

2

Qualité du sperme

Dès les années 1970 aux États-Unis, certains médecins se sont inquiétés d'une éventuelle diminution de la qualité du sperme (Nelson et Bunge, 1974), cette question ne suscitant par la suite que de très rares commentaires ou recherches. En 1992, une méta-analyse de 61 articles publiés entre 1938 et 1990 rapporte l'évolution séculaire des valeurs de la concentration spermatique de près de 15 000 hommes en bonne santé et/ou fertiles (Carlsen et coll., 1992). Il ne s'agit pas d'un suivi de cohorte mais d'une analyse écologique d'études qui ont chacune décrit les caractéristiques spermatiques d'hommes recrutés à une période donnée. Pendant la période considérée, la concentration des spermatozoïdes diminuait de 1 % environ par an, de 113 millions par ml en moyenne dans les années 1930 à 66 millions par ml en moyenne 50 ans plus tard. Cette étude a été très discutée ; de multiples biais concernant la sélection des sujets, l'hétérogénéité géographique des populations considérées (biais de confusion), l'erreur de mesure sur les caractéristiques spermatiques, ainsi que des aspects concernant la méthodologie statistique ont été évoqués (revue dans Jouannet et coll., 2001).

L'étude fut par la suite réactualisée selon une méthodologie légèrement différente avec l'inclusion de 40 publications supplémentaires portant sur une période plus longue (Swan et coll., 1997). Selon l'auteur de cette étude, l'ajout de ces publications et le traitement des données permettant de prendre en compte l'origine géographique des sujets, rendant moins probable un biais de confusion lié aux caractéristiques géographiques, confirmait la baisse de la concentration spermatique aussi bien en Amérique du Nord qu'en Europe.

Données en France

Une des conséquences majeures de ces travaux est d'avoir stimulé un effort de recherche sans précédent dans le domaine. Ainsi, par exemple, de nombreuses équipes ont analysé les données dont elles disposaient pour confirmer ou non la baisse de la qualité du sperme. En 1994, par exemple, une équipe française, l'équipe du Cecos (Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humain) de Bicêtre, entreprit l'analyse des caractéristiques du sperme des hommes qui avaient été candidats à un don de sperme depuis 1973 dans ce centre ; l'intérêt de cette approche était de pouvoir étudier une population

moins sélectionnée et homogène d'hommes féconds d'âge pas trop éloignés et recrutés dans les mêmes conditions au fil des ans. Les résultats concluaient à une baisse significative des caractéristiques du sperme dans cette population d'hommes féconds vivant en région parisienne (tableau 2.I). De 1973 à 1994, la chute de la concentration des spermatozoïdes était de l'ordre de 1,6 % par an en moyenne, le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat, meilleur reflet de la production testiculaire, avait diminué d'un tiers pendant la même période, enfin, il existait une diminution significative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux (Auger et coll., 1995). À l'inverse dans une population de même type, une telle diminution séculaire n'était pas retrouvée dans le sud de la France mais la production moyenne de spermatozoïdes était plus basse qu'à Paris dès le début de l'étude mettant en évidence l'existence de différences régionales (Bujan et coll., 1996).

Données dans le monde

Depuis la moitié des années 1990, une trentaine d'autres études rétrospectives longitudinales ont été réalisées dans divers laboratoires. Certaines ont confirmé la baisse, d'autres non (tableau 2.I). L'interprétation des résultats est difficile pour la majorité d'entre elles.

Tableau 2.I : Aperçu des études rétrospectives sur la qualité du sperme publiées depuis 1995 : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats principaux

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence ^a	Concentration spermatozoïdes ^b	Autres caractéristiques ^c
Années 1960/ 1970						
Auger et coll., 1995 Paris (France)	1973-1992	1 351 (68)	CDSNS, pères	2	↓ ^d	NSvol ↓mob ↓morph
Bujan et coll., 1996 Toulouse (France)	1977-1992	302 (19)	CDSNS, pères	1	NS	ND
Vierula et coll., 1996 Turku (Finlande)	1967-1994	5 481 (196)	SFI et INF	2	NS	↓vol
Menchini Fabris et coll., 1996 Pise (Italie)	1970-1990	4 518 (215)	INF	0	↓	ND
Adamopoulos et coll., 1996 Athènes ^e (Grèce)	1977-1993	2 385 (88)	INF	1	↓↓	ND

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence ^a	Concentration spermatozoïdes ^b	Autres caractéristiques ^c
Van Waelegheem et coll., 1996 Gand (Belgique)	1977-1995	416 (22)	CDSNS, SFI	0	↓	NSvol ↓mob ↓morph
Nieschlag et Lerchl., 1996 Münster (Allemagne)	1977-1993	187 (11)	DR	0	NS	ND
Fisch et coll., 1996 New York (EU)	1972-1994	400 (17)	PREV, pères et SFI	2	↑	NSvol NSmob
Fisch et coll., 1996 Los Angeles (EU)	1978-1994	221 (13)	PREV, SFI	2	↑	NSvol NSmob
Paulsen et coll., 1996 Seattle (EU)	1972-1993	510 (23)	DR	0	NS	NSvol NSmorph
Zheng et coll., 1997 Danemark	1968-1992	8 608 (344)	INF	2	↓ ^d	NSvol ↓morph
Itoh et coll., 2001 Sapporo (Japon) ^f	1975-1998	711 (30)	SFI++ et pères	0	NS	NSvol
Années 1980						
De Mouzon et coll., 1996 France ^g	1989-1994	7 714 (482)	PFOT	0	↓	ND
Irvine et coll., 1996 Edimbourg (RU)	1984-1995	577 (48)	DR, pères et SFI	0	↓ ^d	ND
Berling et Wolner- Hanssen, 1997 Suède sud	1985-1995	718 (65)	INF	1	↑	↓vol ↑mob ↑morph
Benshushan et coll., 1997 Jérusalem (Israël)	1980-1995	188 (12)	CDSNS, SFI	0	NS	↑vol ↓mob
Handelsman 1997 Sydney (Australie)	1980-1995	509 (32)	CDSNS, pères	0	NS	ND
Younglai et coll., 1998 Canada ^h	1984-1996	48 968 (3 766)	INF	0	↓	ND
Seo et coll., 2000 Corée	1989-1998	22 249 (2 225)	INF	0	NS	NSvol NSmob
Années 1990						
Rasmussen et coll., 1997 Odense (Danemark)	1990-1996	1 055 (151)	PFOT	0	NS	NSvol
Almagor et coll., 2003 Jérusalem (Israël)	1990-2000	2 638 (240)	INF	0	↓	↓mob

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence ^a	Concentration spermatozoïdes ^b	Autres caractéristiques ^c
Sripada et coll., 2007 Écosse nord (RU)	1994-2005	4 832 (403)	INF ⁱ	2	↓	NSmob
Feki et coll., 2009 Sfax (Tunisie)	1996-2007	2 940 (245)	INF	2	↓	NS mob ↓ morph

CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; SFI : statut de fertilité inconnu ; INF : infécond ; DR : Donneur de sperme pour la recherche ; PREV : pré-vasectomie ; PFOT : partenaires de femmes avec obstruction tubaire.
^a 0 : aucun ajustement, 1 : ajustement sur âge ou délai d'abstinence, 2 : ajustement sur âge et délai d'abstinence ; ^b ↓ diminution significative, ↑ augmentation significative, NS pas de différence significative ; ^c vol : volume de l'éjaculat, mob : % de spermatozoïdes progressifs, morph : % de spermatozoïdes morphologiquement normaux ; ^d baisse avec année naissance plus récente ; ^e Nombre total de spermatozoïdes mesuré dans 3 laboratoires différents à Athènes ; ^f Comparaisons de deux périodes 1975-80 vs 1998 ; ^g Résultats de 77 centres ; ^h Résultats de 11 centres d'exploration des infertilités du couple ; ⁱ sélection des hommes ayant plus de 20 millions/ml spermatozoïdes ; ^j Nombre total de spermatozoïdes par éjaculat

Différences géographiques

La confrontation des résultats des études portant sur les variations séculaires de la qualité du sperme indique des variations notables de la qualité moyenne du sperme humain d'une région du monde à l'autre dans des sous-populations grossièrement comparables (Carlsen et coll., 1992 ; Swan et coll., 1997). Ces différences ont fait émerger le postulat qu'indépendamment de facteurs génétiques ou ethniques, ces variations pouvaient aussi être liées à des facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques de type transversal ont été menées afin de rechercher s'il existe des variations géographiques de la production des spermatozoïdes et de la qualité du sperme en relation avec un certain nombre de facteurs relatifs aux antécédents, au style de vie, à l'environnement général ou professionnel des hommes. La première recherche programmée de manière spécifique sur le sujet a été financée par l'Union Européenne. Elle a été menée dans 4 villes européennes : Turku (Finlande), Copenhague, Edimbourg et Paris. Les hommes recrutés étaient tous partenaires de femmes enceintes (donc ayant en principe fait récemment la preuve de leur fertilité). Les méthodes d'analyse de sperme utilisées dans les 4 centres étaient standardisées et ont fait l'objet d'un contrôle de qualité. Les principaux facteurs susceptibles de biaiser les résultats comme l'âge ou le délai d'abstinence sexuelle précédant l'examen, ont pu être pris en compte dans l'analyse. Cette étude a mis en évidence des différences importantes de la quantité des spermatozoïdes ; elle était la plus faible à Copenhague et la plus élevée à Turku (Jorgensen et coll., 2001). En procédant à une analyse détaillée ville par ville, il a été trouvé que par rapport à Turku le nombre de spermatozoïdes était significativement plus bas dans les trois autres villes ; en revanche, la mobilité des spermatozoïdes était plus faible à Paris que dans les autres villes. Depuis, plusieurs études fondées sur une méthodologie similaire ont été publiées (tableau 2.II). La majorité d'entre elles indique des différences géographiques de la production et de la qualité spermatique d'une part

avec des niveaux de productions spermatiques assez faibles lorsqu'il s'agit des sujets étudiés les plus jeunes, notamment au Danemark. Pour l'essentiel ces études en dépit de questionnaires très détaillés ne rapportent pas d'associations avérées avec des facteurs de l'environnement.

Tableau 2.II : Principales études sur les variations géographiques de la production et/ou de la qualité spermatique publiées depuis 1995 : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats

Étude Lieux	Période	Type d'étude	Type de population	Prise en compte de covariables âge, délai d'abstinence	Différences
Auger et Jouannet, 1997 France Lille/Rennes/Caen/Paris/ Bordeaux/Grenoble/ Toulouse	1973-1992	Rétrospective	CDSNS, pères N=	oui	≠vol ≠conc ≠mob (morphND)
Fisch et coll., 1996 États-Unis Californie/Minnesota / New York	1972-1994	Rétrospective	CDSNS, PREV, SFI N=400	non	≠conc
Jorgensen et coll., 2001 Europe Edimbourg/Turku/ Copenhague/ Paris	1977-1992	Transversale	PFE ^a N=1 082	oui	ND
Iwamoto et coll., 2006 Japon (Kawasaki/ Yokohama vs Europe (étude précédente)	1998	Transversale	PFE N=324	oui	≠conc ≠ntot ≠mob ≠morph
Swan et coll., 2003 États-Unis	1999-2001	Transversale	PFE N=512	oui	
Jorgensen et coll., 2002 Danemark/Norvège/ Finlande/Estonie	1997-2000	Transversale	C ^b , HPG N=968	oui	≠conc ≠ntot (gradient est-ouest)
Punab et coll., 2002 Lituanie/Estonie vs étude précédente	1997-1999	Transversale	C+HPG N=393	oui	≠conc ≠ntot conc et ntot > valeurs dans l'étude précédente
Tsarev et coll., 2005 Lettonie vs études précédentes	2004	Transversale	C N=133	non	=conc études précédentes sauf vs Danemark

Étude Lieux	Période	Type d'étude	Type de population	Prise en compte de covariables âge, délai d'abstinence	Différences
Dhooge et coll., 2007 Flandres Anvers (ville) Peer (campagne)	1970-1990	Transversale	HPG ^c , SFV ^d N=100	non	=vol =conc ≠ntot ≠morph
Paasch et coll., 2008 Allemagne Hambourg/Liepzig	2003-2005	Transversale	C? SFI N=811	non	=conc ≠mob ≠morph

^a PFE : volontaires, partenaires de femme enceinte ; ^b C : Conscrits ; ^c HPG : hommes volontaires de la population générale 20-40 ans tirés au sort contactés par courrier ; ^d SFV : statut de fertilité variable ; SFI : statut de fertilité inconnu
CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; PREV : pré-vasectomie ; vol : volume de l'éjaculat ; conc : concentration du sperme ; mob : % de spermatozoïdes progressifs ; morph : % de spermatozoïdes morphologiquement normaux ; ntot : nombre total de spermatozoïdes

Limites des études rétrospectives et transversales portant sur la qualité du sperme

Les tableaux précédents montrent bien la diversité des populations d'hommes étudiés, ainsi que la variabilité dans les choix méthodologiques ou encore la taille des échantillons. Quelles que soient les populations étudiées, il existe de possibles biais de sélection. Par exemple, il peut s'agir de la modification du recrutement du à la mise en place de nouvelles pratiques d'AMP (assistance médicale à la procréation), telle que l'ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*), dans les laboratoires analysant le sperme d'hommes inféconds ou bien, existence d'antécédents génito-urinaires chez des hommes féconds les incitant à être volontaires pour participer à des études sur le sperme (Eustache et coll., 2004 ; Muller et coll., 2004). Il est à noter que dans ce dernier cas les taux de participation sur le nombre d'hommes informés est faible, entre 15 et 40 % au mieux, selon les études. Dans bien des cas, les sujets sont auto-sélectionnés et on ne dispose pas de l'estimation du taux de participation.

D'autre part, il faut souligner que les données portant sur le sperme et provenant de laboratoires différents ne peuvent être considérées ni comme des données exactes ni comme des données strictement comparables. En effet, l'analyse du sperme correspond à un ensemble de procédures de laboratoire complexes dont la plupart repose sur l'évaluation microscopique dépendant de la compétence des équipes. Les formations initiales et continues des professionnels ont un rôle capital tout comme le degré d'expérience pour la qualité des résultats produits (Auger et coll., 2000 ; Eustache et Auger, 2003). De plus, du fait du caractère manuel de la plupart des procédures au laboratoire de

biologie de la reproduction, le contrôle de qualité (CQ) des analyses biologiques est encore plus indispensable que pour les autres actes de biologie médicale essentiellement effectués à l'aide d'automates. Enfin, les conclusions d'une analyse doivent absolument tenir compte de l'erreur de mesure. En effet les valeurs produites de concentration (en millions/ml), mobilité ou morphologie typique se fondent sur une évaluation d'un nombre limité de spermatozoïdes (de l'ordre d'une ou plusieurs centaines quand cela est possible). En raison de ce petit nombre et également de l'hétérogénéité du sperme, le postulat que le petit échantillon de spermatozoïdes à partir desquels ces caractéristiques ont été évaluées est représentatif de l'ensemble de l'échantillon ne peut s'appliquer : en fonction du nombre de spermatozoïdes évalués il y a une erreur de comptage plus ou moins importante et une incertitude plus ou moins grande autour de la valeur fournie.

Il existe d'autres facteurs de variation, facteurs peu contrôlables lorsqu'ils sont liés à la situation dans laquelle les éjaculats sont produits. Pour des conditions données de recueil, des facteurs tels que l'âge, le délai d'abstinence sexuel, sont des covariables contrôlables qui devraient systématiquement être collectées et prises en compte dans les analyses statistiques ce qui n'a pas été le cas pour un certain nombre d'études publiées (voir tableaux 2.I et 2.II).

Qu'est-ce qui pourrait expliquer une détérioration temporelle des caractéristiques spermatiques ?

Dans une lettre au journal *Epidemiology*, Czeizel et Rothman (2002) avaient suggéré qu'une telle diminution de la pression de sélection envers les couples peu fertiles était plausible, du fait de la diminution de la taille de la descendance souhaitée par les couples au cours du 20^e siècle ; la diminution de la taille des familles (fécondité) des couples fertiles pourrait entraîner une baisse du nombre total de nouveau-nés et donc, mécaniquement, une augmentation de la proportion d'enfants nés de couples peu fertiles dans la population. Si on suppose que l'hypofertilité a une composante héréditaire forte, cette augmentation de la proportion d'enfants nés de couples peu fertiles entraînerait une augmentation de la proportion de sujets ayant eux-mêmes des troubles de la fertilité (Czeizel et Rothman, 2002). Il a été montré, à partir des données de fécondité française, que cette hypothèse n'était pas compatible avec les données sur l'évolution de la fécondité (descendance finale) en France au cours du 20^e siècle, et que l'évolution de la pression de sélection sur les couples peu fertiles ne pouvait expliquer qu'une très faible part de la diminution de la concentration spermatique décrite dans la seconde moitié du 20^e siècle (Slama et Leridon, 2002).

De nombreuses études épidémiologiques se sont attachées à mettre en évidence l'impact de facteurs environnementaux sur la concentration spermatique, avec parfois comme objectif affiché d'identifier celui susceptible d'expliquer une diminution de la médiane de la concentration spermatique d'environ 50 % en 50 ans.

Les résultats les plus probants concernent notamment des expositions professionnelles (Jensen, et coll., 2006), et notamment l'exposition professionnelle au pesticide DBCP (dibromochloropropane), à des doses probablement élevées, dans les années 1970, qui s'est révélée susceptible d'accroître fortement le risque d'azoospermie (Whorton, et coll., 1977 ; Whorton et Foliart, 1988), l'exposition professionnelle au plomb inorganique (Bonde, et coll., 2002), à la chaleur, aux rayonnements ionisants ou à d'autres composés chimiques comme les éthers de glycol, le dibromure d'éthylène (autrefois utilisé comme additif dans l'essence et comme pesticide), le disulfide de carbone ou certains pesticides (Perry, 2008). En population générale, beaucoup de facteurs sont suspectés mais peu de facteurs ont été clairement identifiés ; le surpoids (Jensen, et coll., 2004), qui peut avoir en partie une origine environnementale (Karmaus et coll., 2009), et aussi l'exposition au tabac durant la vie intra-utérine. Cette exposition a été associée à une diminution d'environ 20 % de la concentration spermatique à l'âge adulte, par rapport à des hommes dont la mère ne fumait pas lorsqu'elle était enceinte (Jensen et coll., 2005, Ramlau-Hansen et coll., 2007). Plus récemment, une étude chez des fœtus a mis en évidence une diminution du nombre de cellules germinales et somatiques dans le testicule lorsque la mère fumait (Mamsen et coll., 2010).

Un calcul simple (Slama, non publié) peut permettre de considérer ces résultats dans la perspective de la détérioration temporelle de la concentration spermatique. Plaçons-nous dans le cas d'un facteur environnemental apparu au cours du 20^e siècle, auquel aucune femme n'était exposée en 1920 et auquel 40 % des femmes enceintes étaient exposées en 1970 ; supposons de plus que l'exposition intra-utérine à ce facteur entraîne systématiquement une diminution de 20 % de la concentration spermatique, que la concentration spermatique des hommes âgés de 30 ans en 1950 était de 100 millions/ml. Ces hypothèses sont proches des connaissances actuelles sur l'effet de l'exposition intra-utérine au tabac. Supposons enfin que la prévalence d'aucun autre facteur influençant la concentration spermatique ne varie au cours du 20^e siècle. On peut alors estimer que la concentration spermatique moyenne des hommes âgés de 30 ans en 2000 serait de 92 millions/ml (tableau 2.III). Ceci correspond à une diminution de 8 % de la concentration spermatique moyenne en 50 ans.

Tableau 2.III : Exemple hypothétique de la variation de la concentration spermatique moyenne entre 1950 et 2000 chez les hommes de 30 ans (nés en 1920 et 1970) du fait de l'augmentation de la prévalence d'un facteur environnemental chez les femmes enceintes

Année	Prévalence de l'exposition ^a (%)	Concentration spermatique (millions/ml)		
		Non exposés	Exposés	Ensemble
1920	0	100	80	$100 \times 1 + 0 \times 80 = 100$
1970	40	100	80	$100 \times 0,6 + 80 \times 0,4 = 92$

^a Fréquence de l'exposition chez les femmes enceintes l'année considérée. Le facteur est supposé diminuer de 20 % la concentration spermatique chez tous les hommes exposés *in utero* (Slama, communication personnelle)

Cet exemple fait apparaître qu'un facteur ayant une influence conséquente sur la concentration spermatique au niveau individuel (-20%) et dont la prévalence aurait fortement augmenté durant 50 ans ($+40\%$) ne pourrait entraîner qu'une relativement faible diminution de la concentration spermatique. Il faut donc supposer l'existence d'un nombre important de facteurs dont la prévalence aurait fortement augmenté sur la même période pour attendre une diminution de la concentration spermatique de l'ordre de grandeur de 50% . Ceci illustre d'une part qu'à moins de supposer l'existence d'un facteur ayant un impact majeur au niveau individuel (par exemple une oligozoospermie quasi-systématique) et dont la prévalence aurait considérablement augmenté au cours des dernières décennies, c'est plutôt un ensemble de facteurs ayant chacun un impact limité au niveau individuel et agissant simultanément, voire en synergie, qui pourrait expliquer une diminution conséquente de la concentration spermatique au sein de la population. D'autre part, cet exemple incite à adopter une approche réellement multifactorielle en épidémiologie, c'est-à-dire qui ne se contenterait pas de prendre en compte des facteurs de risque connus de l'événement étudié comme facteurs d'ajustement, mais qui viserait à estimer l'effet simultané d'un ensemble de facteurs environnementaux. La toxicologie est en train de prendre un tel virage (Kortenkamp, 2007 et 2008 ; Kortenkamp et coll., 2007) ; pour l'épidémiologie, les défis posés par une telle approche concernent bien sûr en premier lieu l'estimation des expositions, mais aussi l'augmentation considérable de la taille de la population étudiée qu'une caractérisation précise de l'effet du mélange impliquerait probablement.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMOPOULOS D, PAPPA A, NICOPOULOU S, ANDREOU E, KARAMERTZANIS M, MICHOPOULOS J, et coll. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod* 1996, **11** : 1936-1941

ALMAGOR M, IVNITZKI I, YAFFE H, BARAS M. Changes in semen quality in Jerusalem between 1990 and 2000: a cross-sectional and longitudinal study. *Arch Androl* 2003, **49** : 139-144

ANDOLZ P, BIELSA MA, VILA J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999, **14** : 731-735

AUGER J, JOUANNET P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Fédération Française des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. *Hum Reprod* 1997, **12** : 740-745

AUGER J, KUNSTMANN JM, CZYGLIK F, JOUANNET P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995, **332** : 281-285

AUGER J, EUSTACHE F, DUCOT B, BLANDIN T, DAUDIN M, DIAZ I, et coll. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality

assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000, **15** : 2360-2368

BENSHUSHAN A, SHOSHANI O, PALTIEL O, SCHENKER JG, LEWIN A. Is there really a decrease in sperm parameters among healthy young men? A survey of sperm donations during 15 years. *J Assist Reprod Genet* 1997, **14** : 347-353

BERLING S, WÖLNER-HANSEN P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod* 1997, **12** : 1002-1005

BONDE JP, JOFFE M, APOSTOLI P, DALE A, KISS P, et coll. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002, **59** : 234-234

BUJAN L, MANSAT A, PONTONNIER F, MIEUSSET R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* 1996, **312** : 471-472

CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992, **305** : 609-613

CZEIZEL A, ROTHMAN KJ. Does relaxed reproductive selection explain the decline in male reproductive health? A new hypothesis. *Epidemiology* 2002, **13** : 113-114

DE MOUZON J, THONNEAU P, SPIRA A, MULTIGNER L. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *BMJ* 1996, **313** : 43

DHOOGHE W, VAN LAREBEKE N, COMHAIRE F, KAUFMAN JM. Regional variations in semen quality of community-dwelling young men from Flanders are not paralleled by hormonal indices of testicular function. *J Androl* 2007, **28** : 435-443

EUSTACHE F, AUGER J. Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1018-1022

EUSTACHE F, AUGER J, CABROL D, JOUANNET P. Are volunteers delivering semen samples in fertility studies a biased population? *Hum Reprod* 2004, **19** : 2831-2837

FEKINCABID N, REBAI A, SELLAMI A, AYED BB, GUERMAZI M, et coll. Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the South of Tunisia. *J Androl* 2009, **30** : 541-547

FISCH H, GOLUBOFF ET. Geographic variations in sperm counts: a potential bias in studies on semen quality. *Fertil Steril* 1996, **65** : 1044-1046

FISCH H, GOLUBOFF ET, OLSON JH, FELDISHUH J, BRODER SJ, BARAD DH. Semen analysis in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 2000, **65** : 1009-1014

GYLLENBORG J, SKAKKEBAEKNENIENSENNCKEIDING N, GIWERCMAN A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Int J Androl* 1999, **22** : 28-36

HANDELSMAN DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. *Hum Reprod* 1997, **12** : 2701-2705

IRVINE S, CAWOOD E, RICHARDSON D, MACDONALD E, AITKEN J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study of 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996, **312** : 467-470

ITOH N, KAYAMA F, TATSUKI TJ, TSUKAMOTO T. Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy, young Japanese men? Results from the Sapporo area. *J Androl* 2001, **22** : 40-44

IWAMOTO T, NOZAWA S, YOSHIKE M, HOSHINO T, BABA K, MATSUSHITA T, et coll. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* 2006, **21** : 760-765

JENSEN TK, ANDERSSON AM, JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, CARLSEN E, et coll. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004, **82** : 863-870

JENSEN MS, MABECK LM, TOFT G, THULSTRUP AM, BONDE JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005, **20** : 2559-2566

JENSEN TK, BONDE JP, JOFFE M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med (Lond)* 2006, **56** : 544-553

JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, EUSTACHE F, et coll. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001, **16** : 1012-1019

JØRGENSEN N, CARLSEN E, NERMOEN I, et coll. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002, **17** : 2199-2208

JOUANNET P, WANG C, EUSTACHE F, KOLD-JENSEN T, AUGER J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 2001, **109** : 333-344

KARMAUS W, OSUCH JR, ENELI I, MUDD LM, ZHANG J, et coll. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup Environ Med* 2009, **66** : 143-149

KORTENKAMP A, FAUST M, SCHOLZE M, BACKHAUS T. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 2007, **115** (suppl 1) : 106-114

KORTENKAMP A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl* 2008, **31** : 233-240

KORTENKAMP A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 2007, **115** (suppl 1) : 98-105

LACKNER J, SCHATZL G, WALDHÖR T, RESCH K, KRATZIK C, MARBERGER M. Constant decline in sperm concentration in infertile males in an urban population: experience over 18 years. *Fertil Steril* 2005, **84** : 1657-1661

MAMSEN LS, LUTTERODT MC, ANDERSEN EW, SKOUBY SO, SØRENSEN KP, et coll. Cigarette smoking during early pregnancy reduces the number of embryonic germ and somatic cells. *Hum Reprod* 2010, **25** : 2755-2761

MENCHINI-FABRIS F, ROSSI P, PALEGO P, SIMI S, TURCHI P. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. *Andrologia* 1996, **28** : 304

MULLER A, DE LA ROCHEBROCHARD E, LABBÉ-DECLÈVES C, JOUANNET P, BUJAN L, et coll. A Selection bias in semen studies due to self-selection of volunteers. *Hum Reprod* 2004, **19** : 2838-2844

NELSON CM, BUNGE RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril* 1974, **25** : 503-507

NIESCHLAG E, LERCHL A. Declining sperm counts in European men--fact or fiction? *Andrologia* 1996, **28** : 305-306

PAASCH U, SALZBRUNN A, GLANDER HJ, PLAMBECK K, SALZBRUNN H, et coll. Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. *Int J Androl* 2008, **31** : 93-102

PAULSEN-CABERMAN NG, WANG C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril* 1996, **65** : 1015-1020

PERRY MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008, **14** : 233-242

PUNAB M, ZILAITIENE B, JØRGENSEN N, HORTE A, MATULEVICIUS V, PEETSALU A, SKAK-KEBAEK NE. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl* 2002, **25** : 243-252

RAMLAU-HANSEN CH, THULSTRUP AM, STORGAARD L, TOFT G, OLSEN J, BONDE JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007, **165** : 1372-1379

RASMUSSEN PE, ERB K, WESTERGAARD LG, LAURSEN SB. No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1,055 Danish men born between 1950 and 1970. *Fertil Steril* 1997, **68** : 1059-1064

SEO JT, RHA KH, PARK YS, LEE MS. Semen quality over a 10-year period in 22,249 men in Korea. *Int J Androl* 2000, **23** : 194-198

SLAMA R, LERIDON H. How much of the decline in sperm counts can be explained by relaxed reproductive selection? *Epidemiology* 2002, **13** : 613-615

SRIPADA S, FONSECA S, LEE A, HARRILD K, GIANNARIS D, et coll. Trends in semen parameters in the northeast of Scotland. *J Androl* 2007, **28** : 313-319

SWAN SH, BRAZIL C, DROBNIS EZ, LIU F, KRUSE RL, HATCH M, et coll. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 414-420

SWAN SH, ELKIN EP, FENSTER L. Have sperm densities declined? A re-nalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 1997, **105** : 1228-1232

TSAREV I, GAGONIN V, GIWERCMAN A, ERENPREISS J. Sperm concentration in Latvian military conscripts as compared with other countries in the Nordic-Baltic area. *Int J Androl* 2005, **28** : 208-214

VAN WAELEGHEM K, DE CLERCQ N, VERMEULEN L, SCHOONJANS F, COMHAIRE F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum Reprod* 1996, **11** : 325-329

VIERULA M, NIEMI M, KEISKI A, SAARANEN M, SAARIKOSKI S, SUOMINEN J. High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int J Androl* 1996, **19** : 11-17

WHORTON D, FOLIART D. DBCP: eleven years later. *Reprod Toxicol* 1988, **2** : 155-161

WHORTON D, KRAUSS RM, MARSHALL S, MILBY TH. Infertility in male pesticide workers. *Lancet* 1977, **2** : 1259-1261

YOUNGLAI EV, COLLINS JA, FOSTER WG. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. *Fertil Steril* 1998, **70** : 76-80

ZHENG Y, BONDE JP, ERNST E, MORTENSEN JT, EGENSE J. Is semen quality related to the year of birth among Danish infertility clients? *Int J Epidemiol* 1997, **6** : 1289-1297

ZORN B, VIRANT-KLUN I, VERDENIK I, MEDEN-VRTOVEC H. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Int J Androl* 1999, **22** : 178-183