moindre mesure l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes, il est peu probable que l'utilisation d'un système CASA actuellement disponible dans un examen de la qualité de reproduction permettrait de meilleurs conseils à un client, parce que l'objectif est d'éliminer les « ratés ». Le recyclage périodique de ceux qui font des estimations visuelles pourrait améliorer la précision et représenter une meilleure dépense ; Les techniciens CASA doivent également être bien formés (Moruzzi JF et al., 1988).

Pour les andrologues travaillant pour une société de génétique, une organisation de traitement de sperme sur mesure ou dans un grand groupe de pratique, la plupart des systèmes CASA actuels offrent l'avantage d'un biais réduit par rapport aux évaluations visuelles et aux mesures des résultats qui pourraient fournir une base fiable pour rejeter ou utiliser un échantillon de sperme donné, préparer de manière optimale les « unités » de sperme à distribuer et s'assurer que la qualité du produit répond aux spécifications. Dans de telles applications, les décisions pour un échantillon donné peuvent être basées sur des valeurs pour quelques attributs de mouvement du sperme soigneusement sélectionnés et indépendants et toutes les autres valeurs de sortie CASA supprimées pour éviter une « surcharge informatique ». Pour la recherche, la plupart des valeurs de sortie d'un système CASA pourraient informer sur la fonction ou l'état du sperme.

CASA est actuellement un outil de laboratoire très utile pour l'évaluation objective du sperme d'animaux d'élevage. L'examen d'un grand nombre d'échantillons et l'acquisition de

résultats fiables dans un court laps de temps peuvent soutenir le contrôle des problèmes de la reproduction chez les animaux mâles et peuvent maintenir des taux élevés de production d'embryons au sein des laboratoires (MICHOS I.A et al, 2013). La condition préalable est l'existence d'un personnel spécialisé et bien formé et l'assurance de la fonctionnalité appropriée du système.

#### **1.4. Corrélation des résultats fournis par CASA avec les résultats de l'analyse manuelle.**

Contrairement au comptage manuel, CASA utilise un hardware et un software pour visualiser et évaluer des images consécutives de spermatozoïdes viables afin d'obtenir des informations précises et valides sur la cinématique des spermatozoïdes individuels. Les deux méthodes (manuelle et CASA) ont leurs avantages et leurs inconvénients (tableau) mais la méthode la plus prometteuse est CASA. L'un des inconvénients du comptage manuel est qu'une utilisation efficace de l'hémocytomètre dépend fortement d'un pipetage précis, d'une dilution et d'un calcul minutieux, qui sont tous des sources d'erreur courantes (Tomlison et al, 2010). Des exemples d'avantages de CASA sont une analyse objective rapide et détaillée combinée à une reproductibilité élevée, tout en utilisant des paramètres d'instrument identiques.

Les paramètres spermatiques obtenus conformément aux recommandations de l'OMS restent une référence pour les examens cliniques. Cependant, ils ne reflètent pas toujours le potentiel fertilisant d'un mâle. L'analyse manuelle du sperme est une procédure très rentable et simple, mais elle nécessite une analyse par un personnel de laboratoire bien formé. Jusqu'à ce jour, aucune procédure n'est validée par l'OMS comme étant un étalon-or pour l'analyse du sperme (Baig et *al.*, 2019).

Lors de l'utilisation de sperme congelé, il est intéressant d'observer que le CASA par rapport aux méthodes manuelles surestime souvent le nombre de spermatozoïdes avant congélation et sous-estime ce nombre après décongélation. L'une des raisons de cette différence peut être le taux d'agglutination variable auquel les cellules immobiles après décongélation sont sujettes. Les réglages de sperme frais des paramètres de l'analyseur peuvent

ne pas être optimaux pour le comptage des spermatozoïdes cryoconservés, où le milieu de congélation contient souvent du jaune d'œuf et / ou un cryoprotecteur. Chez l'homme, les échantillons de sperme lavés nécessitent des paramètres CASA différents de ceux du sperme séminal pour l'analyse du sperme ; de même, les échantillons après décongélation avec du milieu de congélation peuvent nécessiter des réglages différents lorsque la viscosité du milieu de congélation est différente de celle de l'éjaculat (Verstegen, Iguer-Ouada et Onclin, 2002).

L'estimation microscopique manuelle de la motilité des spermatozoïdes est subjective et fortement associée aux variations inter et intra-laboratoire. Dans le même échantillon de sperme, des variations de 30 à 60% ont été signalées dans les éjaculats humains et animaux évalués manuellement (Verstegen, Iguer-Ouada et Onclin, 2002).

Malheureusement, bien qu'il existe des lignes directrices générales et importantes pour la mesure de l'analyse de la motilité des spermatozoïdes et l'utilisation de CASA (ESHRE Andrology, 1998), une ligne directrice détaillée et généralement acceptée pour les paramètres internes spécifiques de CASA et les ajustements d'espèces de laboratoire importantes fait défaut. De toute évidence, en raison d'algorithmes de logiciels spécifiques pour des dispositifs CASA spécifiques (qui sont capables de modifier les résultats obtenus de paramètres particuliers tels que l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), il est difficile mais possible de générer une directive générale avec des paramètres CASA spécifiques.

En utilisant CASA, d'importantes variations inter-laboratoires ont été observées, des études multi centriques sur des sujets males ont démontré que l'un des paramètres les moins subjectifs, est la concentration spermatique possédant un coefficient de variation de 21% à 80% (Brito et al., 2016).

|               | Analyse manuelle               | Analyse Spermatique Assistée par ordinateur(CASA)                      |
|---------------|--------------------------------|--|
| Avantages     | Coûts d'acquisition abordables | Analyse rapide   |
|               |                                | Répétabilité des résultats avec des paramètres techniques identiques   |
|               |                                | Analyse détaillée  |
|               |                                | Analyse objectives, de larges échantillons de sperme                   |
| Inconvénients | Temps d'analyse élevé          | Coûts d'acquisition élevés   |
|               | Comptage subjectifs            | Exige des maintenances régulières                                      |
|               | Analyse grossières             | Le changement des paramètres techniques peut bouleverser les résultats |

**Tableau 01 : Avantages et inconvénients de l'analyse manuelle du sperme et de l'analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA) (Modifié d'après Carsten et al., 2013)**

CASA est très sensible aux petits changements de paramètres internes qui peuvent conduire à un changement profond des résultats. Par exemple, une petite coche dans la case (« Les spermatozoïdes lents sont comptés comme motiles / statiques » peut conduire à des résultats complètement différents, par exemple une observation de 49% de cellules mobiles au lieu de 80%. Bien que des arguments valables existent pour les deux de possibilités - 1: les cellules lentes sont mobiles; ou 2: les cellules lentes n'atteindront jamais l'ovocyte - il y a un

risque élevé de mauvaise interprétation des résultats pour chacun des choix; une possibilité de surinterprétation des informations respectives en raison de connaissances de base manquantes. A quels groupes appartiennent les cellules lentes susmentionnées ?

Un autre exemple d'une information importante est la fréquence d'acquisition d'image ; par exemple 50 Hz (fps) et 60 Hz (fps). Des fréquences différentes peuvent avoir un impact significatif sur les résultats obtenus (Abaigar T et al, 2012). Des paramètres comme celui-ci doivent être pris en compte avant d'acheter un appareil CASA spécifique et l'évaluation scientifique doit prendre ces informations en considération.

Lammer et al., En 2013, ont réalisé une étude prospective en double aveugle comparant deux analyseurs de sperme automatisés à une évaluation manuelle du sperme. L'analyse statistique des résultats des tests des systèmes automatisés et de la méthode manuelle n'a révélé aucune différence significative pour la plupart des paramètres de sperme mesurés.

L'étude réalisée par Komori et al., En 2006, a montré que le système d'analyse de la motilité des spermatozoïdes et l'analyse microscopique manuelle des spermatozoïdes montrent une forte concordance dans l'estimation du nombre de spermatozoïdes.

Fuse et al., En 2005, ont montré que la mesure de la concentration totale des spermatozoïdes et du pourcentage de motilité progressive par l'analyseur de la qualité du sperme IIB montrait des corrélations élevées avec celles de la méthode manuelle conventionnelle recommandée par l'OMS (Guide 1999) « Cellule type améliorée de Neubauer ». Au contraire, l'étude de Vested et al., En 2011, a montré que les résultats de CRISMAS CASA et les résultats de cette méthode conventionnelle n'étaient pas comparables en ce qui concerne la concentration de spermatozoïdes et l'analyse de la motilité.

La méthode CASA ainsi que la méthode manuelle ont toutes les deux démontré une concordance acceptable. Cependant, CASA est un meilleur outil pour éviter les variations subjectives et pour une meilleure standardisation. De plus, CASA est sans aucun doute supérieur à la méthode manuelle en ce qui concerne l'évaluation de paramètres cinématiques (Baig et al, 2019) ainsi que la concentration des spermatozoïdes (Schubert, Badiou et Force, 2019)

Pour les laboratoires d'andrologie, les systèmes CASA, malgré leur coût, sont un moyen de renforcer les résultats, en particulier lorsqu'il s'agit d'analyses avec de larges plages de valeurs normales. Le plus petit Coefficient de Variation a toujours été obtenu avec le SCA quel que soit le paramètre analysé dans les gammes normales et anormales. Il est néanmoins primordial que les techniciens de laboratoire soient formés aux analyses de sperme. La mise en œuvre des systèmes CASA doit être appuyée par une formation qui devrait être assez rapide pour les techniciens de laboratoire. (Schubert, Badiou et Force, 2019).

L'expertise humaine est toujours cruciale, plus particulièrement pour les paramètres à très faibles valeurs où les systèmes automatisés sont probablement poussés à leurs limites. Contrairement à ce que l'on dit couramment, les systèmes CASA ne sont pas de simples "boîtes noires", donnant des résultats froids et nus en dehors de toute intervention humaine (Dearing et al., 2014), mais plutôt des atouts précieux fournissant des résultats plus rapides et plus précis pour les principaux paramètres du sperme de routine.

### **1.5. Utilisation de CASA dans le diagnostic clinique**

En raison des efforts considérables déployés pour améliorer les performances techniques et l'efficacité des systèmes CASA actuels, il est nécessaire et est devenu crucial d'évaluer la pertinence biologique des paramètres dérivés de CASA dans la prédiction du potentiel de fertilité masculine. Les mesures dérivées de CASA se sont avérées très utiles pour surveiller les changements subtils dans la distribution des spermatozoïdes parmi différentes sous-populations de motilité et de vitesse en réponse à diverses conditions physiologiques (Elzanaty et al., 2005; Fréour et al., 2012) et les expositions environnementales (Louis et al., 2014; Mukhopadhyay et al., 2010), qui ne peuvent être observées manuellement par analyse microscopique optique.

### **1.5.a. Définition des facteurs à risque affectant la motilité :**

De nombreux facteurs peuvent affecter la qualité des mouvements des spermatozoïdes. Ils comprennent la température de mesure, le traitement du sperme (lavage et capacitation, processus de congélation / décongélation), la concentration de sperme et le processus pathologique chez le donneur (Brown CA et al, 1988, Byrd W et al, 1990, Hammond MG et al, 1986). Chez l'homme, la mesure de la concentration de spermatozoïdes et des caractéristiques de mouvement nécessite des réglages de paramètres différents pour les échantillons de sperme frais et lavés (après élimination du plasma séminal). De même, dans les échantillons cryoconservés, les échantillons de sperme après décongélation peuvent nécessiter des réglages de paramètres différents en raison de la présence du milieu de congélation ajouté à l'éjaculat.

En conséquence, les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes ne doivent pas être considérées comme des valeurs absolues, mais doivent plutôt être interprétées à la lumière des réglages des paramètres.

À l'heure actuelle, les effets potentiels des risques environnementaux et professionnels sur la fonction du sperme ont été largement étudiés (Amann et Katz, 2004). Mukhopadhyay et coll. (2010) ont évalué un groupe de patients exposés au tabagisme et aux métaux lourds. Ces patients ont montré des paramètres de sperme normaux dans l'analyse de sperme de routine, mais lorsque les mêmes échantillons de sperme de ces patients ont été analysés à l'aide du système CASA, il a été constaté que la valeur moyenne de la VCL ( $P = 0,029$ ) et la valeur moyenne de la STR ( $P = 0,007$ ) chez les patients exposés à la cigarette ont été réduits de manière significative par rapport aux patients non exposés à la cigarette. De même, la valeur moyenne de la VCL ( $P = 0,014$ ) et la valeur moyenne de l'ALH ( $P = 0,040$ ) chez les patients exposés aux métaux lourds ont diminué de manière significative par rapport aux patients non exposés aux métaux lourds, tandis que les autres paramètres de mouvement du sperme n'avaient pas de changement significatif.

Falzone et coll. (2008) ont constaté que les valeurs de VSL et de BCF diminuaient considérablement avec le temps d'exposition aux radiations GSM de 900 MHz. Ces observations

ont indiqué que certains facteurs de risque peuvent conduire à des changements spécifiques dans les caractéristiques de mouvement du sperme, qui peuvent être les changements précoces de la qualité anormale du sperme.

#### **2.5.b. Prédiction des paramètres de motilité augmentant les chances de fécondation *in vitro***

:

La motilité est acceptée comme le paramètre le plus important de l'ensemble des caractéristiques évaluées en termes de capacité de fécondation du sperme, selon par exemple Fitzpatrick et al. (2002) et Kathiravan et al. (2011). Plusieurs laboratoires scientifiques traitent du sujet de la détermination d'un paramètre particulier, évalué par le système CASA, et de sa corrélation étroite avec la fertilité *in vivo*. Cependant, ce paramètre ou test de laboratoire, qui pourrait rapporter avec précision des informations sur la capacité de fertilisation de la dose d'insémination, n'a pas encore été établi (Oliveira et al. 2013). Dans une certaine mesure, cela ne peut pas être prévu du fait que le processus de reproduction est très complexe (Feitsma et al., 2011 ; Vincent et al., 2012 ; Amann et Waberski 2014 ; Ferrazet al., 2014) et peut être affecté par différentes conditions (Rehak et al.2012).

#### **2.5.c. Analyse des spermatozoïdes hyperactifs due au phénomène de capacitation :**

L'hyperactivation est une forme de motilité non progressive observée au niveau de l'ovocyte au moment de la fécondation et se caractérise par des ondulations flagellaires extrêmement asymétriques avec des amplitudes plus élevées et des fréquences plus basses conduisant à des trajectoires de nage très courbés, comme des coups de fouet (Demott et Suarez, 1992; Katz et al. , 1978).

L'hyperactivation des spermatozoïdes a initialement été évaluée manuellement, décrivant les modèles de mouvement flagellaire de manière subjective en se basant sur des observations purement visuelles. Cependant, étant donné que l'hyperactivation des spermatozoïdes est un phénomène flagellaire associé à des changements dans les amplitudes

et les fréquences des ondes flagellaires, l'analyse manuelle de ce dernier reste très laborieuse, longue et incontrôlée (Suarez, 2008).

Il a été fortement recommandé que les systèmes CASA soient une option plus pratique pour l'identification des spermatozoïdes hyperactivés (Mortimer, 2000 ; Mortimer et al., 2015).

Dans des circonstances normales, les spermatozoïdes qui traversent la trompe de Fallope subissent la réaction de capacitation et entre dans un état d'hyperactivité, ce qui est propice pour traverser la trompe de Fallope tordue, et féconder l'ovule. Bien que la corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes hyperactif et le taux de fécondation *in vitro* ne soit pas concluante, mais la détection du pourcentage de spermatozoïdes hyperactif pourrait prédire l'aptitude de capacitation des spermatozoïdes *in vivo* et *in vitro*, et guider le traitement de l'infertilité, elle est donc nécessaire pour évaluer les caractéristiques dynamiques des spermatozoïdes hyperactifs en utilisant le système CASA (Mortimer, 2000).

Les caractéristiques dynamiques des spermatozoïdes hyperactifs sont très différentes de celles des spermatozoïdes éjaculés et des spermatozoïdes sans capacité. Il existe deux types d'hyperactivité des spermatozoïdes: progressive et non progressive. Cependant, il y avait différentes définitions des spermatozoïdes hyperactifs dans les littératures rapportées. Certains ont rapporté VCL = 150  $\mu\text{m/s}$  , LIN 50% et ALH = 7  $\mu\text{m}$  avec une FC = 60 Hz comme des spermatozoïdes avec hyperactivité (Mortimer, 2000), certains ont défini VCL  $\geq$  180  $\mu\text{m/s}$  , LIN  $\leq$  45%, WOB <50% et ALH moyenne > 6,0  $\mu\text{m}$  ou ALH maximum > 10,0  $\mu\text{m}$  avec un FC = 60 Hz (Mortimer & Swan, 1995), et d'autres ont considérées VCL > 90  $\mu\text{m/s}$  , LIN <20% et Dance (ALH / LIN 9 100) > 45,8  $\mu\text{m}$  sous FC = 25 Hz comme étant des spermatozoïdes hyperactifs (Sukcharoen et al., 1995).

De plus, Pacey et al. (1997) pensaient que les spermatozoïdes hyperactifs étaient en multiphase et difficiles à évaluer avec précision à l'aide des systèmes CASA actuels. Par conséquent, pour obtenir la véritable trajectoire des spermatozoïdes hyperactifs, le FC du système CASA doit être suffisamment élevé. Comme il est nécessaire de faire une définition

acceptable et précise des spermatozoïdes hyperactifs en fonction des caractéristiques dynamiques des spermatozoïdes capacités *in vivo*.

## **1.6. Autres applications**

Le système CASA peut également être utilisé pour évaluer les changements des paramètres de mouvement des spermatozoïdes avant et après la décongélation (Liu et al., 2004), les effets de différents milieux ou du traitement *in vitro* sur la fonction du sperme (Amann & Katz, 2004), ainsi que la relation entre les paramètres de mouvement des spermatozoïdes, tels que la VCL, la VAP, l'ALH, etc., et l'augmentation de la viscosité du sperme ou l'asthénospermie (Elzanaty et al., 2004). Fetterolf & Rogers (1990) ont constaté que les résultats du test de pénétration du sperme (SPA) étaient fortement corrélés avec la concentration du sperme, la motilité, la VCL et le BCF, et pensaient que le SPA très gênant et chronophage pourrait être remplacé par le CASA. Surtout, la technologie CASA peut-être utilisée pour identifier les différences subtiles dans la qualité du sperme. De plus, CASA est utile lors d'analyses des échantillons de taille importantes pour les enquêtes épidémiologiques sur le sperme humain.

## **1.7. Facteurs influençant les résultats fournis par CASA :**

Un facteur très important pour la standardisation des résultats du système CASA est la partie pré-analytique, qui comprend la préparation d'un échantillon pour analyse (Amann et Waberski 2014). Ainsi, la vitesse de capture d'image du système CASA, la concentration et le volume d'échantillon, le type de chambre de comptage, la température et le type de dilueur sont essentiels pour une interprétation correcte des résultats CASA.

### **2.7.a. La vitesse de capture :**

La fréquence de capture (FC) est définie comme étant le nombre d'images acquises par seconde lors de l'obtention de la trajectoire du sperme dans le CASA. La fréquence de capture dépend principalement de la qualité de la caméra et du standard d'imagerie appliqué (Mortimer, 2000). La fréquence de capture a un effet direct sur les trajectoires de mouvement

des spermatozoïdes, ce qui peut encore affecter les résultats des paramètres de mouvement des spermatozoïdes. La trajectoire du mouvement des spermatozoïdes varie avec la FC. Lorsque la trajectoire est construite avec une FC de 30 Hz, elle sera relativement simple, alors qu'avec une FC de 60 Hz, elle sera relativement complexe.

Pour l'analyse du mouvement des spermatozoïdes, les images représentent généralement une exposition de 0,02 seconde à une fréquence de 50 images par seconde. L'exposition de l'image peut être contrôlée via un obturateur de caméra ou la durée d'impulsion de l'éclairage stroboscopique.

La vitesse à laquelle les images sont capturées et la durée d'une « scène » (par exemple, 60 images par seconde pendant 0,5 seconde) affectent la distance qu'un spermatozoïde peut se déplacer entre des images successives ou pendant une scène entière (c'est-à-dire un trajet curviligne). Celles-ci ont un effet direct sur la forme du « chemin moyen » calculé pour chaque sperme, les écarts par rapport au chemin enregistré du centre de gravité d'un spermatozoïde sur des images successives, et d'autres valeurs de sortie pour le mouvement des spermatozoïdes. Pour l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes, une ou plusieurs images sont généralement évaluées bien que certains systèmes calculent apparemment des statistiques de morphologie basées sur toutes les images d'une scène (Lu et al., 2014)

Lorsque la trajectoire du mouvement des spermatozoïdes change, les paramètres dynamiques des spermatozoïdes seront, par conséquent, modifiés. Davis & Katz (1992) ont constaté que la motilité des spermatozoïdes basée sur une FC de 5 Hz était plus élevée que celle sur une FC de 15 Hz pour deux instruments CASA de marque. Owen & Katz (1993) ont montré que la variation de VCL, LIN et MAD basée sur une FC de 30 Hz était significativement plus élevée que celle sur une FC de 60 Hz. Castellini et coll. (2011) ont rapporté que la FC n'avait aucun effet évident sur la motilité totale des spermatozoïdes, mais avait un effet significatif sur les paramètres cinétiques des spermatozoïdes.

Il est également indiqué que les spermatozoïdes de grade a et b peuvent être évalués correctement par le système CASA commercial avec une FC de 30–60 Hz, tandis que l'évaluation

précise des spermatozoïdes de grade c nécessite une FC accrue. Maintenant, il est généralement admis que le système CASA avec une FC de 60 Hz peut essentiellement répondre aux exigences de l'analyse de la dynamique des spermatozoïdes humains et autres mammifères (Lu et al., 2014)

### **2.7.b. Le type de cellule de comptage associé au système CASA :**

Il existe différents modèles de systèmes CASA, et ces derniers sont souvent équipés de différentes cellules de comptage de spermatozoïdes. Cependant, les résultats fournis par CASA seront affectés en raison de la grande variation des résultats des différentes ces cellules de comptage (Hu et al., 2006). Même si le système CASA a une FC très élevé, un très bon système de traitement vidéo et un logiciel d'analyse avancé, si la profondeur de la chambre de comptage des spermatozoïdes présente une erreur importante, les résultats de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes seront directement affectés.

L'analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur nécessite que les spermatozoïdes soient détectables par vision artificielle (Boyers et al., 1989). Pour l'analyse du mouvement, des chambres jetables (plusieurs fabricants), chargées par capillarité, avec une profondeur soigneusement contrôlée (axe Z; profondeur certifiée) de 20 ou 10  $\mu\text{m}$  sont souvent recommandées. Ces profondeurs font qu'il est moins probable qu'un spermatozoïde puisse remonter et / ou descendre en dehors de la profondeur de champ utile du microscope. Cependant, cela signifie que les spermatozoïdes de certaines espèces ne peuvent pas nager à leur manière normale ; pour les spermatozoïdes de taureau, des excursions hélicoïdales illimitées de la queue nécessitent 12  $\mu\text{m}$  dans chaque direction à partir du plan de la tête (Rikmenspoel R., 1984, Rikmenspoel R., 1965) lorsqu'un spermatozoïde donné se repositionne.

Kuster (2005) pensait que lorsque le système CASA était affilié à des chambres de comptage de spermatozoïdes d'une profondeur de 20  $\mu\text{m}$  chargeant les échantillons par capillarité, les résultats devraient être corrigés en utilisant le facteur de compensation approprié, car le mouvement de Poiseuille de l'échantillon dans ces chambres produit l'effet Segre – Silberberg (SS).

Pour l'analyse de la morphologie, la plupart des systèmes utilisent une préparation sèche colorée (sur une lame conventionnelle) bien que certains fournissent maintenant une analyse complète de la morphologie de la tête et / ou de la queue en utilisant une préparation humide. (Amann et Waberski 2014)

### **2.7.c. Les algorithmes du système CASA :**

Une trajectoire irrégulière du mouvement des spermatozoïdes produira une forme et une complexité assez différentes de la trajectoire de mouvement des spermatozoïdes lorsque la FC varie. Il est donc nécessaire de traiter ces pistes en utilisant certains principes et algorithmes. En général, les valeurs des paramètres cinétiques des spermatozoïdes, tels que VAP, ALH, etc., sont calculées par les algorithmes après le lissage de la trajectoire des spermatozoïdes (Mortimer & Swan, 1999). Par conséquent, si les algorithmes sont différents entre les systèmes CASA, les résultats manqueront de comparabilité.

Nafisi et coll. (2005) ont présenté une sorte d'algorithme de calcul de la trace des spermatozoïdes, qui n'était pas sensible aux conditions d'acquisition de l'imagerie, mais le fond et les autres particules peuvent être éliminés avec succès par une méthode arithmétique améliorée en deux étapes. Il a été prouvé que cette arithmétique fonctionnait très bien dans différentes conditions d'acquisition d'imagerie. De plus, le calcul du pourcentage de spermatozoïdes mobiles est lié à la fixation du seuil entre les spermatozoïdes mobiles et immobiles. Le réglage du seuil peut être arbitraire, ce qui manque actuellement de norme uniforme.

### **2.7.d. La concentration spermatique de l'échantillon :**

L'effet de la concentration de spermatique sur la motilité et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes était très évident lorsqu'il a été évalué avec le système CASA. Johnson et coll. (1996) ont rapporté que le système CASA (Hamilton-Thorne) affilié à la chambre MicroCell pouvait détecter la concentration et la motilité des spermatozoïdes avec précision dans un intervalle de concentration de spermatozoïdes de  $20 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  à  $149 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Cependant,

Wetzels et al. (1993) ont observé l'effet de la concentration de spermatozoïdes sur les résultats du système CASA en utilisant différentes dilutions d'échantillons de sperme et ont constaté que tous les paramètres de motilité des spermatozoïdes étaient affectés par la concentration dans un intervalle de  $10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  à  $180 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

Spiropoulos (2001) a montré qu'il y avait des différences significatives dans les paramètres de mouvement des spermatozoïdes entre les échantillons à concentration de sperme faible et élevée après l'analyse des échantillons de sperme dilués avec le système CASA, ce qui indique qu'une concentration élevée de spermatozoïdes peut fausser les résultats du comptage, de la motilité et des paramètres cinétiques des spermatozoïdes. De plus, le manuel de l'OMS (5e édition) (Organisation mondiale de la Santé, 2010) recommande que la concentration de sperme dans les échantillons de sperme détectés avec le système CASA soit inférieure à  $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , et Mortimer (2000) recommande même qu'elle soit moins de  $40 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

En fait, c'est compréhensible. Lorsque les paramètres cinétiques des spermatozoïdes sont analysés à l'aide du système CASA, les trajectoires de tous les spermatozoïdes dans les champs détectables doivent être reconstruites. S'il y a trop de spermatozoïdes dans un champ, le risque de collisions mutuelles entre les spermatozoïdes augmentera. Deux ou plusieurs trajectoires des spermatozoïdes semblaient trop proches ne peuvent pas être reconstruites avec précision par le système CASA. En conséquence, les paramètres dynamiques du sperme seront modifiés, et les catégories de motilité des spermatozoïdes peuvent être affectées.

De ce fait, lorsque les échantillons de sperme sont analysés à l'aide du système CASA, les échantillons à forte concentration de spermatozoïdes doivent être dilués avec leur plasma séminal correspondant (Lu et al., 2013). Le dilueur utilisé ne doit pas contenir de particules d'une taille similaire à celle des têtes de spermatozoïdes (par exemple, jaune d'œuf non clarifié), car ils ne seront pas différenciés des spermatozoïdes non mobiles (Iguer-Ouada M, Versteegen J. 2002).

#### **2.7.e. Standardisation et mesures de contrôle qualité pour CASA :**

Le facteur humain peut également affecter les résultats de l'analyse de différentes manières, des exigences spécifiques doivent donc être remplies. Le technicien de laboratoire joue un rôle crucial dans ces conditions complexes d'évaluation et peut influencer la quasi-totalité des facteurs susmentionnés, afin de garder les résultats obtenus fiables et reproductibles (Michos et al.2013, Amann et Waberski 2014). Par conséquent, CASA, en tant que système sophistiqué, impose des exigences élevées aux opérateurs qualifiés. De plus, comme il n'y a pas de norme d'or définie pour les méthodes d'analyse de la motilité des spermatozoïdes animaux, il est donc recommandé d'établir un mode opératoire standard pour un laboratoire spécifique. Cela devrait s'accompagner de la détermination de la répétabilité de l'évaluation, lorsque la répétabilité supérieure à 95% est possible (Feitsma et al. 2011). En d'autres termes, l'une des difficultés dans l'utilisation de CASA est le facteur humain. L'achat et la création de CASA impliquent non seulement l'entretien des installations, mais les opérateurs doivent connaître les principes de CASA et doivent être formés périodiquement (Michos et al. 2013).

### **1.8. Limites de CASA:**

Bien qu'il s'agisse d'un outil fiable qui a la capacité de fournir des mesures détaillées des dimensions de la tête et de la pièce médiane du sperme, la plupart des systèmes CASA disponibles dans le commerce ne sont pas capables d'analyser les caractéristiques de la queue du sperme et limitent par conséquent l'application de cette technologie dans les milieux cliniques (Mortimer et al., 2015). De plus, les systèmes CASA ne sont pas des robots prêts à l'emploi et peuvent être influencés, comme toute autre technique automatisée, par plusieurs artefacts liés à des réglages inappropriés et des erreurs techniques (Kraemer et al., 1998; Ibănescu et al., 2016).

Avec les progrès récents réalisés dans le logiciel CASA, bon nombre des limitations affectant la performance de mesure CASA ont été partiellement ou totalement annulées. Par exemple, lorsqu'elle est évaluée manuellement, la motilité du sperme est définie et catégorisée en fonction de son mouvement flagellaire et de son modèle de battement, tandis que CASA dépend principalement du suivi du déplacement de la tête du sperme. Il a été affirmé que

l'évaluation du pourcentage de motilité des spermatozoïdes à l'aide de CASA pourrait ne pas être fiable en raison de la mauvaise identification potentielle des débris particuliers comme des spermatozoïdes immobiles (OMS, 2010).

Cependant, les nouveaux modèles CASA sont incorporés avec des filtres intelligents éliminant certaines particules de taille similaire à celle du sperme, mais surtout utilisant un contraste de phase positif où la plupart des images d'arrière-plan sont maintenant visualisées dans noir et par conséquent non représenté comme faisant partie du sperme réfléchissant blanc. En outre, une fonction appelée «dérive» peut être définie pour éliminer non seulement le mouvement brownien, mais également un flux mineur et même aider à contrer la détection d'un sperme immobile légèrement déplacé comme mobile en raison d'une collision avec un spermatozoïde mobile. Ces caractéristiques permettent une évaluation plus précise et objective de la numération et de la motilité des spermatozoïdes (Mortimer et al., 2015).

### **1.9. Future potentiel de CASA**

Les conditions pour étudier le mouvement des spermatozoïdes sont un compromis. Les spermatozoïdes sont suspendus dans un milieu différent de tout ce qu'ils rencontreront in vivo. La suspension est vue dans une chambre (ou gouttelette) dans laquelle les spermatozoïdes s'accumulent aux interfaces entre la suspension et l'air, ou dans la paroi de la chambre, où ils nagent différemment que s'ils étaient éloignés de l'interface (Rothschild Lord, 1963 : Woolley DM, 2003 : Su TW et al, 2013). Les lois de l'optique imposent une faible profondeur de champ dans laquelle un spermatozoïde objet peut être détecté par une puce à matrice typique et même dans une chambre de 20 mm de profondeur, certains spermatozoïdes peuvent ne pas être détectés. Des approches pour acquérir des images de spermatozoïdes nageant en trois dimensions émergent. Les chercheurs qui étudient la biologie des spermatozoïdes devraient pousser pour augmenter leur disponibilité, car la faible profondeur de champ entrave le mouvement libre des spermatozoïdes.

Cependant, il est peu probable qu'un passage des approches actuelles à la mesure du mouvement ou de la morphologie des spermatozoïdes dans une chambre profonde améliorera

la prise de décision dans une installation de production, où l'objectif est d'identifier et d'éliminer rapidement les échantillons contenant trop de spermatozoïdes jugés anormaux sur la base des données historiques. données de tous les échantillons similaires vus avec le même système et les mêmes conditions. Les cliniciens sur le terrain (par exemple, examen de la qualité de l'élevage de taureaux dans des conditions d'élevage ou de la faune sur le terrain) ou dans une petite pratique en site fixe devraient fournir un marché pour un système CASA robuste, simple et bifonctionnel pour rapporter les pourcentages de motile (basé sur VCL, VAP et / ou LIN) et morphologie non anormale (basée sur 2 à 4 critères pour la tête et la queue) du sperme.

## **2. Méthodes complémentaires d'analyse spermatique :**

Différentes approches ont été développées pour effectuer une analyse large et exhaustive des paramètres de qualité du sperme. Les informations obtenues à partir des différentes approches sont de la plus haute importance pour étudier la physiologie, la fonction et les caractéristiques intrinsèques du sperme. Différentes approches utilisant diverses techniques, complémentaire a CASA, pour évaluer des moments fonctionnels spécifiques du spermatozoïde (c.-à-d. Capacitation, réaction acrosomique) permettent d'élucider diverses voies sous-jacentes à une fonction spécifique et d'avoir une vue plus large sur un événement spécifique. Les chercheurs se focalisent généralement sur des paramètres pour des événements spécifiques, mais les études sur la spermatologie au cours des dernières décennies ont démontré qu'une approche multiparamétrique est préférable car certains événements de la vie des spermatozoïdes ne peuvent être expliqués par un seul paramètre.

### **2.1. Cryométrie en flux**

Au cours des deux ou trois dernières décennies, la cytométrie en flux a acquis une très grande importance en spermatologie: la diffusion de nombreux cytomètres ainsi que leurs performances élevées dans l'analyse des cellules ont attiré l'attention de nombreux chercheurs.

La cytométrie en flux repose principalement sur la possibilité d'analyser des cellules individuelles traversant un flux liquide en les excitants avec des lasers spécifiques et en lisant la

réponse de la cellule. Les fluorochromes jouent un rôle important dans ce système car, en choisissant les bons, ils permettent d'étudier différentes fonctions / caractéristiques de la cellule (Hossain et al., 2011).

Habituellement, la cytométrie en flux (similaire à celle observée en microscopie à épifluorescence) permet de déterminer différentes populations de spermatozoïdes, sur la base de leur positivité à une coloration déterminée (Hossain et al., 2011), combinant également deux ou plusieurs colorants (Martínez- Pastor et al., 2010; Robles et Martínez-Pastor, 2013).

En spermatologie, de nombreux dosages peuvent être réalisés par cytométrie en flux (Guthrie et Welch, 2007; Martínez-Pastor et al., 2010; Hossain et al., 2011; Robles et Martínez-Pastor, 2013) permettant ainsi une très large gamme de paramètres à être évalué par cette technique.

Avant de donner quelques exemples, certains points importants doivent être soulignés. Après quelques années d'expérience dans le travail sur la cytométrie en flux, nous avons remarqué que la littérature manque parfois d'informations importantes concernant la technique: la conception expérimentale ainsi que les caractéristiques techniques du cytomètre en flux et le réglage utilisé dans l'analyse sont complètement absents. Il devrait être recommandé d'avoir une approche rigoureuse dans la description des matériaux et des méthodes, comme indiqué dans (Lee et al., 2009).

Une autre remarque technique importante concerne la possibilité de surestimer certaines sous-populations de spermatozoïdes, à savoir celles qui sont négatives pour une coloration déterminée; dans ce cas, en fait, la sous-population négative pourrait contenir certaines particules non cellulaires (acrosomes cellulaires, queues; particules non spermatiques) qui pourraient être détectées par un instrument. Pour surmonter cette lacune technique, (Petrunina et al., (2010) et Petrunina et Harrison (2010) ont développé une technique spécifique ainsi qu'une formule mathématique pour éviter de grosses erreurs dans l'estimation des sous-populations.

La cytométrie en flux a été utilisée chez différentes espèces (Maxwell et Johnson, 1997; Rijsselaere et al., 2005; Pinart et al., 2015; Battut et al., 2017) pour déterminer à la fois la qualité et la fonction du sperme.

La technique permet d'estimer l'intégrité de la membrane (Pinart et al., 2015; Bucci et al., 2018), la fonction mitochondriale et la production de ROS (Gravance et al., 2000; Koppers et al., 2008; Gibb et al., 2015; Gürler et al., 2015; Bucci et al., 2018), peroxydation lipidique (Aitken et al., 2007; Ortega Ferrusola et al., 2009), capacitation du sperme (Rathi et al., 2001; Piehler et al., 2006) ; Martínez-Pastor et al., 2010; Hossain et al., 2011); statut oxydatif (Gibb et al., 2014; Giaretta et al., 2015).

L'utilisation d'anticorps liés au fluorochrome contre des protéines spécifiques ou des protéines activées (c'est-à-dire phosphorylées) est d'une importance réelle (Piehler et al., 2006); il est à noter que, dans le cas de la cytométrie en flux, la sortie de l'instrument lors de l'utilisation d'anticorps pourrait être liée à la présence / absence de la protéine déterminée et, partiellement, à l'intensité du signal (qui pourrait être liée à la quantité de la protéine). Cette technique ne donne aucune information sur la localisation de la protéine au sein de la cellule, même si certains nouveaux cytomètres permettent également l'inspection visuelle des cellules traversant le flux.

À l'heure actuelle, l'analyse multiparamétrique est possible, et le développement de cytomètres les plus récents avec plus de lasers et de canaux optiques permet l'évaluation contemporaine de différents paramètres, donnant ainsi une sortie multiparamétrique extrêmement précieuse pour déterminer les états fonctionnels des cellules spécifiques (c.-à-d. la capacitation) (Bucci et al., 2019)

## **2.2. L'analyse Protéomique**

L'analyse de l'expression des protéines est d'une importance fondamentale pour essayer d'étudier la fonction du sperme, car de nouvelles protéines pourraient être découvertes dans le spermatozoïde mature et leur fonction pourrait être élucidée. Plusieurs études ont démontré la présence de protéines à la fois par une technique d'inspection visuelle (microscopie) et par une

analyse de protéines comme le Western blot (Flores et al., 2008; Bucci et al., 2010b, 2010a; Flores et al., 2011; Spinaci et al., 2014). Cette dernière est généralement considérée comme la technique la plus spécifique pour reconnaître efficacement une protéine déterminée, car la possibilité d'obtenir des résultats faussement positifs est nettement inférieure par rapport à la technique d'immunofluorescence.

L'analyse par Western blot permet également de quantifier la quantité d'une protéine déterminée; cette approche pourrait être d'une importance fondamentale dans la compréhension de certains processus physiologiques ou changements induits par les procédures biotechniques du sperme (Spinaci et al., 2005b; 2006). Là encore, cette technique, couplée à une immunolocalisation de la protéine d'intérêt, pourrait donner des informations intéressantes et fondamentales concernant la quantité ainsi que les changements possibles du site d'expression d'une protéine donnée.

De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques pourrait être très utile pour détecter des changements dans la quantité de protéines activées dans un état fonctionnel déterminé (c.-à-d. Capacitation ou réaction acrosomique ou après décongélation). C'est le cas des études portant sur les protéines régulatrices de voies intracellulaires déterminées (Harayama et al., 2004; Maccarone et al., 2005; Grasa et al., 2009; Ramió-Lluch et al., 2011a, b; Bucci et al., 2012; Gonzalez-Fernandez et al., 2012; Hurtado De Llera et al., 2013; Gonzalez-Fernandez et al., 2013; Yeste et al., 2014); dans les exemples rapportés, des anticorps spécifiques contre des protéines / protéines activées ont été utilisés pour déterminer l'état d'activation de voies spécifiques et / ou du spermatozoïde entier.

Le rôle central des protéines dans les processus cellulaires des mammifères doit également être pris en compte en spermatologie; de cette manière, plusieurs protéines ont été proposées comme indicateurs spécifiques de fonctions déterminées (Spinaci et al., 2005b; Pinart et al., 2015), même s'il faut être prudent dans ce type d'approche. C'est une volonté commune des chercheurs de trouver le paramètre «one-man band», capable de décrire, à lui seul, tout un processus. Quoi qu'il en soit, il n'est pas si facile de détecter un tel paramètre ni d'expliquer toujours l'ensemble du processus.

### 2.3. Analyse des spermatozoïdes par microscopie à épifluorescence

Un outil très précieux pour étudier les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes est, bien entendu, le microscope. Dans cette revue, nous n'abordons pas l'évaluation microscopique standard, qui représentait un standard d'or de l'évaluation des spermatozoïdes dans le passé (c'est-à-dire la morphologie) (Love, 2011) mais nous nous concentrerons sur l'analyse des spermatozoïdes par des sondes fluorescentes ou des anticorps conjugués au fluorochrome, qui permettent une analyse des différentes conditions et fonctions du sperme par une visualisation directe du spermatozoïde unique.

Plusieurs sondes fluorescentes sont utilisées en spermatologie (Silva et Gadella, 2006), la plupart concernant l'intégrité de la membrane du sperme (SYBR green 14; propidium iodide; sytox green) (Maxwell et Johnson, 1997), l'intégrité de la membrane acrosomale (conjuguée FITC ou TRITC Pisum sativum agglutinine et arachides agglutinine) (Mari et al., 2010), activité mitochondriale (JC1) (Gravance et al., 2000; Giaretta et al., 2014) sites de stockage du calcium (chlortétracycline - CTC, fluo3 et fluo 4) (Green et Watson, 2001 ; Bucci et al., 2012); déstabilisation de la membrane (annexine V conjuguée au FITC) (Spinaci et al., 2005a); l'activation de la caspase (conjuguée au VAD-fmk FITC) (Vallorani et al., 2010); réorganisation du cytosquelette d'actine (phalloïdine conjuguée à TRITC) (Brenner, 2002); Fragmentation de l'ADN (Halomax<sup>®</sup>) (De Ambrogi et al., 2006; Alkmin et al., 2013). Voici quelques exemples qui expliquent clairement l'ampleur de l'utilisation de la microscopie fluorescente en spermatologie. La principale approche suivie par les chercheurs lors de l'utilisation de sondes fluorescentes est de visualiser un seul spermatozoïde et de comprendre si la sonde colore la cible ou non. L'évaluation est effectuée sur un échantillon enduit et un nombre approprié de cellules (généralement au moins 200) est examiné. De cette manière, cette technique permet de réaliser à la fois une étude de description (pour délimiter quels compartiments de spermatozoïdes sont colorés par une sonde spécifique) et une étude de sous-population, car il est possible de distinguer la sous-population positive de la sonde de la négative. Lors de l'utilisation de plus d'une sonde mélangée ensemble (c.-à-d. JC1 + PI + SYBR green 14), l'analyse

de sous-population est enrichie en différentes classes (c.-à-d. Cellules vivantes avec / sans mitochondries actives; cellules mortes avec / sans mitochondries actives)

De plus, ce type d'approche permet d'examiner les caractéristiques particulières de certains organites et leurs schémas d'activation spécifiques (Ramió-Lluch et al., 2011b).

L'application la plus intéressante de la microscopie fluorescente concerne les études d'immunolocalisation utilisant des anticorps conjugués au fluorophore. Plusieurs études de nos laboratoires et de nombreux autres (Maccarrone et al., 2005; Spinaci et al., 2005b; Jones et al., 2008; Bucci et al., 2010b, 2010a; Flores et al., 2010; Bucci et al., 2011, 2012; Ramió-Lluch et al., 2012; Spinaci et al., 2013, 2014) ont utilisé des anticorps contre une protéine ou un résidu protéique spécifique pour détecter la présence de protéines spécifiques dans les spermatozoïdes ainsi que pour décrire leur localisation et une relocalisation éventuelle à différents moments fonctionnels tels que la capacitation.

De plus, ce type d'approche est fondamental pour découvrir de nouvelles caractéristiques du spermatozoïde et éventuellement de nouvelles protéines (ou du moins des protéines dont on ne sait pas qu'elles sont exprimées dans le spermatozoïde) qui peuvent jouer des rôles intéressants et surprenants (Flores et al., 2010). ; Ramió-Lluch et al., 2012; Spinaci et al., 2014).

## Conclusion :

Les systèmes CASA ont considérablement évolué au cours des deux dernières décennies pour devenir des outils puissants pour l'évaluation rapide et objective de la concentration, de la motilité et de la cinématique des spermatozoïdes, ainsi que de la morphologie, chez presque tous les mammifères, y compris les humains. En quelques secondes, des centaines à des milliers de spermatozoïdes peuvent être analysés avec une grande précision. À cet égard, CASA est de loin supérieur aux évaluations manuelles subjectives ; il mesure quantitativement différents aspects de la vitesse du sperme, de l'hyperactivation et de la morphométrie, ce qui ne peut pas être fait manuellement. Des modules CASA de nouvelle génération ont été récemment développés pour quantifier automatiquement divers aspects de la fonctionnalité du sperme, tels que la fragmentation de l'ADN du sperme, la vitalité du sperme et l'intégrité et la réaction des acrosomes.

Cette enquête s'est principalement concentrée sur des études relatives à la motilité et à la morphologie des spermatozoïdes des animaux domestiques, ainsi que de diverses espèces sauvages; fournissant des réglages de paramètres, en plus de nouvelles données de base pour des échantillons principalement normospermiques; montrant que même les échantillons les plus difficiles, tels que les spermatozoïdes de rat et de souris, peuvent maintenant être analysés en routine pour la motilité et la morphologie, présentant ainsi un outil puissant pour les études de toxicologie. Comme le montrent la littérature actuelle, il existe de nombreuses applications pour l'utilisation courante de CASA dans le laboratoire de recherche, la gestion de la faune et l'évaluation clinique de la fertilité (humaine et vétérinaire).

Enfin, pour permettre l'étude des relations entre le mouvement du sperme, la concentration, la morphologie et la fertilité, des études de définition de base sont justifiées pour fixer les limites et la fourchette normale des paramètres des éjaculats normaux, en tenant compte, en particulier, des espèces et des variations d'âge. Les intérêts liés à la définition, à l'analyse et à la caractérisation des sous-populations à l'aide d'approches statistiques multifactorielles semblent essentiels à cet égard.

Malgré l'absence d'une standardisation universelle totale, les différents instruments CASA ont tous démontré actuellement des niveaux élevés de précision et de fiabilité. Même s'ils peuvent parfois être décevant, la disponibilité de ces instruments et le respect d'une standardisation partielle stricte donneront l'occasion de comparer objectivement le mouvement et la morphologie du sperme. Par conséquent, CASA fournit un outil efficace, précis et fiable pour évaluer objectivement la fertilité, améliorer les technologies de reproduction artificielle et développer des études physiologiques ou toxicologiques.

## References bibliographiques:

- Abaigar T, Barbero J, Holt WV: Trajectory variance and autocorrelations within single sperm tracks as population-level descriptors of sperm track complexity, predictability, and energy-generating ability. *J Androl* 2012, 33(2):216–228.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA. 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*, 13, 203-211.
- Alkmin DV, Martinez-Alborcia MJ, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. 2013. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79:1294-1300.
- Alkmin DV, Martinez-Alborcia MJ, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. 2013. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79:1294-1300.
- Alvarez, C.,Castilla,J.A.,Ramírez,J.P.,Vergara,F.,Yoldi,A.,Fernandez,A., Gaforio, J.J.,2005.External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J.Assist.Reprod.Genet.*22,379–387
- Amann R P and Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81 (1): 5–17
- Amann RP, Hammerstedt RH. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* 1980;23:647–56.
- Amann RP, Katz DF (2004) Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 25:317–325.
- Amann, R. P., and Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5–17.e3.  
doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.004
- Auger, J., Eustache, F., Andersen, A.G., Irvine, D.S., Jørgensen, N., Skakkebaek, N.E., Suominen, J., Toppari, J., Vierula, M. and Jouannet, P., 2001. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human reproduction*, 16(12), 2710-2717.
- Baig AS, Shoebuddin M, Ahmed M. Comparison of manual sperm analysis with computer-assisted sperm analysis: A comparative cross-sectional study. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2019;9(9):862-864.
- Barth, A.D.,Bowman,P.A.,Bo,G.A.,Mapletoft,R.J.,1992.Effectofnarrow sperm head shape on fertility in cattle.*Can.Vet.J.*33,31–39.
- Battut IB, Kempfer A, Lemasson N, Chevrier L, Camugl S. 2017. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97:186-200.
- Bielsa MA, Andolz P, Grtis JM. Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples. *Hum Reprod* 1994; 9: 1887-1890.
- Boatman DE, Bavister BD. Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J Reprod Fertil* 1984;71:357-366.

- Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989;12:167–200
- Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989;12:167–200.
- Brener E. 2002. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 68:837-845.
- Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., ... Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, 85, 1507–1527. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>
- Brokaw, C. J. (1991). Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 123–130. doi:10.1002/CM.970180207
- Brown CA, Boone WR, Shapiro SS. Improved cryopreserved semen fecundability in an alternating fresh-frozen artificial insemination program. *Fertil Steril* 1988; 50:825-827.
- Bucci D, Isani G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Galeati G. 2010a. Comparative immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45:315-322.
- Bucci D, Isani G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Galeati G. 2010a. Comparative immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45:315-322.
- Bucci D, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2012. In vitro capacitation and subsequent acrosome reaction are related to changes in the expression and location of midpiece actin and mitofusin-2 in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 77:979-988.
- Bucci D, Spinaci M, Vallorani C, Contri A, Carluccio A, Isani G, Tamanini C, Galeati G. 2010b. Detection and localization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in donkey spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45:e217-20.
- Bucci D, Spinaci M, Vallorani C, Contri A, Carluccio A, Isani G, Tamanini C, Galeati G. 2010b. Detection and localization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in donkey spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45:e217-20.
- Bucci D, Spinaci M, Yeste M, Mislei B, Gadani B, Prieto N, Love C, Mari G, Tamanini C, Galeati G. 2018. Combined effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate on post thaw boar sperm and IVF parameters. *Theriogenology*, 117:16-25.
- Byrd W, Bradshaw K, Carr B, Edman C, Odom J, Ackerman G. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor semen. *Fertil Steril* 1990;53:521-527.
- Castellini C, Dal Bosco A, Ruggeri S, Collodel G (2011) What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil Steril* 96:24–27.
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A., Hoyt, P.G., 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71, 638–1646

- Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R. Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia* 2001;33:159-163.
- Comhaire FH, Huysse S, Hinting A, Vermeulen L, Schoonjans F. Objective semen analysis: Has the target been reached? *Hum Reprod* 1992;7:237-241.
- Cooper, T.G.,Bjorndahl,L.,Vreeburg,J.,Nieschlag,E.,2002.Semenanalysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int.J.Androl.*25,306–311.
- Davis, R.O.,Bain,D.E.,Siemers,R.J.,Thal,D.M.,Andrew,J.B.,Gravance, C.G., 1992.Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil.Steril.*58,763–769.
- De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C. 2006. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, 66:1994-2000.
- Dearing, C. G., Kilburn, S., & Lindsay, K. S. (2014). Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Human Fertility*, 17, 37–44. <https://doi.org/10.3109/14647273.2013.865843>
- Demott, R.P. and Suarez, S.S., 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction*, 46(5), 779-785. Desai, N.R., Mahfouz, R., Sharma, R., Gup
- Denissenko, P., Kantsler, V., Smith, D. J., and Kirkman-Brown, J. (2012). Human spermatozo migration in microchannels reveals boundaryfollowing navigation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 8007–8010. doi:10.1073/PNAS.1202934109
- Diego Bucciş, Marcella Spinaci, Giovanna Galeati, Carlo Tamanini. 2019. Different approaches for assessing sperm function. *Anim. Reprod.*, v.16, n.1, p.72-80, Jan./Mar. 2019. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0122
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl* 2005;26:107–14.
- Elzanaty S, Malm J, Giwercman A (2004) Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Androl* 27:94–100.
- Elzanaty S, Malm J, Giwercman A (2004) Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Androl* 27:94–100.
- Falzone N, Huyser C, Fourie F, Toivo T, Leszczynski D, Franken D (2008) In vitro effect of pulsed 900 MHz GSM radiation on mitochondrial membrane potential and motility of human spermatozoa. *Bioelectromagnetics* 29: 268–276.
- Feitsma H, Broekhuijse M L W J and Gadella B M. 2011. Do CASA Systems Satisfy Consumers Demands? A Critical Analysis. *Reproduction in Domestic Animals* 46 49–51.
- Feitsma, H.; Broekhuijse, M.L.; Gadella, B.M. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. *Reprod. Domest. Anim.* 2011, 46, 49–51.
- Ferraz M, Morato R, Yeste M, Arcarons N, Pena A I, Tamargo C, Hidalgo C O, Muino R and Mogas T. 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro spermocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls.

- Fetterolf PM, Rogers BJ (1990) Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Mol Reprod Dev* 27:326–331.
- Filimberti, E., Degl'Innocenti, S., Borsotti, M., Quercioli, M., Piomboni, P., Natali, I., Fino, M. G., Caglieresi, C., Criscuoli, L., Gandini, L., Biggeri, A., Maggi, M., Baldi, E., 2013. High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology-US* 1, 401–407
- Fitzpatrick L A, Fordyce G, McGowan M R, Bertram J D, Doogan V J, De Faveri J, Miller R G and Holroyd R G. 2002. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. *Animal Reproduction Science* 71 (1-2): 39–49.
- Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, Bonet S, Briz MD, Pinart E, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2008. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69:1083-1094
- Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2010. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *Theriogenology*, 74:354-363.
- Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2011. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*, 76:1450-1464.
- Fréour, T., Jean, M., Mirallie, S. and Barriere, P., 2012. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Systems biology in reproductive medicine*, 58(2), 102-106.
- Fuse H, Akashi T, Nozaki T, Nishio R, Mizuno I. Assessment of sperm quality analyzer II B: Comparison with manual semen analysis and CASA. *Syst Biol Reprod Med* 2005;51:65-7.
- Gago C, Perez Sanchez F, Yeung C, Tablado L, Cooper T, et al. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer assisted image analysis. *Int J Androl* 1998; 21: 169–76
- Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2017). Sperm morphology: Assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5, 845–862. <https://doi.org/10.1111/andr.12389>
- Giaretta E, Bucci D, Mari G, Galeati G, Love CC, Tamanini C, Spinaci M. 2014. Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen? *J Equine Vet Sci*, 34:1307-1312.
- Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M. 2015. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 83:399-407.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. 2014. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. *Biol Reprod*, 91:1-10.
- Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J, Smith ND, Aitken RJ. 2015. L-Carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biol Reprod*, 93:104

- González-Fernández L, Macías-García B, Loux SC, Varner DD, Hinrichs K. 2013. Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol Reprod*, 88:1-12.
- Gonzalez-Fernandez L, Macias-Garcia B, Velez IC, Varner DD, Hinrichs K. 2012. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction*, 144:411-422.
- Grasa P, Colas C, Gallego M, Monteagudo L, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2009. Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*, 137:655-667.
- Gravance CG, Garner D, Baumber J, Ball B. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53:1691-1703.
- Green CE, Watson PF. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122:889-898.
- 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, 13(1):142–145.
- Gunalp, S., Onculoglu, C., Gurgan, T., Kruger, T.F. and Lombard, C.J., 2001. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human reproduction*, 16(1), 110-114.
- Gürler H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic JP, Bollwein H. 2015. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86:562-571.
- Guthrie HD, Welch GR. 2007. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4- difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza- s-indacene-3-undecano. *J Anim Sci*, 85:1402-1411.
- Hammond MG, Jordan S, Sloan CS. Factors affecting pregnancy rates in donor insemination program using frozen semen. *Am J Obst Gynecol* 1986;155:480-485.
- Harayama H, Sasaki K, Miyake M. 2004. A unique mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced increase of 32-kDa tyrosine-phosphorylated protein in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 69:194-204.
- Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003.
- Hiramoto, Y., and Baba, S. A. (1978). A quantitative analysis of flagellar movement in echinoderm spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 76, 85–104.
- Holt, W. V., Moore, H. D. M., and Hillier, S. G. (1985). Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil. Steril.* 44, 112–119. doi:10.1016/S0015-0282(16)48687-5
- Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl*, 13:406-419.

- Hu YA, Lu JC, Lu NQ, Shao Y, Huang YF (2006) Comparison of four methods for sperm counting. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12:222–224, 227.
- Hurtado De Llera A, Martin-Hidalgo D, Rodriguez-Gil JE, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. 2013. AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*, 1828:2143-2151.
- Ibănescu, I., Leiding, C., Ciornei, Ș.G., Roșca, P., Sfartz, I. and Drugociu, D., 2016. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Animal reproduction science*, 166, 72-79.
- Iguer-Ouada M, Verstegen J. Evaluation of the Hamilton Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis *Theriogenology* 2001;55:733-749.
- Jasko, D.J.,Lein,D.H.,Foote,R.H.,1990.Determinationoftherelationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases(1987 1988).*J.Am.Vet.Med.Assoc.*197,389–394
- Jayaprakasan R, Naeem A, Pridmore T: Validation of a novel computerassisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertil Steril* 2010, 93(6):1911–1920.
- Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biol. Reprod*, 79:421-431.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K and Kadirvel G. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals* 46 (1): 165-72.
- Katz, D. F., and Overstreet, J. W. (1981). Sperm motility assessment by videomicrography. *Fertil. Steril.* 35, 188–193. doi:10.1016/S0015-0282 (16)45320-3
- Katz, D.F., Yanagimachi, R. and Dresdner, R.D., 1978. Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *Journal of reproduction and fertility*, 52(1), 167-172.
- Komori K, Tsujimura A, Ishijima S, Tanjapatkul P, Fujita K, Matsuoka Y, et al. Comparative study of sperm motility analysis system and conventional microscopic semen analysis. *Reprod Med Biol* 2006;5:195-200.
- Koppers AJ,De luliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol, Metab*, 93:3199-3207.
- Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B. and Auger, J., 1998. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(3), 611-619.
- Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 172–8.
- Kruger, T.F.,Dutoit,T.C.,Franken,D.R.,Acosta,A.A.,Oehninger,S.C., Menkveld, R.,Lombard,C.J.,1993.Anewcomputerizedmethodof reading sperm morphology(strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil.Steril.*59,202–209

- Lammers J, Spingart C, Barrière P, Jean M, Fréour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assis Reprod Genet* 2014;31:35-43.
- Lee JA, Spidlen J, Boyce K, Cai J, Crosbie N, Dalphin M, Furlong J, Gasparetto M, Goldberg M, Goralczyk EM, Hyun B, Jansen K, Kollmann T, Kong M, Leif R, McWeeney S, Moloshok TD, Moore W, Nolan G, Nolan J, Nikolich-Zugich J, Parrish D, Purcell B, Qian Y, Selvaraj B, Smith C, Tchuvatkina O, Wertheimer A, Wilkinson P, Wilson C, Wood J, Zigon R, International Society for Advancement of Cytometry Data Standards Task Force, Scheuermann RH, Brinkman RR. 2009. MIFlowCyt: the minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytometry*, 73:926-930
- Liu M, Deng S, Ma C, Chen A, Jiang Y, Wen R, Wang Q, nTang L, Huang J, Yao X (2004) Comparison of sperm motion parameters in pre-freeze and post-thaw semen samples using computer-assisted sperm analysis. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10:431–433.
- Louis, G.M.B., Sundaram, R., Schisterman, E.F., Sweeney, A., Lynch, C.D., Kim, S., Maisog, J.M., Gore-Langton, R., Eisenberg, M.L. and Chen, Z., 2014. Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. *Fertility and sterility*, 101(2), 453-462.
- Love CC. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76:547-557.
- Lu, J.C., Huang, Y.F. and Lü, N.Q., 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*, 46(4), 329-338.
- Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. 2005. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci*, 118:4393-4404.
- Machin, K. E. (1958). Wave propagation along flagella. *J. Exp. Biol.* 35, 796–806.
- MacLeod, J. and Gold, R.Z., 1951. The male factor in fertility and infertility: IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertility and sterility*, 2(5), 394-414.
- Maree, L., Du Plessis, S.S., Menkveld, R. and Van der Horst, G., 2010. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction*, 25(6), 1369-1382.
- Mari G, Rizzato G, Merlo B, Iacono E, Bucci D, Seren E, Tamanini C, Galeati G, Spinaci M. 2010. Quality and fertilizing ability in vivo of sex-sorted stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45:331-335.
- Martinez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Domest Anim*, 45:67-78
- Maxwell WM, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, 46:408-418.
- Maxwell WM, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, 46:408-418.
- MICHOS (H.A. ΜΙΧΟΣ), I., BASIOURA (Α.Γ. ΜΠΑΣΙΟΥΡΑ), Α., BOSCOS (Κ.Μ. ΜΠΟΣΚΟΣ), C., & TSAKMAKIDIS (Ι.Α. ΤΣΑΚΜΑΚΙΔΗΣ), Ι. (2017). Proper use and impact of ‘Computer Assisted

- Semen Analysis' technique on semen evaluation of farm animals. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 64(4), 267-274.
- Michos I A, Basioura A G, Boscoc C M and Tsakmakidis I A. 2013. Proper use and impact of 'Computer Assisted Semen Analysis' technique on semen evaluation of farm animals. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 64 (4): 267-74.
  - Miki, K., and Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr. Biol.* 23, 443–452. doi:10.1016/J.CUB.2013.02.007
  - Mortimer ST, Swan MA (1999) The development of smoothing-independent kinematic measures of capacitating human sperm movement. *Hum Reprod* 14:986–996
  - Mortimer, S.T. and Mortimer, D., 1990. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal of andrology*, 11(3), 195-203.
  - Mortimer, S.T., 2000. CASA—practical aspects. *Journal of andrology*, 21(4), 515-524.
  - Mortimer, S.T., van der Horst, G. and Mortimer, D., 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*, 17(4), 545-553.
  - Moruzzi JF, Wyrobek AJ, Mayall BH, Gledhill BL. Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil Steril* 1988;50:142–62.
  - Mukhopadhyay, D., Varghese, A.C., Nandi, P., Banerjee, S.K. and Bhattacharyya, A.K., 2010. CASA-based sperm kinematics of environmental risk factor-exposed human semen samples designated as normozoospermic in conventional analysis. *Andrologia*, 42(4), 242-246.
  - Nafisi VR, Moradi MH, Nasr-Esfahani MH (2005) A template matching algorithm for sperm tracking and classification. *Physiol Meas* 26:639–651.
  - Neuwinger, J., Behre, H. M., and Nieschlag, E. (1990). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.* 54, 308–314. doi:10.1016/S0015-0282(16)53709-1
  - Oliveira L Z, de Arruda R P, de Andrade A F C, Celeghini E C C, Reeb P D, Martins J P N, dos Santos R M, Beletti M E, Peres R F G, Monteiro F M and de Lima V. 2013. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science* 137 (3-4): 145-55.
  - Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., Steeno, O., 1995. Sperm morphology assessment: Historical review In relation of fertility. *Hum. Reprod. Update* 1, 543–557.
  - Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 138:55-63.
  - Owen DH, Katz DF (1993) Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl* 14:210–221.
  - Parker GA. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev* 45:525-567.
  - Petrunkina AM, Harrison RAP. 2010. Systematic misestimation of cell subpopulations by flow cytometry: A mathematical analysis. *Theriogenology*, 73:839-847.

- Petrunkina AM, Waberski D, Bollwein H, Sieme H. 2010. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*, 73:995-1000
- Piehler E, Petrunkina AM, Ekhlas-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. 2006. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. *Cytometry A*, 69:1062-1070.
- Pinart E, Yeste M, Bonet S. 2015. Acrosin activity is a good predictor of boar sperm freezability. *Theriogenology*, 83:1525-1533.
- Pinart E, Yeste M, Bonet S. 2015. Acrosin activity is a good predictor of boar sperm freezability. *Theriogenology*, 83:1525-1533.
- Punjabi, U., Wyns, C., Mahmoud, A., Vernelen, K., China, B., & Verheyen, G. (2016). Fifteen years of Belgian experience with external quality assessment of semen analysis. *Andrology*, 4, 1084–1093. <https://doi.org/10.1111/andr.12230>
- Ramió-Lluch L, Fernández-Novell JM, Peña A, Bucci D, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2012. In vitro capacitation and subsequent acrosome reaction are related to changes in the expression and location of midpiece actin and mitofusin-2 in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 77:979-988.
- Ramió-Lluch L, Fernández-Novell JM, Peña A, Colás C, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Ramírez A, Concha II, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2011b. In vitro capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. *Reprod Domest Anim*, 46:664-673.
- Ramió-Lluch L, Fernández-Novell JM, Peña A, Ramírez A, Concha II, Rodríguez-Gil JE. 2011a. In vitro capacitation and further in vitro progesterone-induced acrosome exocytosis are linked to specific changes in the expression and acrosome location of protein phosphorylation in serineresidues of boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 47:766-776.
- Ramió-Lluch L, Yeste M, Fernández-Novell JM, Estrada E, Rocha L, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Concha II, Ramírez A, Rodríguez-Gil JE. 2014. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. *Reprod Fertil Dev*, 26:883-897.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 65:462-470.
- References:
- Rehak D, Volek J, Barton L, Vodkova Z, Kubsova M and Rajmon R. 2012. Relationships among milk yield, body weight, and reproduction in Holstein and Czech Fleckvieh cows. *Czech Journal of Animal Science* 57 (6): 274-82.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, De Kruif A. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*, 64:706-719
- Rikmenspoel R. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J Exp Biol* 1984; 108:205–30.
- Rikmenspoel R. The tail movement of bull spermatozoa. Observations and model calculations. *Biophysical J* 1965;5:365–92.

- Rothschild Lord. Non-random distribution of bull spermatozoa in a drop of sperm suspension. *Nature* 1963;198:1221–2.
- Ruestow EG. Leeuwenhoek's perception of the spermatozoa. *J Hist Biol* 1983;16:185–224.
- Schleh and Leoni: How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2013 8:6.
- Schubert B, Badiou M, Force A. Computer-aided sperm analysis, the new key player in routine sperm assessment. *Andrologia*. 2019;00:e13417.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65:958-978.
- Simon, L. and Lewis, S.E., 2011. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro?. *Systems biology in reproductive medicine*, 57(3), 133-138.
- Spinaci M, Bucci D, Chlapanidas T, Vallorani C, Perteghella S, Communod R, Vigo D, Tamanini C, Galeati G, Faustini M, Torre ML. 2013. Boar sperm changes after sorting and encapsulation in barium alginate membranes. *Theriogenology*, 80:526-532.
- Spinaci M, Bucci D, Mazzoni M, Giaretta E, Bernardini C, Vallorani C, Tamanini C, Clavenzani P, Galeati G. 2014. Expression of  $\alpha$ -gustducin and  $\alpha$ -transducin, G proteins coupled with taste receptors, in boar sperm. *Theriogenology*, 82:144-151
- Spinaci M, De Ambrogi M, Volpe S, Galeati G, Tamanini C, Seren E. 2005a. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology*, 64:191-201.
- Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G. 2005b. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev*, 72:534-541.
- Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, de Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G. 2006. Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and
- Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G. 2005b. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev*, 72:534-541.
- Su TW, Choi I, Feng J, Huang K, McLeod E, Ozcan A. Sperm trajectories form chiral ribbons. *Sci Rep* 2013;3:1664.
- Suarez, S. S., and Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12, 23–37. doi:10.1093/HUMUPD/DMI047
- Suarez, S.S., 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update*, 14(6), 647-657.
- Talarczyk-Desole, J., Berger, A., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk, L. and Jedrzejczak, P., 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?. *Ginekologia Polska*, 88(2), 56-60.
- Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, Newton T, Hopkisson J, Jayaprakasan K,
- Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati, G. 2010. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Anim Reprod Sci*, 122:58-65.

- Van der Horst, G. and du Plessis, S.S., 2017. Not just the marriage of Figaro: but the marriage of WHO/ESHRE semen analysis criteria with sperm functionality. *Postępy Andrologii Online*, 4(1), 6-21.
- Van der Horst, Gerhard & Maree, Liana. (2014). Sperm Form and Function in the Absence of Sperm Competition. *Molecular reproduction and development*. 81. 10.1002/mrd.22277.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., and Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1.
- 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;13:453-8.
- Vincent P, Underwood S L, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T and Blondin P. 2012. Bovine semen quality control in artificial insemination centres. *Animal Reproduction* 9: 153–165
- Wijchman JG, De Wolf BTHM, Jager S (1995) Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection. *Hum Reprod* 10:2090-2095.
- Woolley DM. Motility of sperm at surfaces. *Reproduction* 2003;126: 259–70.
- World Health Organisation. 1980. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 1st edition. Singapore: Press Concern.
- World Health Organization. 1987. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- World Health Organization. 1992. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- World Health Organization. 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th edition. Cambridge: Cambridge university press.
- World Health Organization. 2004. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. *Demographic and Health Surveys (DHS) Comparative reports No 9*, Calverton, Maryland, USA: ORC Macro and the World Health Organization.
- World Health Organization. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition. Geneva: WHO Press.
- Yániz JL, Soler C, Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Anim Reprod Sci* 2015; 156: 1–12
- Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2014. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLoS One*, 9:e90887.
- Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, Fisher SG, Clegg ED (1996) Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl* 17:288-292.