



HAL
open science

Impact de l'aluminium sur la fertilité masculine

Mohamed Ghazi

► **To cite this version:**

Mohamed Ghazi. Impact de l'aluminium sur la fertilité masculine. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2023. Français. NNT : 2023STET0054 . tel-04523033

HAL Id: tel-04523033

<https://theses.hal.science/tel-04523033>

Submitted on 27 Mar 2024

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

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



N° d'ordre NNT : 2023STET054

**THÈSE de DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ JEAN MONNET SAINT-ÉTIENNE**

Membre de l'Université de LYON

**École Doctorale N° 488
(Sciences Ingénierie et Santé)**

Spécialité / discipline de doctorat : Biologie et Physiologie

Soutenue publiquement le 12/12/2023, par :
Mohamed Ghazi

Impact de l'aluminium sur la fertilité masculine

Devant le jury composé de :

Pr Celia Ravel
Pr Rosalie Cabry
Pr Michele Cottier
Dr Jean-philippe Klein
Pr Thomas Bourlet
Pr Olivier Tillement

Rapporteure
Rapporteure
Directrice de Thèse
Co-directeur de Thèse
Examinateur
Examinateur

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ

Lis, avec le nom de ton Seigneur qui a créé.

خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ

Qui a créé l'homme d'Alak. (d'embryon)

اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ

Lis, et ton Seigneur est infiniment Noble.

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ

Qui a enseigné par la plume.

عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ

Il a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas.

Le coran, premiers versets de la première sourate.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Pr Michèle Cottier d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu et accompagné mon évolution au sein de votre service malgré toutes les tâches qui vous incombent. Je tiens également à remercier le co-encadrant de ce travail, mon collègue, et mentor en recherche, Jean-Philippe Klein. Le parcours de thèse de sciences, je peux en témoigner, n'est jamais un long fleuve tranquille et sans ton aide, tes conseils, et tes interventions jamais ce travail n'aurait pu aboutir.

Un grand merci au Pr Thomas Bourlet pour tout ce que tu as fait pour moi. Nous voici à nouveau réunis grâce à ce projet ! C'est un honneur pour moi de te compter parmi le jury de ma thèse.

Je voudrais également remercier l'ensemble de l'équipe notre centre d'AMP et particulièrement les membres du laboratoire de BDR, ma deuxième famille. Je remercie tout particulièrement Lionel Mery, le responsable de notre centre. Ainsi qu'Isabelle Aknin pour ta patience à supporter nos caractères. Merci à nos chères techniciennes qui ont participé à ce projet : Marie-Pierre, Sabrina, Marlène et Lauren, et celles qui ont rejoint notre équipe : Celine et Axelle. Merci également à nos secrétaires : Joëlle et Eminé ainsi qu'à Chantal et Malika. Vous avez contribué activement à ce travail, et s'il voit le jour, c'est grâce à votre patience et votre soutien. Votre présence tout au long de ces années de travail ensemble m'a énormément aidé.

Madame Odile Sabido, et le Dr Inès Harzallah. Merci pour votre aide, vous avez beaucoup contribué pour mettre ce projet sur les bons rails.

Je remercie également le Dr Carole Pélissier pour l'expertise et l'aide précieuse qui donnent plus de valeur à ce travail.

Je remercie tous les membres de l'équipe du SAINBIOSE, pour leur aide en particulier le Pr Xavier Delavenne, Madame Valérie Bin, et le reste des membres de cette belle équipe qui m'ont accordé leur temps et leurs conseils.

Je remercie le Dr Raphaëlle Escoube pour cette collaboration fructueuse, et Monsieur Philippe Telouk, pour votre gentillesse et votre disponibilité. Merci à toutes les techniciennes du Laboratoire de Géologie de Lyon pour votre aide.

Un grand merci à l'équipe de la DRCI – URC du CHU de Saint-Etienne, en particulier Madame Carine Labruyere pour tout le soutien logistique, et Madame Émilie Presles qui a accepté de nous faire les statistiques et les corrections malgré les contraintes du timing.

Je remercie le jury de l'AOL SPALU d'avoir cru en notre projet et financé ces travaux.

Je remercie enfin le Pr Olivier Tillement ainsi que les membres du Jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail, particulièrement le Pr Celia Ravel et le Pr Rosalie Cabry qui en sont les rapporteurs.

Enfin j'adresse un immense merci à Sanae, la femme de ma vie ! Grâce à ta présence, ton soutien, et ton aide, tout devient facile et faisable. Je t'aime ! A mes parents, dans votre regard je vois cette fierté qui m'a toujours donné la force et l'envie d'avancer. Aux pupilles de mes yeux Alae et Aya, je vous aime du fond de mon cœur ! A Soumia, Hanane et Redwane et leurs enfants ainsi qu'à toute ma famille. Merci pour tout votre amour et votre bonne humeur.

Sommaire

SOMMAIRE	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
TABLE DES TABLEAUX	8
GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS	9
I. INTRODUCTION	11
II. ÉTAT DES LIEUX : SE DIRIGE-T-ON VERS UN BABY CRASH ?	13
III. ALUMINIUM : LE METAL LE PLUS ABONDANT SUR TERRE	26
IV. ALUMINIUM ET APPAREIL REPRODUCTEUR	43
ABSTRACT	44
KEYWORDS	44
INTRODUCTION	45
MATERIAL AND METHODS	45
STUDIES IDENTIFICATION	45
INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA	46
QUALITY AND BIAS ASSESSMENT	46
RESULTS	46
ELIGIBLE STUDIES FOLLOWING LITERATURE RESEARCH	46
EXCLUSION CRITERION: "ANTIDOTE" STUDIES	48
EXCLUSION CRITERION: UNTRUSTWORTHY STUDIES	49
MATURE SPERM MODEL STUDIES (EX VIVO STUDIES)	52
ANIMAL MODEL STUDIES (IN VIVO STUDIES)	52
EPIDEMIOLOGICAL STUDIES	60
DISCUSSION	62
AUTHOR CONTRIBUTIONS	64
ACKNOWLEDGEMENTS	64
V. PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR	65
ABSTRACT	72
INTRODUCTION	73
MATERIAL AND METHODS	75
POPULATION	75
ETHICAL APPROVAL	75
ALUMINUM EXPOSURE QUESTIONNAIRE	75
SAMPLES COLLECTION	76
ALUMINUM DOSAGE	77
DNA FRAGMENTATION:	77
STATISTICAL ANALYSIS	78
RESULTS	79
POPULATION DESCRIPTION	79
DNA FRAGMENTATION STABILITY	80
CORRELATION BETWEEN SEMEN ALUMINUM LEVEL AND SPERM DNA FRAGMENTATION	81
IMPACT OF ALUMINUM EXPOSURE ON SEMEN ALUMINUM LEVEL	83
IMPACT OF SEMEN ALUMINUM LEVEL ON INTRA-UTERINE INSEMINATION SUCCESS RATE	83
DISCUSSION	84
VI. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	88
SYNTHESE DES RESULTATS ET DE LA LITTERATURE	88
LIMITES DE NOS TRAVAUX	89

QUID DE L'INTEGRITE SCIENTIFIQUE ?	91
ALUMINIUM : UN TOXIQUE DIRECT DU SYSTEME REPRODUCTEUR	92
EXISTE-T-IL DES ALTERNATIVES A L'ALUMINIUM ?	95
PERSPECTIVES ET CONCLUSION :	96
<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	98
<i>RESUME</i>	116
<i>ABSTRACT</i>	116

Table des illustrations

Figure 1 : Nombre de naissances vivantes en UE. Source : Eurostat 2021.....	14
Figure 2: Indice synthétique de fécondité, en UE, Japan, et aux Etats-Unis, de 1960 à 2013.....	15
Figure 3 : Modèle de méta-régression pour le nombre moyen de spermatozoïdes en fonction du statut de fécondité et des groupes géographiques ³⁶	19
Figure 4 : Modèles de méta-régression pour la concentration moyenne de spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes par année de collecte.....	20
Figure 5 : Pourcentage annuel du déclin selon les périodes, pour la concentration moyenne de spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes chez les hommes non sélectionnés à l'aide d'un modèle de méta-régression stratifié.....	20
Figure 6 : Évolution de la proportion d'enfants conçus par assistance médicale à la procréation en France.....	24
Figure 7 : La « ceinture de Nanjing ».....	27
Figure 8 : Objets en aluminium (éventuellement associé à d'autres métaux) des collections des Musées Nationaux.....	29
Figure 9 : Pays comptant les plus grandes réserves de bauxite dans le monde en 2022.....	30
Figure 10 : utilisations finales de l'aluminium par secteur en 2017	32
Figure 11: La chaîne de valeur de l'aluminium.....	33
Figure 12 : Ce diagramme à barres à bandes illustre la production mondiale d'aluminium de première fusion en milliers de tonnes de 2012 à 2021	31
Figure 13 : questionnaire d'évaluation de l'exposition à l'aluminium	38
Figure 14 : L'aluminium possède des propriétés mutagènes, pro-inflammatoires, immunogènes, excitotoxiques	41
Figure 15 : The PRISMA diagram details the search and selection process applied during the review.	47
Figure 16 : Schéma de la spermiogenèse. Une spermatide ronde sera transformée en un spermatozoïde élané à la fin du processus.....	65
Figure 17 : Variation in sperm DNA fragmentation rate as a function of storage time after fixation in 3 patients with different levels of sperm DNA fragmentation.....	81
Figure 18 : Correlation between semen aluminum level and sperm DNA fragmentation.....	82
Figure 19: A Box plots of the quantity of aluminum in whole semen according to occupational exposure and patient habits	83

Table des tableaux

Table 1 : Results of the REAPPRAISED test described by Gray et al. for the 13 studied for which a doubt about their honesty was present.	50
Table 2: Population description.	80
Table 3: Usual causes of a sperm DNA fragmentation elevation for the five patients with the highest level of aluminum in sperm.	82
Table 4: Comparison of semen mean aluminum content in available literature.	86

Glossaire des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Assistance médicale à la procréation

Al : Aluminium

AOL : Appel d'offres local

CHU : Centre hospitalo-universitaire

DFI : *DNA Fragmentation Index*

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

ENS : École Normale Supérieure

FCS : Fausse couche spontanée

FDA : *Food and drugs association*

FIV : Fécondation *in vitro*

HCl : Acide chlorhydrique

IAC : Insémination artificielle avec sperme de conjoint

IAD : Insémination artificielle avec sperme de donneur

ICSI : Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde

IUI : Insémination intra-utérine

INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques

IO : Induction de l'ovulation

IPCS : *International Programme on Chemical Safety*

ISF : Indice synthétique de fécondité

IVG : Interruption volontaire de grossesse

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PE : Perturbateurs endocriniens.

PET : Polyéthylène téréphtalate

PHRC : Programme hospitalier de recherche clinique

ROS : *Reactive oxygen species*

UE : Union Européenne

I. Introduction

Ce travail a été effectué dans le cadre du Laboratoire SANTé INgénérie BIOlogie St-Etienne (SAINBIOSE). Cette équipe de recherche, fruit du rapprochement entre des laboratoires de l'université Jean Monnet et de l'école des Mines de Saint-Étienne, labellisée INSERM fin 2015, est issue du rapprochement de 4 laboratoires :

- Le laboratoire interdisciplinaire d'études des nanoparticules aérosolisées (LINA)
- Le laboratoire de biologie des tissus ostéoarticulaires (LBTO)
- Le groupe de recherche sur la thrombose de l'université Jean Monnet
- L'équipe bioingénierie fonctionnelle (LGF, unité mixte CNRS – Mines Saint-Étienne)

Dans les travaux qui vont vous être présentés, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine. Ce travail fait suite à une étude préliminaire sur 62 patients publiée dans la revue *Reproductive Toxicology*, en partenariat avec le Pr Exley de l'université de Keele en Grande Bretagne, dans laquelle notre équipe a montré l'existence d'un lien entre la quantité d'aluminium dans le sperme et la présence d'une oligozoospermie chez l'homme. Lors de cette étude il a également été montré que l'aluminium pouvait s'accumuler dans la tête des spermatozoïdes. Nous souhaiterions étudier l'impact potentiel de cet aluminium sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Ce document est divisé en deux parties distinctes : une partie bibliographique qui vise à remettre le travail effectué dans son contexte scientifique, et une partie expérimentale. La partie bibliographique est elle-même divisée en quatre chapitres :

- Le premier chapitre s'intéresse à la fertilité, et à l'assistance médicale à la procréation, et dresse un portrait de l'évolution de la fertilité masculine en Europe et dans le monde.
- Le deuxième chapitre reprend des notions de base concernant l'aluminium, sa physico-chimie, les voies d'exposition à l'aluminium chez l'Homme, et ses effets rapportés sur la santé humaine.
- Le troisième chapitre fait une revue de la littérature la plus complète et détaillée possible sur l'aluminium et son impact potentiel sur la fonction de reproduction masculine.

- Le quatrième chapitre expose quelques prérequis concernant la reproduction humaine et la physiologie de la spermatogenèse, indispensables à une bonne compréhension du travail.

La partie expérimentale reprend l'étude réalisée au sein de notre centre d'Assistance Médicale à la Procréation ayant comme objectifs :

- Objectif principal :
 - Évaluer l'impact de l'aluminium sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes à travers une analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique chez des patients pris en charge en insémination artificielle avec sperme du conjoint.
- Objectifs secondaires :
 - Définir l'impact des différentes sources potentielles d'exposition à l'aluminium sur la quantité d'aluminium dans le sperme total.
 - Évaluer la répartition de l'aluminium entre le plasma séminal et les spermatozoïdes.

L'ensemble du travail est enfin discuté dans une dernière partie et les différentes voies de recherche envisagées pour le poursuivre y sont évoquées.

II. *État des lieux : Se dirige-t-on vers un baby crash ?*

L'actualité de la rentrée 2023 a été dominée, entre-autres, par la coupe du monde du Rugby, la visite du Pape à Marseille, et la question de l'uniforme à l'école. Mais au milieu de ces évènements, un autre sujet a pris place dans les journaux et la presse en ligne, il s'agit de la baisse du taux de natalité en France.

Parmi les titres que nous avons pu lire nous pouvons citer :

- TF1 : « La natalité affiche une baisse record en France »,
- BFMTV : « Le nombre de naissances à un niveau historiquement bas en France »,
- Le figaro : « Baisse historique des naissances »,
- France bleu : « La natalité au plus bas en France depuis près de 30 ans » ...

Ces publications font écho à un rapport de l'Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE) paru cet été. Selon l'INSEE, au mois de juillet 2023 : 1907 bébés sont nés en moyenne chaque jour en France, soit 8,6% de moins qu'en juillet 2022. Ces données sont confirmées sur les des premiers mois de l'année 2023, au cours desquels 370 500 bébés sont nés dans le pays, soit environ 29 000 de moins qu'à la même période en 2022, ce qui représente une baisse des naissances de 7 %. "Le nombre de naissances par jour n'avait jamais été inférieur à 2000 pour un mois de juillet depuis 1994, première année de disponibilité des données mensuelles sur le champ de la France métropolitaine et des DOM", explique l'institut.

Ce dernier rapport de la baisse de la natalité ne fait que confirmer une tendance stable depuis plusieurs décennies dans le monde occidental. Dans l'Union Européenne (UE), le total annuel le plus élevé de naissances vivantes a été enregistré en 1964, avec 6,80 millions. Depuis ce niveau relativement élevé jusqu'au début du XXIe siècle, le nombre de naissances vivantes dans l'UE a diminué à un rythme relativement régulier, pour atteindre un minimum de 4,36 millions en 2002. Cela a été suivi de quelques modestes rebonds en 2008, 2014, et 2016, mais en 2020, le chiffre le plus bas depuis 1960 a été enregistré avec la naissance de 4,07 millions de bébés (Figure 1). En France, pays le plus fécond de l'Union européenne (UE), le nombre de naissances a atteint un niveau historiquement bas en 2022.

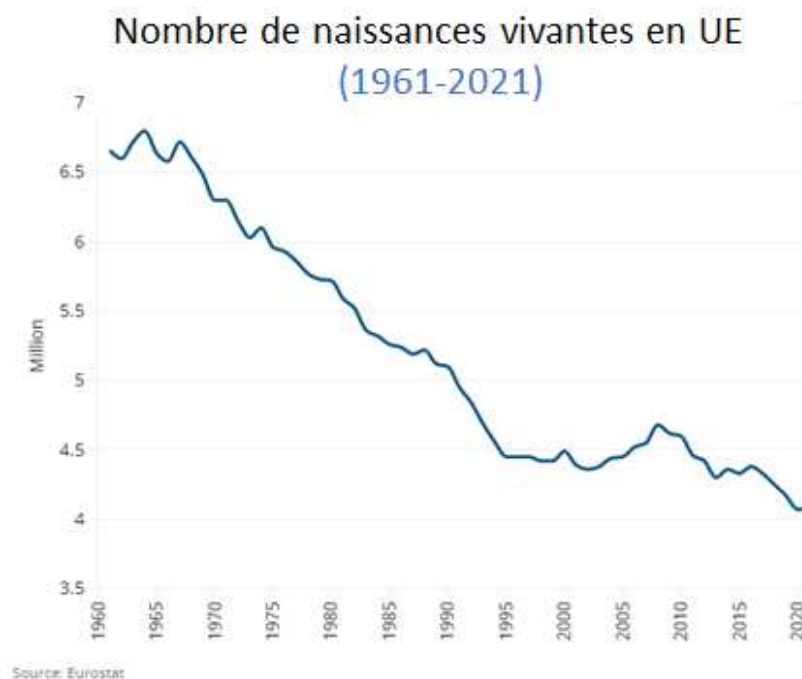


Figure 1 : Nombre de naissances vivantes en UE. Source : Eurostat 2021

L'indice synthétique de fécondité (ISF) évalue le nombre d'enfants qu'aurait une femme, au cours de sa vie reproductive. Il est obtenu par l'addition de tous les taux de fécondité par âge chez une femme en âge de procréer (de 15 à 50 ans). En supposant une migration nette nulle et une mortalité inchangée, un ISF de 2,1 enfants par femme garantit une population globalement stable¹.

Comme le montre la Figure 2, l'ISF a chuté de manière significative dans l'Union Européenne (UE), au Japon et aux États-Unis. En 2021, la France avait le taux de fécondité le plus élevé parmi les États membres de l'UE avec 1,84 naissance vivante par femme selon *Eurostat*, l'office statistique de l'UE. Malte avait le taux le plus bas avec 1,13 naissance vivante suivie par, l'Espagne (1,19), l'Italie (1,25), Chypre (1,39) et la Grèce (1,43).

Les facteurs sociaux et économiques combinés à l'avènement de méthodes contraceptives efficaces et à l'accès à l'interruption volontaire de grossesse (IVG) ont largement contribué à la baisse du taux de natalité. Une baisse de la fertilité des couples serait également à l'origine de cette tendance. Il a été rapporté qu'une baisse de 15 % de la fertilité impliquait une diminution de la fécondité de 4 % et une augmentation de 73 % de la proportion de couples éligibles aux traitements contre l'infertilité².

Avec le vieillissement croissant de la population, le problème de la baisse du taux de natalité suscite une grande inquiétude au sein de la communauté internationale³.

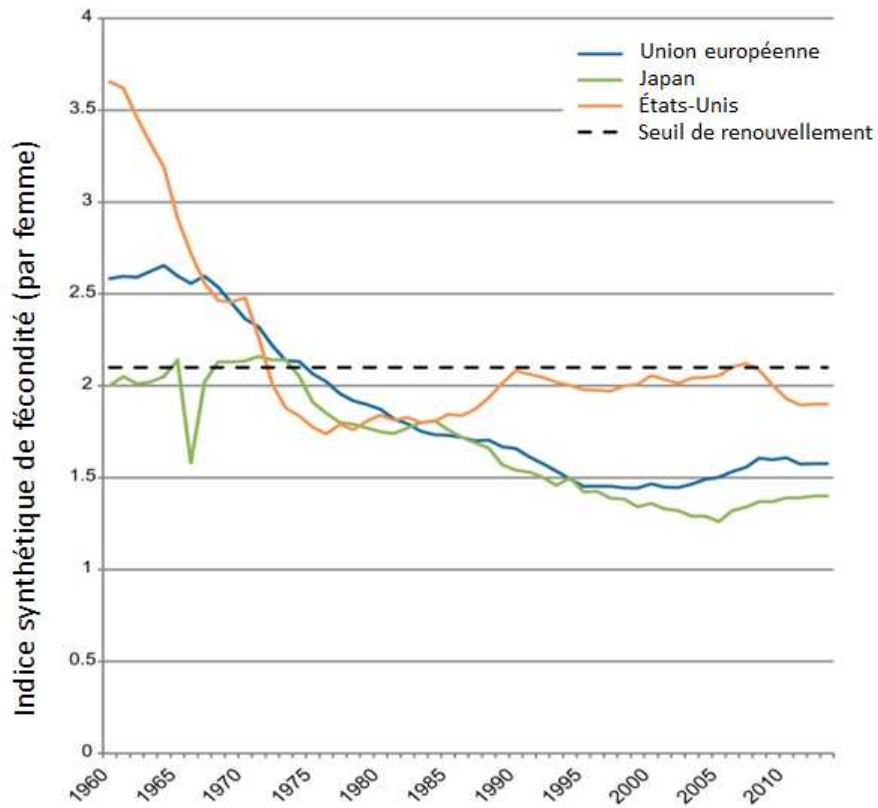


Figure 2: Indice synthétique de fécondité, en UE, Japan, et aux Etats-Unis, de 1960 à 2013. La ligne ponctuée représente une valeur d'ISF de 2.1 qui représente le seuil de remplacement. Source : the World Bank, traduit par nos soins.

1. Infertilité

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité de concevoir après 1 an de rapports sexuels réguliers non protégés⁴. Dans le monde, plus de 186 millions de personnes souffrent d'infertilité, la majorité étant des résidents de pays en voie de développement⁵. En France, parmi les 24 millions d'adultes âgés de 20-49 ans, il y aurait 3,3 millions de femmes et d'hommes qui ont rencontré dans leur couple des problèmes d'infertilité nécessitant une aide médicale⁶.

L'infertilité a été reconnue comme un problème de santé publique dans le monde entier par l'OMS⁷. En France, sur les 15 millions d'adultes âgés de 20-49 ans qui ont déjà essayé d'avoir un enfant le risque d'avoir une difficulté à concevoir qui conduise à consulter un médecin est estimé à 24 %, soit un couple sur quatre⁸.

2. Impact de l'infertilité

L'infertilité constitue un grave problème social, le retard d'obtention de la grossesse aurait des implications sur l'état de santé général au-delà de l'absence d'une grossesse conçue à temps. Par exemple, certaines études rapportent qu'un délai plus long jusqu'à la grossesse augmente le risque d'issues défavorables de la grossesse⁹ et de maladies gravidiques¹⁰, qui à leur tour peuvent influencer le développement de maladies adultes plus tardives, comme le syndrome de dysgénésie ovarienne¹¹. D'un point de vue démographique, l'impact de l'infertilité est considérable, avec des conséquences sociales et économiques¹², allant jusqu'aux disparités en matière de santé¹³.

Ayant l'idée que la maternité représente une partie naturelle et essentielle de la vie conjugale, les couples confrontés à des problèmes d'infertilité font face à une crise majeure. L'adaptation à l'infertilité est décrite comme l'une des expériences les plus stressantes qu'une personne puisse subir¹⁴. Très souvent, l'annonce de l'infertilité provoque la même réaction que celle du décès d'un proche ou du diagnostic d'une maladie grave¹⁵.

Dans la plupart des cultures, l'infertilité est considérée comme un échec sérieux de la part de la femme à remplir son rôle de maternité. Pour une femme, l'absence d'enfant est associée à des troubles fonctionnels, à la perte de contrôle sur son corps, avec un instinct maternel insatisfait et un sentiment d'exclusion de la communauté féminine, entraînant une baisse de son estime de soi^{16,17}.

L'infertilité masculine représente un véritable « coup de poignard » narcissique en atteignant les hommes au plus profond de leur image masculine. Pour un homme, l'absence d'enfant est associée à un défaut de virilité, à un instinct paternel insatisfait, et à l'échec du rôle social et de la poursuite de la lignée^{16,17}. Un homme présentant des troubles de la fertilité peut avoir un retentissement négatif majeur dans la vie sociale¹⁸. Ces difficultés de conception impliquent généralement de l'insomnie et des symptômes de stress, avec une activité professionnelle et sociale intensifiée, allant parfois, jusqu'à la recherche de relations sexuelles extraconjugales¹⁹.

3. Infertilité masculine : un déclin progressif et continu des spermatozoïdes

Bien que le facteur prédictif négatif le plus puissant de la fertilité soit l'augmentation de l'âge des femmes à la conception²⁰ (seulement la moitié des femmes de plus de 35 ans obtiennent une grossesse dans l'année qui suit leur tentative^{21,22}), une étiologie masculine est identifiée chez 50 % des couples infertiles²³. Le diagnostic de l'infertilité masculine est effectué grâce au spermogramme, qui évalue entre-autres, un paramètre important pour la fertilité masculine : la numération des spermatozoïdes.

La numération des spermatozoïdes est d'une importance considérable pour la santé publique pour plusieurs raisons. Premièrement, le nombre de spermatozoïdes est étroitement lié à la fertilité masculine et constitue un élément crucial pour la caractériser^{24,25}. Deuxièmement, une diminution du nombre de spermatozoïdes est associée à une plus grande fréquence de cryptorchidie, d'hypospadias et de cancer des testicules²⁶, et prédit une augmentation de la mortalité et de la morbidité masculine toutes causes confondues²⁷⁻²⁹. Troisièmement, le nombre et la mobilité des spermatozoïdes sont associés de manière plausible à de multiples influences environnementales, notamment les perturbateurs endocriniens^{30,31}, et peuvent refléter l'impact de l'environnement sur la santé masculine tout au long de la vie³². Nous développerons cela dans les chapitres à venir.

Le premier constat du déclin de la numération des spermatozoïdes date de 1974. Nelson et Bunge³³ ont remarqué une augmentation du nombre d'hommes consultant pour infertilité dans leur hôpital universitaire d'*Iowa City*, aux États-Unis, et ont été les premiers à se demander si des altérations des paramètres spermatiques sont à l'origine de cette forte demande de prise en charge. Quelques années plus tard, Leto et Frensilli ont signalé, une

baisse progressive du nombre de spermatozoïdes chez les donneurs dans leur centre de conservation de sperme à Washington entre 1973 et 1980³⁴.

Au début des années 1990, une première grande étude publiée par l'équipe danoise de Carlsen et *al.* a rapporté une diminution potentielle de la production de spermatozoïdes. En utilisant une approche basée sur la régression linéaire des valeurs moyennes de concentration de spermatozoïdes chez des hommes en bonne santé, ils ont analysé 61 études publiées entre 1940 et 1990. Les résultats ont montré que le nombre de spermatozoïdes dans le sperme avait diminué d'environ 50 %, passant de 113 Million/ml en 1940 à 66 Million/ml en 1990³⁵. Les auteurs de cette étude ont affirmé que leurs données « pourraient refléter une réduction globale de la fertilité masculine ». Cette conclusion a bénéficié d'une couverture médiatique considérable, suscitant une inquiétude sans précédent quant à un possible déclin de la fertilité masculine dans la population générale. Bien que l'étude de Carlsen et *al.* n'ait montré aucune preuve d'un effet conséquent sur la fertilité, le nombre d'études examinant les variations géographiques et temporelles de la qualité du sperme a considérablement augmenté après sa publication.

L'étude la plus rigoureuse sur le plan méthodologique est une revue systématique réalisée en 2017 par Levine et *al.*³⁶ qui a étudié la tendance temporelle du nombre de spermatozoïdes. Les auteurs ont réalisé une analyse de méta-régression, utilisant à la fois, des estimations de la concentration des spermatozoïdes, et le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Ils ont analysé toutes les publications éligibles en langue anglaise de 1981 à 2013 qui contenaient des données sur le nombre de spermatozoïdes, incluant au total 185 études en Amérique du Nord, en Europe et en Australie. Les résultats ont démontré un déclin marqué et continu des deux caractéristiques chez les hommes du monde occidental sans prise en compte de leur statut de fécondité. Avec une diminution du nombre de spermatozoïdes de 1,6 % par an et un déclin global de 59,3 % en environ 40 ans (Figure 3).

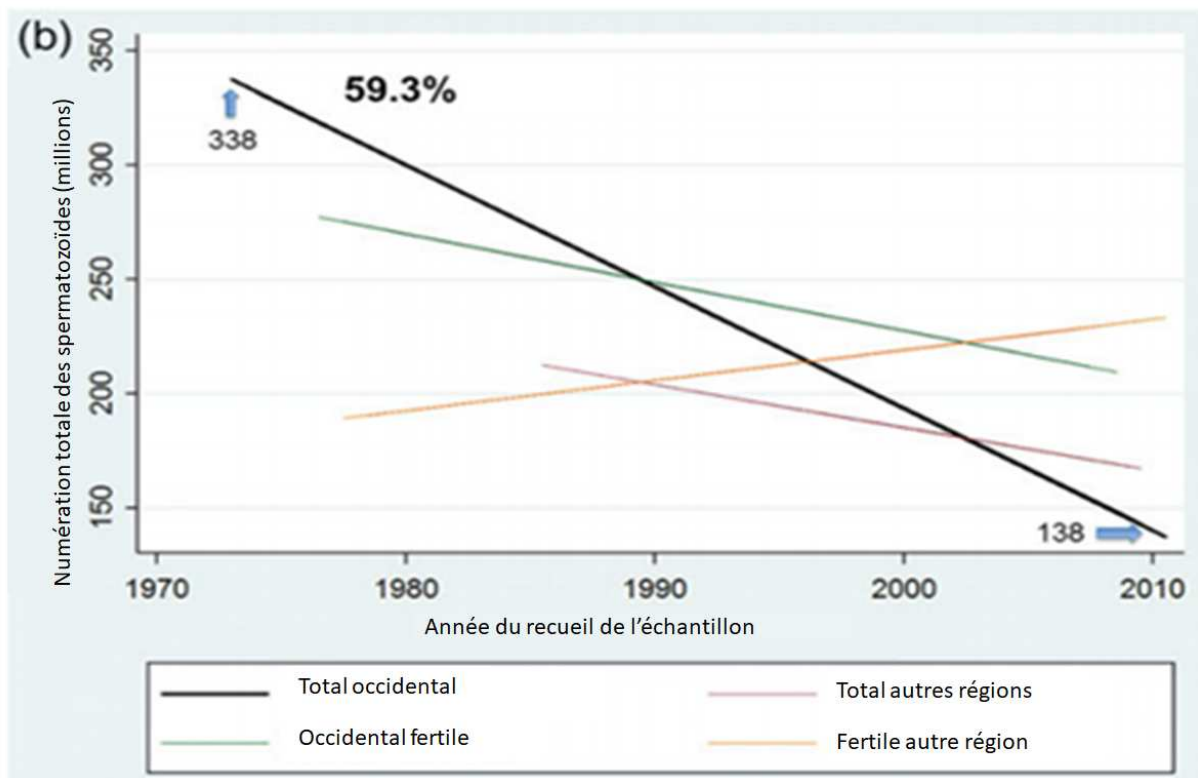


Figure 3 : Modèle de méta-régression pour le nombre moyen de spermatozoïdes en fonction du statut de fécondité et des groupes géographiques³⁶. Source : Levine et al.³⁶ traduit par nos soins.

Afin d'élargir leur analyse à tous les continents, et compte tenu de la durée de 6 ans écoulés entre la collecte des échantillons et l'année de la publication de leur étude en 2017. Levine et al.³⁷ ont mené une nouvelle recherche documentaire au printemps 2020 pour identifier les études éligibles publiées entre 1er janvier 2014 et 31 décembre 2019. Cette nouvelle analyse comprenant sept années supplémentaires de collecte d'échantillons, et ajoutant 44 estimations aux 244 déjà incluses dans l'analyse précédente, a fourni pour la première fois des preuves solides d'un déclin du nombre de spermatozoïdes chez les hommes d'Amérique du Sud/Centrale, d'Asie et d'Afrique, ainsi que d'un déclin mondial au 21e siècle, avec des données suggérant que le rythme de ce déclin s'est accéléré (Figures 4 et 5).

Des tendances similaires ont été observées chez les hommes chinois, avec une réduction de 37 % de la concentration des spermatozoïdes et une diminution de 28 % du nombre total de spermatozoïdes entre 1981 et 2019³⁸.

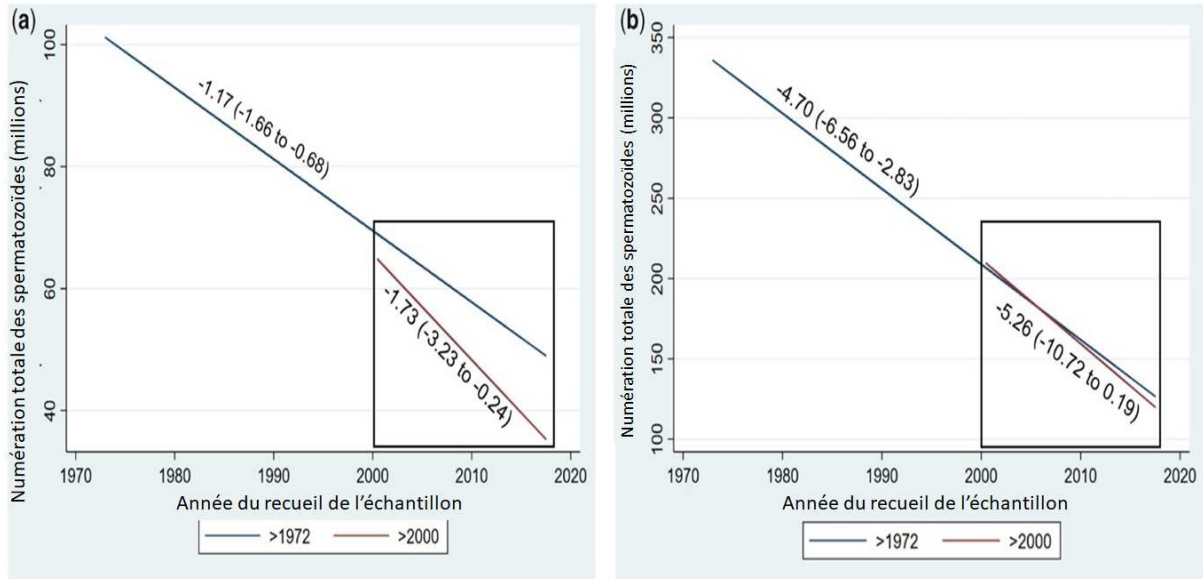


Figure 4 : Modèles de méta-régression pour la concentration moyenne de spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes par année de collecte parmi des hommes non sélectionnés de tous les continents, (a) concentration moyenne de spermatozoïdes, (b) nombre total de spermatozoïdes. Source : Levine et al.³⁷ traduit par nos soins.

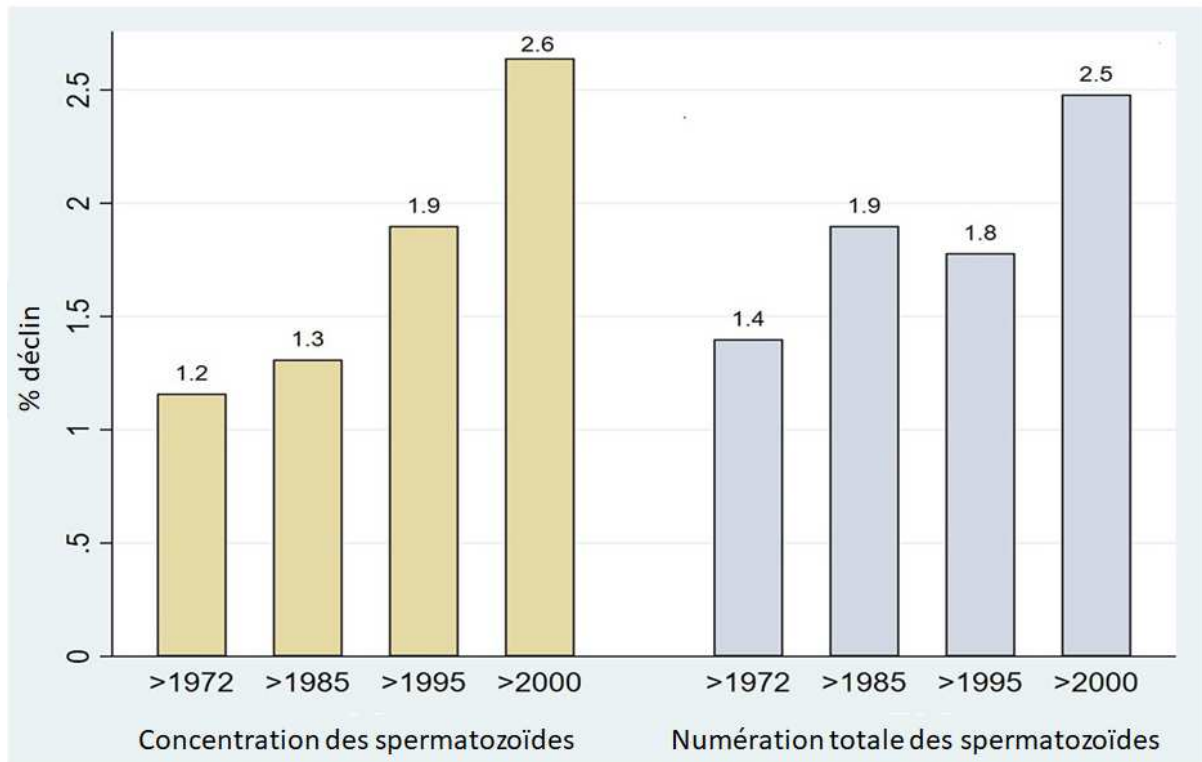


Figure 5 : Pourcentage annuel du déclin selon les périodes, pour la concentration moyenne de spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes chez les hommes non sélectionnés à l'aide d'un modèle de méta-régression stratifié. Source : Levine et al.³⁷ traduit par nos soins.

La question de la baisse mondiale de la qualité du sperme fait l'objet d'une large couverture médiatique et suscite un débat considérable parmi les professionnels de la fertilité^{26,39,40}. Ainsi, en 2018, un groupe d'éminents cliniciens et scientifiques ont appelé les gouvernements à reconnaître la diminution de la fertilité masculine comme un problème majeur de santé publique et à mettre l'accent sur l'importance de la santé reproductive masculine pour la survie de l'espèce humaine⁴¹.

4. Facteurs pouvant influencer la qualité du sperme

Malgré les baisses inquiétantes de la qualité du sperme au cours des dernières décennies, les causes sous-jacentes de ces tendances n'ont pas été entièrement comprises⁴². Plusieurs facteurs ont été proposés pour être impliqués dans cette tendance défavorable, notamment le stress, les changements alimentaires et du mode de vie, la consommation de toxiques, les taux croissants d'obésité et des maladies chroniques, et l'exposition croissante aux substances toxiques environnementales^{43,44}.

De plus en plus de preuves suggèrent que des facteurs de risque environnementaux pourraient participer à l'altération de la qualité du sperme et suggèrent que les perturbateurs endocriniens (PE) en sont un acteur majeur. Selon *L'International Programme on Chemical Safety* (IPCS) de l'Organisation Mondiale de la Santé, « un PE est une substance exogène ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et provoque par conséquent des effets néfastes sur un organisme intact ou sur sa descendance »⁴⁵. Une autre définition plus simple des perturbateurs endocriniens a été proposée par l'Endocrine Society (2012) : « un perturbateur est un produit chimique exogène, ou un mélange de produits chimiques, qui peut interférer avec n'importe quel aspect de l'action hormonale »³¹.

Le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens n'est pas entièrement élucidé. Il est suggéré qu'ils peuvent affecter la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, les actions de liaison ou l'élimination des hormones endogènes, des processus de développement et de la reproduction⁴⁶.

En raison de l'activité œstrogénique et anti-androgène de ces composés, les effets indésirables sur la reproduction masculines semblent être assez importants⁴⁵. Une grande partie de nos connaissances concernant les effets des PE sur la fertilité masculine proviennent

d'études animales où il a été démontré que l'exposition aux PE peut affecter négativement les concentrations d'hormones reproductives, notamment la testostérone et la LH, ainsi que la mobilité, la morphologie, la concentration et l'apoptose des spermatozoïdes⁴⁷⁻⁴⁹.

Les PE constituent un groupe hétérogène de substances comprenant, par exemple, les métaux lourds, les phytoestrogènes, les plastifiants, les dioxines, les agents pharmaceutiques, les pesticides, et les fongicides^{45,50}. Ils sont omniprésents et ont été détectés dans l'air, le sol, les fluides corporels, l'eau potable, les aliments, le lait maternel, les cosmétiques, les produits ménagers, les appareils électroniques, les textiles, etc... Par conséquent, l'exposition postnatale peut se produire via la consommation d'aliments et d'eau, ainsi que par inhalation et/ou contact cutané⁵¹. L'exposition prénatale peut se produire via le placenta, affectant directement le développement du fœtus ou prédisposant à des effets sur la santé reproductive plus tard dans la vie⁵⁰.

Le mode de vie des hommes modernes conditionnerait la spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes. La nutrition est parmi les sources importantes de l'exposition aux PE^{52,53}. De plus, l'impact de l'alimentation dépend également de ses propriétés quantitatives et qualitatives⁵⁴⁻⁵⁶, et du surpoids lié à une alimentation déséquilibrée⁵⁷.

La consommation de tabac et de cannabis est associée à une augmentation du risque d'infertilité. Plus de 4 700 substances chimiques différentes ont été identifiées dans la fumée de tabac, allant des métaux lourds aux hydrocarbures aromatiques polycycliques en passant par les produits chimiques mutagènes⁵⁸. Le tabagisme est associé à une réduction de la concentration, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes⁵⁹⁻⁶¹. D'autre part, il a été démontré que la consommation du cannabis a un effet sur l'axe hypothalamo-hypophysogonadique et sur la spermatogenèse. Ceci est expliqué par la présence de récepteurs cannabinoïdes dans l'hypophyse antérieure, les cellules de Leydig, et les cellules de Sertoli⁶².

Le lien entre l'alcool et la fertilité a été étudié pour la première fois en 1985. L'analyse de sperme d'hommes atteints du syndrome de dépendance à l'alcool ont révélé une diminution significative du volume de liquide séminal et de la concentration de spermatozoïdes⁶³. En 2011, une méta-analyse incluant 57 études et 29 914 sujets a trouvé une association significative entre l'alcool, le volume de sperme, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes⁶⁴.

Certaines substances médicamenteuses peuvent également exercer un effet néfaste sur la fertilité masculine. En plus des traitements anticancéreux, les classes thérapeutiques susceptibles d'altérer la spermatogenèse avec des niveaux de preuves scientifiques élevés sont les immunosuppresseurs, les anti-androgènes, la testostérone exogène et certains anti-inflammatoires⁶⁵.

La température optimale de la spermatogenèse est généralement inférieure de 2 à 4 °C à celle du corps⁶⁶. Les spermatozoïdes de l'épididyme et les cellules germinales testiculaires sont sensibles aux dommages causés par le stress thermique⁶⁷. Un défaut de thermorégulation scrotale provoque une hyperthermie testiculaire, qui conduit à un stress thermique génital. Ceci est préjudiciable à la spermatogenèse, une hyperthermie scrotale peut induire une apoptose⁶⁸ et une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes⁶⁹, et conduit à altérer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes⁷⁰.

La multiplicité de ces causes, elles-mêmes souvent combinées, aboutit à une demande croissante des couples d'une aide médicale pour accéder à la paternité. Ainsi, un enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France.

5. Assistance médicale à la procréation

L'assistance médicale à la procréation est définie dans l'article L.2141-1 du Code de la santé publique : « les pratiques cliniques et biologiques permettant la conception *in vitro*, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle, ainsi que toute technique d'effet équivalent permettant la procréation en dehors du processus naturel... »⁷¹. Cette définition enveloppe l'essentiel des actes médicaux et biologiques qui permettent de traiter les différentes formes d'infertilité, voire d'éviter aux membres du couple de transmettre à leur descendance ou à l'un des membres du couple une affection jugée grave.

Plus d'une femme sur dix en âge de procréer a déjà eu recours à un de traitement de l'infertilité aux États-Unis⁷². En France, plus de 150 000 femmes sont traitées pour infertilité chaque année⁷³. En 2018, 3,4 % des naissances devraient être le fruit d'une technique d'AMP⁷⁴ (Figure 6).

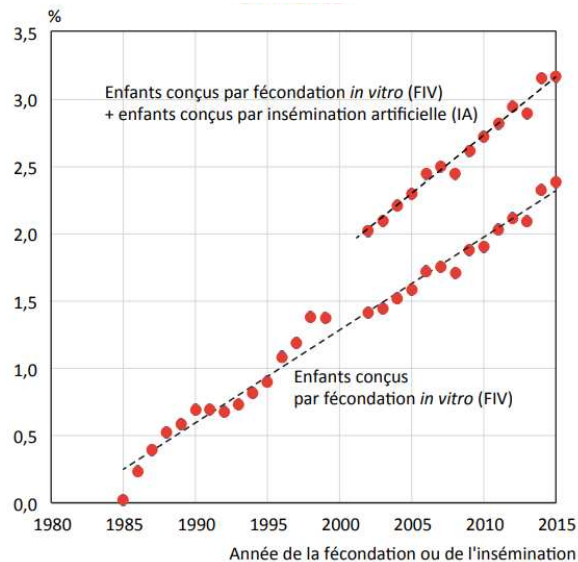


Figure 6 : Évolution de la proportion d'enfants conçus par assistance médicale à la procréation en France.
 Source : Élise de La Rochebrochard, *Population & Sociétés* n° 556, INED, juin 2018.

Il est proposé au couple, en fonction des résultats du bilan initial : les méthodes d'induction de l'ovulation (IO) non intégrées dans l'AMP en France, l'insémination artificielle (IA) avec sperme de conjoint ou de donneur (IAC et IAD), la fécondation *in vitro* « classique » (FIVc) et la FIV avec injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI).

Dans certains cas de troubles de l'ovulation, il est généralement proposé aux couples d'avoir recours à la stimulation de l'ovulation. Elle consiste, la plupart du temps, à stimuler la production de follicules par les ovaires grâce à l'administration de gonadotrophines. L'objectif est d'obtenir le développement d'un ou de deux ovocytes qui seraient fécondés grâce à des rapports sexuels programmés. Les couples sont invités à avoir des relations sexuelles les jours « fertiles » pour augmenter les chances de succès du traitement avec des délais d'abstinence plus ou moins longs⁷⁵.

L'Insémination Artificielle (IA) permet de placer des spermatozoïdes, sélectionnés et concentrés dans un petit volume, à l'aide d'un cathéter dans la cavité utérine. Théoriquement, elle permet à un nombre plus élevé de spermatozoïdes mobiles et de morphologie normale d'atteindre l'ovocyte. Cette technique a été utilisée en médecine depuis plus de 200 ans dans le traitement du couple infertile. La première utilisation documentée de l'IA a été réalisée à Londres en 1770 par John Hunter, qui a proposé à un homme porteur d'un hypospadias d'injecter à l'aide d'une seringue chauffée son propre sperme dans le vagin de sa femme. Elle

sera proposée à la fin du 19ème siècle en intra-cervical par J Marion Sims et en intra-utérin par Fabien Gigon D'Angoulême⁷⁶.

Le terme d'IA couvre plusieurs techniques d'insémination : intravaginale, intra-cervicale, intra-utérine etc. mais l'insémination intra-utérine (IIU) est la plus répandue et elle est presque la seule utilisée actuellement. L'IIU est peu couteuse en comparaison avec les autres techniques d'AMP, peu invasive et largement utilisée comme traitement de première intention pour les couples souffrant de différentes causes d'infertilité avec des chances de grossesse par cycle avoisinant les 15% en intraconjugal et peuvent aller au-delà de 20% en cas d'IAD.

En cas d'imperméabilité des trompes, ou si le nombre de spermatozoïdes est insuffisant ou si l'IA n'a pas été efficace après 3 à 6 tentatives, il est alors suggéré au couple d'avoir recours à la Fécondation *In Vitro* (FIV) : c'est une technique au cours de laquelle sont en contact, hors de l'organisme (*in vitro*), les spermatozoïdes avec les ovocytes. Après fécondation, les embryons sont transférés dans la cavité utérine de la femme. En cas de sperme très déficient, la technique d'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) sera privilégiée : c'est une technique dans laquelle un seul spermatozoïde sera directement injecté dans l'ovocyte mature *in vitro*.

Les techniques de FIV sont connues pour être performantes et sont de plus en plus utilisées dans la prise en charge des couples désirant un enfant. Cependant, elles impliquent la stimulation ovarienne par gonadotrophines avec tout leur répertoire d'effets secondaires ce qui peut avoir un impact important sur le vécu des couples.

III. Aluminium : le métal le plus abondant sur terre

L'aluminium est un métal naturellement présent dans l'environnement. Derrière l'oxygène et le silicium, c'est le 3^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre, dont il représente 8%⁷⁷. Étant relativement réactif, l'aluminium n'apparaît pas naturellement sous forme de métal pur, mais est plutôt lié à l'oxygène et à d'autres éléments dans des minéraux et des roches, tels que la bauxite dont il est extrait sous forme d'oxyde d'aluminium ou alumine Al_2O_3 . Traité de manière appropriée, l'aluminium peut résister à la corrosion causée par l'eau, le sel et d'autres facteurs environnementaux, ainsi que par un large éventail d'autres agents chimiques et physiques.

L'aluminium est non magnétique, a une faible densité et est hautement conducteur. Il est souvent mélangé à de petites quantités d'autres métaux pour former des alliages d'aluminium, plus résistants et plus durs.

1. Histoire

Les Chinois auraient produit de l'aluminium plus de quinze siècles avant les Occidentaux ! En octobre 1958, la revue Horizons, appartenant au Conseil mondial de la paix, a publié un curieux entrefilet : « des objets en aluminium auraient été trouvés dans la tombe d'un général chinois mort au combat en l'an 297 de notre ère ».

La tombe de *Chou-Chu*, un célèbre général de la dynastie chinoise, qui vécut de 265 à 316 après JC a été découverte lors de la première phase de construction d'un terrain de sport dans la province chinoise du Jiangsu. Parmi les objets trouvés figuraient des morceaux de poterie, de la porcelaine, des morceaux d'or et une ceinture en métal (Figure 7). Les ornements de la ceinture ont été minutieusement analysés par l'Institut de physique appliquée de l'Académie chinoise des sciences, et se sont avérés contenir 85 % d'aluminium. La manière dont il a été produit reste un mystère.

L'aluminium est pourtant resté inconnu jusqu'en 1808, car il est lié à l'oxygène et au silicium pour former des centaines de minéraux différents, et ne se retrouve jamais naturellement sous sa forme métallique. Sir Humphrey Davy, le chimiste qui a découvert le métal, l'a appelé « *aluminium* », du nom de l'un de ses composés sources, l'alun. Peu de temps après, l'Union internationale de chimie pure et appliquée a adopté la nomination actuelle « Aluminium ». Le

premier procédé de production d'aluminium a été mis au point en France en 1854 par le chimiste Henri Sainte-Claire Deville, mais l'ensemble des premiers procédés d'extraction ne donnaient au mieux que des quantités en kilogrammes d'aluminium⁷⁸.



Figure 7 : La « ceinture de Nanjing »⁷⁹

La difficulté d'arracher l'aluminium de ses oxydes, a conféré à l'aluminium un statut temporaire de métal précieux, plus précieux même que l'or. Ainsi, en 1855, une barre d'aluminium occupait une place de choix aux côtés des bijoux de la couronne à l'Exposition Universelle de Paris. De plus, plusieurs échantillons d'aluminium ont été envoyés aux académies des sciences du monde entier, tandis que l'empereur Napoléon III réservait la vaisselle en aluminium uniquement à ses invités les plus honorés^{80,81} (Figure 8).

En 1886 Charles Martin Hall, un scientifique amateur de 22 ans a mis au point le premier moyen économique d'extraction de l'aluminium. Travaillant dans un bûcher avec sa sœur aînée comme assistante, il a dissous de l'oxyde d'aluminium dans un bain de cryolithe fondue, puis a séparé l'aluminium et l'oxygène à l'aide d'un fort courant électrique⁸². Remarquablement, un autre jeune de 23 ans, le Français Paul Louis Toussaint Héroult, a découvert exactement la même technique électrolytique presque exactement au même moment, provoquant une course transatlantique aux brevets⁸³.

Querelle de brevets entre Paul Héroult et Charles Martin Hall

Le 9 juillet 1886, Charles Martin Hall dépose une demande au Bureau des brevets. Mais il apprend avec stupéfaction que le Français Paul Héroult avait déjà déposé en avril 1886 un brevet américain pour l'électrolyse de l'aluminium. C'est le début d'un litige de trois ans entre

les deux jeunes inventeurs. Grâce aux lettres à son frère et aux témoignages de sa sœur Julia et de son professeur Jewett, Charles Martin Hall put établir que son invention était antérieure à la candidature de Paul Héroult.

En France, la législation veut que l'invention soit attribuée au premier déposant, de ce fait, seul le brevet de Paul Héroult est valable. Mais aux États-Unis, le brevet est attribué à celui qui a le premier réalisé et mis en pratique son invention. Les premiers essais de Hall datant du début de 1886 et ceux de Héroult de 1885, c'est encore celui-ci qui aurait dû l'emporter. Cependant, la loi des États-Unis inclut une clause qui favorise les inventeurs américains : elle exige que les dates de réalisation et de mise en pratique soient établies sur le territoire américain. Héroult n'ayant pas pu remplir cette condition pour ses expériences de 1885, c'est à Hall qu'a été attribué le brevet aux États-Unis, après une longue procédure, le 2 février 1892. Finalement, le différend se régla par un compromis entre les deux inventeurs, Héroult ayant accepté de limiter l'exploitation de son brevet à l'Europe, et Hall à l'Amérique. Leur héritage, appelé le procédé « Hall-Héroult », reste la principale méthode de production d'aluminium à l'échelle commerciale, permettant la production de millions de tonnes chaque année à partir du minerai d'aluminium le plus abondant, la bauxite.

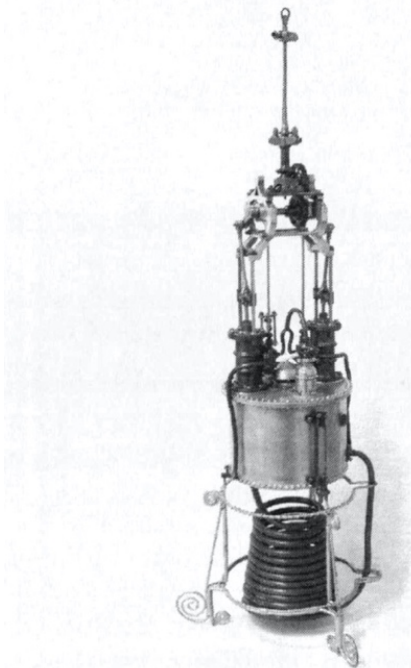
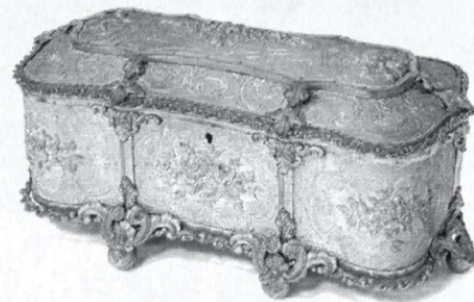
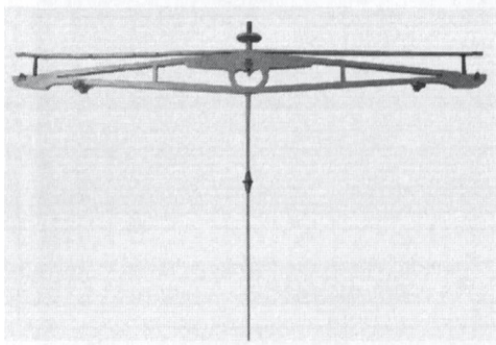


Figure 8 : Objets en aluminium (éventuellement associé à d'autres métaux) des collections des Musées Nationaux.⁸¹

2. La production d'aluminium : de l'alumine au métal

La bauxite, découverte en 1821 par Pierre Berthier, dans la colline des Baux, dans le sud de la France, est une matière argileuse contenant 52 % d'oxyde d'aluminium. Actuellement, la bauxite est la seule matière première utilisée dans la production d'alumine à l'échelle commerciale. En règle générale, quatre tonnes de bauxite séchée sont nécessaires pour produire deux tonnes d'alumine, qui à leur tour fournissent une tonne de métal d'aluminium primaire.

Les ressources en bauxite sont estimées entre 55 et 75 milliards de tonnes, réparties en Afrique (32 %), en Océanie (23 %), en Amérique du Sud et dans les Caraïbes (21 %), en Asie (18 %) et ailleurs (6%). La Guinée, l'Australie et le Vietnam sont cités comme abritant les plus grandes réserves de bauxite, tandis que la Chine ouvre la voie en termes de niveaux de production des fonderies d'aluminium. Les sociétés chinoises de production d'aluminium enregistrent l'une des productions d'aluminium les plus élevées au monde (Figure 9).

Aujourd'hui, la production mondiale de d'aluminium est supérieure à celle de tous les autres métaux non ferreux réunis, Elle totalisait 46,3 millions de tonnes en 2012 et elle a augmenté de façon constante au cours des dix années suivantes, atteignant un sommet de 68,0 millions de tonnes en 2021 (Figure 10). Pour répondre à la demande mondiale annuelle actuelle en aluminium, 11 kg de métal doivent être coulés pour chaque personne sur Terre⁸⁴.

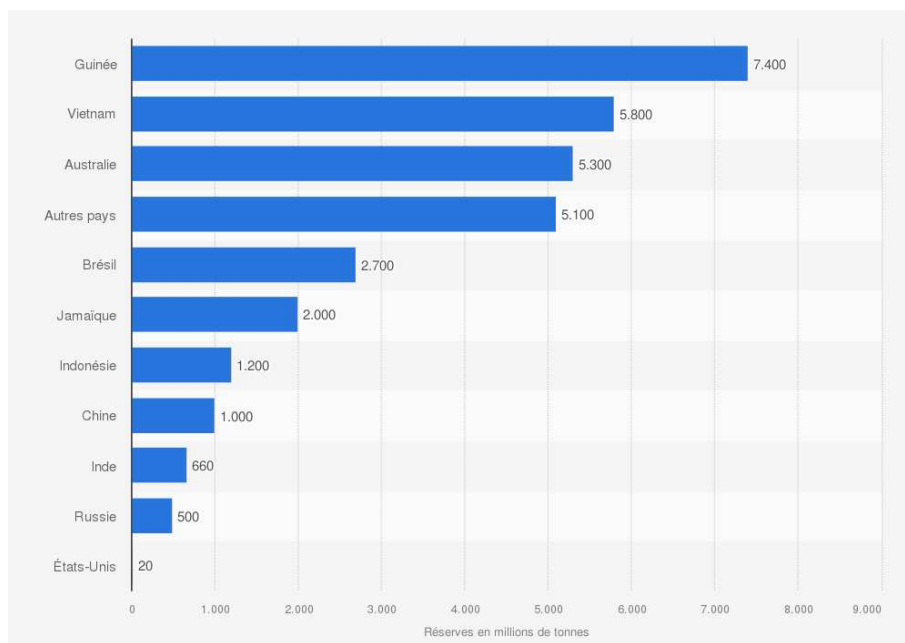


Figure 9 : Pays comptant les plus grandes réserves de bauxite dans le monde en 2022 (en millions de tonnes).
Source : Mineral commodity summaries 2023⁸⁵

3. Domaines d'utilisation : le métal le plus utilisé après le fer

Le poids léger de l'aluminium, associé à la haute résistance de certains de ses alliages, permet la conception et la construction de structures solides et légères qui sont particulièrement avantageuses pour la mobilité : voitures et avions ainsi que tous types de véhicules terrestres et nautiques.

L'industrie du transport n'est pas la seule à avoir saisi les avantages de l'aluminium. Du fait de ses nombreuses propriétés physico-chimiques, l'aluminium est un métal très utilisé dans de nombreux domaines (Figure 11). Au début des années 1900, l'aluminium avait déjà supplanté le cuivre dans les lignes électriques, sa flexibilité, sa légèreté et son faible coût compensant largement sa moindre conductivité. Les alliages d'aluminium, ayant une résistance qui dépasse parfois celle de l'acier, sont devenus des matériaux favoris dans la construction. Ils sont utilisés dans les revêtements, les fenêtres, les gouttières, les cadres de portes et la toiture...

L'aluminium est tout aussi susceptible d'être présent à l'intérieur de la maison : dans les appareils électroménagers, les casseroles et poêles, les ustensiles, les antennes de télévision et les meubles. En tant que film mince, flexible et durable, imperméable à l'eau et résistant aux attaques chimiques, l'aluminium est un matériau d'emballage par excellence. L'incarnation la plus reconnaissable de l'aluminium est la canette de boisson, dont des centaines de milliards sont produites chaque année. La surface naturellement brillante de chaque canette constitue une toile de fond attrayante pour le nom du produit. De plus, ses parois minces peuvent résister à une force allant jusqu'à 7 bars de pression (trois fois celle d'un pneu de voiture typique), et ce avec des parois aussi fines qu'un cheveu (73 microns).

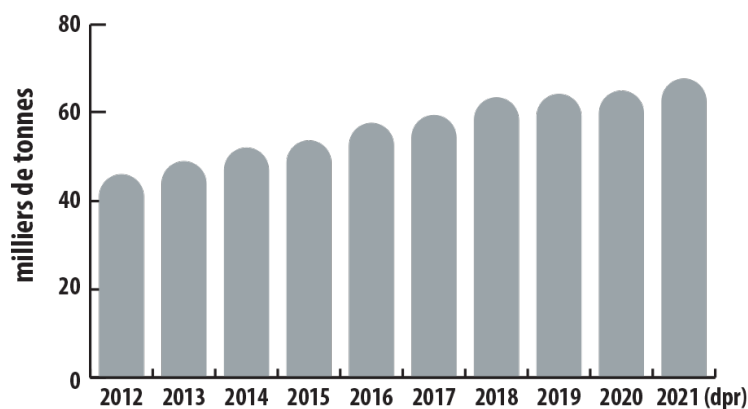


Figure 10 : Ce diagramme à barres à bandes illustre la production mondiale d'aluminium de première fusion en milliers de tonnes de 2012 à 2021. Source : U.S. GEOLOGICAL SURVEY.

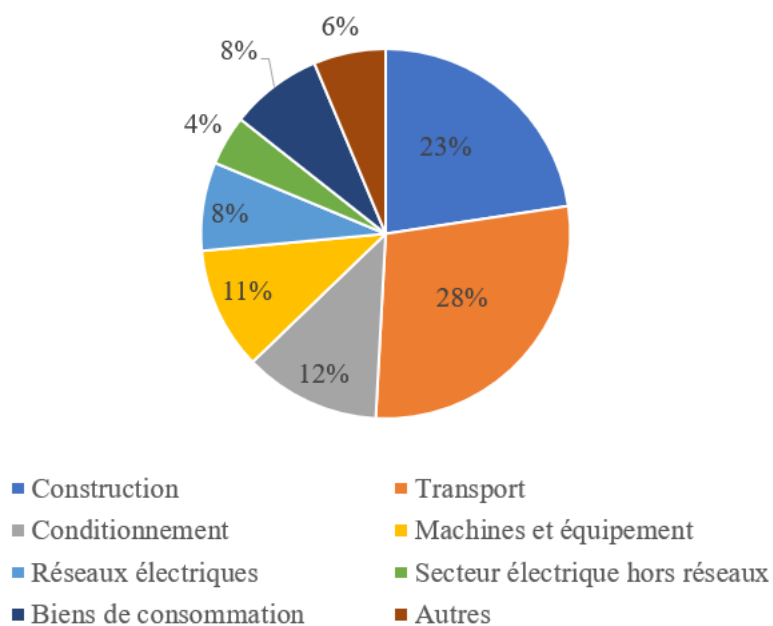


Figure 11 : utilisations finales de l'aluminium par secteur en 2017, Source : World Aluminium, 2018

4. Aluminium : le matériau le plus recyclé de la planète

Après que de nombreuses parties internationales ont signé l'Accord de Paris ⁸⁶, les stratégies d'atténuation visant à réduire les émissions de carbone sont devenues un sujet crucial pour les économies mondiales. De nombreuses industries ont commencé à modifier leurs procédures dans le but de réduire leurs émissions de gaz à effet de serre et de contribuer à la lutte mondiale contre le changement climatique. Par conséquent, la durabilité est devenue une question de plus en plus importante pour l'industrie de l'aluminium, car elle contribue de manière significative aux émissions mondiales de gaz à effet de serre.

Les processus de production d'aluminium sont fortement dépendants de l'énergie, depuis l'extraction jusqu'au produit final. Concrètement, le procédé d'électrolyse permettant d'extraire l'aluminium de la bauxite libère significativement plus de gaz à effet de serre que les autres étapes de fabrication. En 2021, la phase d'électrolyse a émis 863 millions de tonnes de dioxyde de carbone. Une façon de décarboner l'industrie de l'aluminium consiste à recycler.

L'aluminium est 100% recyclable, sans perte de ses qualités physico-chimiques (Figure 12). Il s'agit de l'un des matériaux les plus recyclés au monde, près de 75 % des 1,5 milliard de tonnes d'aluminium produit depuis 1880 est toujours utilisé aujourd'hui. Le recyclage de l'aluminium consomme environ 90 % d'énergie en moins que la production d'aluminium vierge à partir de

minerai brut et réduit les émissions de CO2 jusqu'à 26 %. Chaque année, plus de 30 millions de tonnes de déchets d'aluminium sont recyclés dans le monde, ce qui lui confère le statut de matériau le plus recyclé de la planète⁸⁷. Selon l'institut international de l'aluminium, en 2021, la Chine, premier producteur d'aluminium, a recyclé 12 771 kilotonnes d'aluminium et 13 193 kilotonnes de lingots d'aluminium. Ces chiffres pour l'Union européenne étaient respectivement de 5 551 et 5 734 kilotonnes.

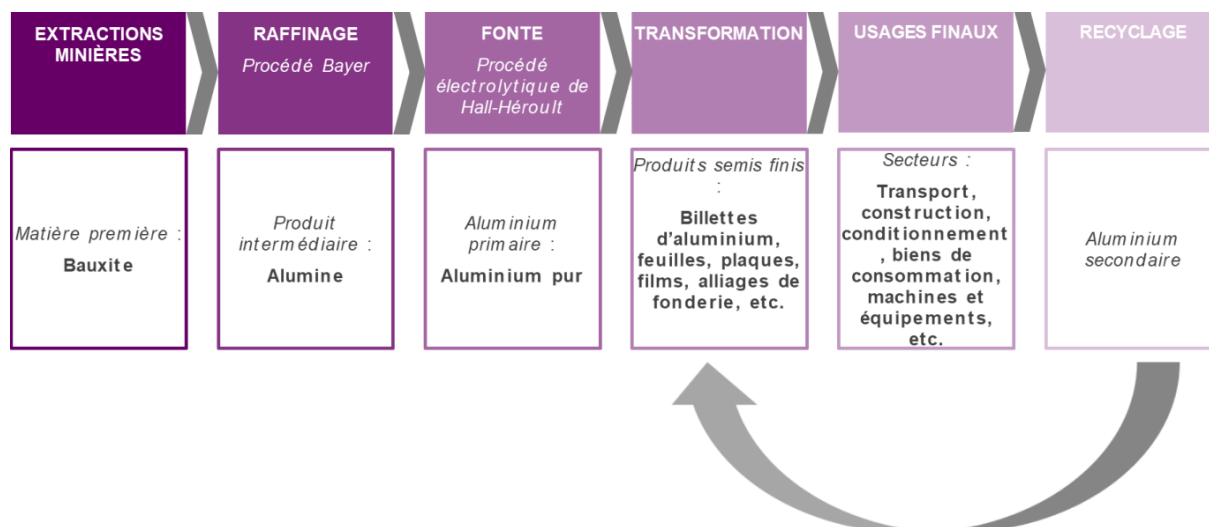


Figure 12: La chaîne de valeur de l'aluminium, Sources : OCDE, 2019 ; The Aluminium Association.

En raison des contraintes mondiales affectant les secteurs de l'automobile et du bâtiment, la pandémie de COVID-19 a eu un impact substantiel sur le marché du recyclage de l'aluminium. Cependant, le marché de l'aluminium s'est considérablement redressé au cours de la période 2021-2022, en raison de l'augmentation de la consommation de diverses industries utilisatrices finales.

5. Aluminium dans le contexte actuel :

Le conflit entre la Russie et l'Ukraine a entraîné la fermeture d'une raffinerie d'alumine d'une capacité de 1,7 million de tonnes par an en Ukraine. En parallèle, les coûts énergétiques élevés en Europe ont provoqué la réduction de la production ou la fermeture temporaire de plusieurs raffineries d'alumine. De plus, plusieurs fonderies d'aluminium primaire et fabricants de produits en aluminium à travers l'Europe ont annoncé des fermetures ou des réductions partielles. En septembre 2022, une fonderie d'aluminium primaire de 70 000 tonnes par an en

Allemagne a réduit sa production de 50 %, et une fonderie d'aluminium primaire de 290 000 tonnes par an en France a réduit sa production de 22 %.

Par ailleurs, rareté des matières premières, et l'augmentation des coûts de transport ont provoqué une flambée des prix de l'aluminium. En mars 2022, le coût moyen de l'aluminium atteignait 3 496 dollars américains par tonne métrique, soit une augmentation de 94 % par rapport à l'année 2019. Par la suite, une tendance à la baisse de prix a eu lieu tout au long de 2022 sur les marchés mondiaux.

Un rapport de l'Institut International de l'aluminium a révélé, en mars 2022, que la demande mondiale d'aluminium augmentera de près de 40 % d'ici 2030. Le secteur de l'aluminium devra produire 33,3 millions de tonnes supplémentaires pour répondre à la croissance de la demande dans tous les secteurs industriels de 86,2 millions de tonnes en 2020 à 119,5 millions de tonnes en 2030. Environ 37 % de cette croissance devrait provenir de la Chine, suivie de 26 % du reste de l'Asie, 15 % d'Amérique du Nord et 14 % d'Europe⁸⁸.

6. Exposition à l'aluminium

Le succès de l'aluminium en tant que matériau moderne aux multiples applications vient d'un large éventail de propriétés physiques et chimiques qui, combinées à son omniprésence dans la nature, en font une ressource naturelle extrêmement rentable. Comme évoqué précédemment, la production mondiale d'aluminium est en constante augmentation. De manière logique, le biote connaît une exposition croissante à l'aluminium biologiquement réactif. Plus particulièrement, l'exposition humaine à l'aluminium, à travers les produits alimentaires, cosmétiques, les médicaments, la contamination de l'environnement, et l'exposition professionnelle n'a jamais été aussi élevée et devrait continuer à augmenter⁸⁴.

Les sources d'exposition humaine à l'Al incluent en premier lieu l'alimentation⁸⁹, l'eau potable⁹⁰, l'air⁹¹, ainsi que les cosmétiques⁹² et les médicaments, notamment les antiacides⁹³. La participation à l'industrie de transformation de l'aluminium peut également entraîner une exposition professionnelle à l'aluminium⁹⁴. Des études antérieures ont démontré que la vaccination pouvait être considérée comme une source d'exposition à l'aluminium en raison de la présence d'adjuvants à base d'aluminium⁸⁹.

Le sang est probablement le principal réseau de distribution de l'aluminium systémique, l'aluminium y est présent à la fois dans les fractions sériques et cellulaires⁹⁵. Il existe des données montrant des concentrations significatives d'aluminium dans la sueur^{96,97} et celles-ci suggèrent que le système lymphatique pourrait également jouer un rôle dans le transport de l'aluminium dans tout le corps. Par ailleurs, l'aluminium a été mesuré dans divers fluides corporels, notamment l'urine⁹⁸, le liquide céphalo-rachidien⁹⁹, et le liquide séminal^{100,101}.

Il existe peu de données concernant la teneur en aluminium des organes humains et seul le cerveau a récemment fait l'objet d'une attention significative¹⁰². Pour une population « de référence » (c'est-à-dire non exposée de façon importante à l'aluminium), les principaux organes agissant comme des puits systémiques pour l'aluminium apparaissent être les poumons et les os, contenant jusqu'à 6 µg/g de poids sec, suivis du foie, des reins et du cerveau, tous inférieurs à 1 µg/g de poids sec. Ces données moyennes doivent être nuancées dans la mesure où il n'existe aucun tissu humain dans lequel la distribution de l'aluminium devrait être homogène^{102,103}.

7. Évaluation de l'exposition à l'aluminium

L'absorption de l'aluminium est contrôlée par des barrières protectrices naturelles, principalement le tractus gastro-intestinal^{104,105}. Ces mécanismes gastro-intestinaux protecteurs sont contournés chez les nourrissons prématurés recevant une nutrition parentérale à long terme, et qui courent un risque de toxicité par l'aluminium. L'exposition professionnelle à l'aluminium est principalement due à l'absorption par inhalation de particules d'aluminium présentes dans l'air¹⁰⁶. L'aluminium pénétrant l'organisme par voie respiratoire pourrait être retenu dans les épithéliums pulmonaires et olfactifs, la quantité d'aluminium d'origine respiratoire peut atteindre 1,4 mg par jour dans de nombreuses régions industrialisées¹⁰⁷.

L'apport en aluminium provenant des aliments représente plus de 90% de l'exposition humaine en dehors des sources non professionnelles¹⁰⁸, néanmoins la biodisponibilité orale de l'aluminium est faible, inférieure à 1 % chez les animaux de laboratoire et les volontaires humains¹⁰⁹. La contribution de l'eau potable à l'exposition orale totale à l'aluminium est généralement inférieure à 5 % de l'absorption totale¹¹⁰. La plupart des eaux naturelles contiennent des quantités insignifiantes de ce métal, néanmoins l'utilisation de sels d'aluminium dans les systèmes de purification de l'eau conduit à des quantités non négligeables dans l'eau du robinet¹¹¹. De plus, l'ajout de fluor à l'approvisionnement en eau potable affecte considérablement la spéciation et la solubilité de l'aluminium. Une concentration accrue de fluor dans l'eau potable, augmente nettement l'absorption intestinale de l'aluminium présent dans les aliments¹¹².

La concentration d'aluminium dans les aliments est extrêmement variable, une étude exhaustive de la teneur en aluminium des aliments a été publiée par Priest et *al.*¹¹³ décrivant que la concentration d'aluminium dans les aliments d'origine animale est faible, normalement inférieure à 1 µg/g, avec la valeur la plus élevée estimée à 19 µg/g dans certains fromages. Dans la population française, les légumes, le pain et les biscottes sont les vecteurs contribuant le plus à l'exposition à l'aluminium¹¹⁴, d'autres études ont rapporté une forte teneur en aluminium dans les plats préparés du fait de l'utilisation d'adjuvants alimentaires contenant de l'aluminium¹¹⁵.

Il est à noter que, la plupart des plantes sont assez sensibles à la toxicité de l'Al¹¹⁶ ce qui constitue un problème majeur en agriculture : la toxicité de l'Al est probablement le principal facteur limitant la productivité des cultures sur les sols acides, qui occupent environ 30 % de la superficie mondiale cultivable¹¹⁷. Le thé est l'une des rares plantes à accumuler naturellement de l'Aluminium en stockant une version chélatée dans les feuilles âgées, qui contiennent jusqu'à 3 % d'aluminium^{118,119}. Un nombre considérable d'études ont rapporté la concentration totale d'Al dans les infusions de thé pour sa toxicité, les boissons à base de thé constituent une source majeure d'exposition alimentaire à l'aluminium, et une consommation excessive de thé peut plus que doubler la consommation individuelle d'aluminium¹²⁰. Il a été rapporté que les infusions de thé typiques contiennent environ 50 fois plus d'aluminium que les infusions de café¹²¹.

La consommation des toxiques est également responsable d'exposition à l'aluminium, comme le démontre l'étude d'Exley et *al.* qui a retrouvé une teneur élevée en aluminium dans le tabac et de cannabis¹²² et a étendu cette observation pour fournir la première preuve directe que l'aluminium présent dans le tabac pourrait être biologiquement disponible lors du tabagisme actif et passif. Il en va de même concernant la consommation de cocaïne et d'héroïne¹²³.

L'hydroxyde d'aluminium est souvent administré par voie orale pour soulager temporairement les brûlures d'estomac ou le reflux gastro-œsophagien. Il peut être utilisé localement, temporairement, pour protéger et soulager la peau irritée et abrasée, les plaies et brûlures mineures, ainsi que les irritations cutanées résultant de la friction et du frottement¹²⁴. Les patients peuvent également en recevoir pour traiter la mucite buccale induite par la chimio, sous forme de bain de bouche¹²⁵. Les sels d'aluminium, comme le chlorhydrate d'aluminium, sont l'ingrédient actif des anti-transpirants^{126,127}. Il est suggéré que leur mode d'action implique le blocage des canaux sudoripares, ce qui empêche la transpiration de s'échapper sur la surface du corps, probablement par la formation d'un bouchon physique au sommet du canal sudoripare, composé d'une combinaison de sels précipités et de cellules endommagées¹²⁸. Cette action est si efficace que les anti-transpirants sont désormais largement utilisés en cosmétique. L'application topique d'un antitranspirant à base d'aluminium sur les aisselles entraîne un réservoir immédiat et élevé d'aluminium à la surface de la peau.

A la lumière de toutes ces informations nous avons élaboré un questionnaire en collaboration avec le service de Santé au Travail du CHU de Saint-Etienne qui nous servira pour évaluer l'exposition à l'aluminium de nos patients (Figure 13).

Impact aluminium	N° patient : _ _ _ _ Monogramme patient : _ _ _ _ _	Questionnaire 1/1
Exposition à l'aluminium et fertilité v3 13/03/2018		
Naissance		
1. Etes-vous né(e) prématurément (au moins 1 mois avant le terme prévu) ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
Environnement professionnel		
2. Exercez-vous une activité professionnelle ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • Si OUI, êtes-vous actuellement exposé(e) à l'aluminium dans votre environnement professionnel ? 		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/> ; NSP <input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • Quel est le nom de votre entreprise ? 	
<ul style="list-style-type: none"> • Dans quelle ville se situe-t-elle ? 		Code postal _ _ _ _ _ _ _ _ _
<ul style="list-style-type: none"> • Depuis quelle date travaillez-vous au sein de cette entreprise ? 		_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ (MM/AAAA)
<ul style="list-style-type: none"> • Quel est votre poste de travail actuel ? 	
Alimentation		
3. Buvez-vous quotidiennement de l'eau du robinet ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
4. Habituellement, mangez-vous des plats prêts à consommer (ou plats préparés) qu'ils soient frais, surgelés ou en conserve ?		<input type="checkbox"/> Tous les jours ou presque <input type="checkbox"/> Au moins 3 fois par semaine <input type="checkbox"/> Au moins une fois par semaine <input type="checkbox"/> Moins d'une fois par semaine
5. Habituellement, combien de fois mangez-vous du pain ou des biscottes ?		<input type="checkbox"/> 3 fois par jour ou plus <input type="checkbox"/> 2 fois par jour <input type="checkbox"/> 1 fois par jour <input type="checkbox"/> Moins d'une fois par jour
6. Habituellement, combien de fois mangez-vous des légumes (or pomme de terre) ?		<input type="checkbox"/> 3 fois par jour ou plus <input type="checkbox"/> 2 fois par jour <input type="checkbox"/> 1 fois par jour <input type="checkbox"/> Moins d'une fois par jour
7. Habituellement, buvez-vous régulièrement du thé ou des tisanes ?		<input type="checkbox"/> Tous les jours ou presque <input type="checkbox"/> Au moins 3 fois par semaine <input type="checkbox"/> Au moins une fois par semaine <input type="checkbox"/> Moins d'une fois par semaine
Tabac		
8. Etes-vous actuellement fumeur ou avez-vous déjà fumé ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • En quelle année avez-vous commencé ? 		_ _ _ _ _ _ _ _ _ (AAAA)
<ul style="list-style-type: none"> • Combien de cigarettes/jour fumez-vous ou avez-vous fumé ? 		_ _ _ _ /jour
<ul style="list-style-type: none"> • Fumez-vous toujours ? 		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
8.1. Si NON, En quelle année avez-vous arrêté ?		_ _ _ _ _ _ _ _ _ (AAAA)

Impact aluminium	N° patient : _ _ _ _ Monogramme patient : _ _ _ _ _	Questionnaire 1/1
Hygiène		
9. Utilisez-vous régulièrement (plusieurs fois par semaines) un déodorant ou un anti-transpirant ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • Si OUI, Savez-vous s'il contient de l'aluminium (chlorure d'aluminium, pierre d'alun...)? 		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/> ; NSP <input type="checkbox"/>
Traitement		
10. Parmi les pansements gastriques suivants, en avez-vous pris au moins une fois dans l'année qui s'est écoulée ?		Oui <input type="checkbox"/> ; Non <input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • Gastropulgite • Gelox • Maalox • Marga • Moxydar • Phosphalugel • Polysilane • Remielquo • Rozcel • Xolaam 		

Figure 13 : questionnaire d'évaluation de l'exposition à l'aluminium

8. Toxicité de l'aluminium

La question de la toxicité de l'aluminium ne date pas de notre ère, désignée par certains scientifiques comme « l'Age de l'aluminium »⁹¹. La question de la sécurité des métaux a été soulevée à plusieurs reprises et à différentes périodes, donnant lieu à des études et à des controverses scientifiques.

L'aluminium, même s'il n'existait pas encore sous forme métallique, était présent dans le débat scientifique pour des raisons scientifiques et intellectuelles, à travers son oxyde métallique, l'alumine. Théodore de Saussure, en 1801 et en 1804, a consacré de nombreuses pages soulignant la forte présence d'alumine dans les plantes. Cinquante ans plus tard les recherches ont démontré que l'alumine était abondante dans la terre et les plantes, et l'exposition humaine à ce élément est naturelle¹²⁹. A la fin des années 1890, des débats scientifiques discutaient de son innocuité ont eu lieu car la pureté de l'alliage n'était pas bien contrôlée. Des études chimiques ont été réalisées par des laboratoires civils et militaires, et des experts indépendants financés par les entreprises, en France et aux États-Unis ont été mandatés. Les conclusions de ces expertises n'ayant pas pu retrouver des preuves de toxicité de l'aluminium et le débat prit fin.

Une deuxième période sur la sécurité de l'aluminium a débuté dans les années 1970 avec les patients dialysés de Denver^{130,131} et s'est accentuée dans les années 1980 avec la maladie d'Alzheimer¹³². D'abord publiés dans des revues médicales, les travaux et hypothèses des chercheurs ont été rapidement repris par les revues de vulgarisation scientifique puis les magazines grand public et les quotidiens, ce qui a fait alimenter une peur collective de l'aluminium. Dans les années 1990, s'ouvre une troisième période où les questions de santé incluent les maladies professionnelles et la santé publique. Tout au long de ces années, se sont succédées des expertises, publiques et privées. Les fabricants ont dû élaborer des stratégies pour renforcer la confiance de leurs employés et de leurs consommateurs, la problématique est devenue définitivement mondiale, avec une approche plus large qu'au début du XXe siècle. La prise de conscience de la toxicité de l'aluminium a conduit à une augmentation spectaculaire des recherches chimiques et biomédicales sur cet ion métallique.

L'aluminium, malgré son abondance dans la nature, n'est pas un oligoélément contrairement à beaucoup d'autres métaux, et n'est pas connu pour être utile aux cellules vivantes. Sous sa forme soluble, il est toxique pour les plantes, et représente l'un des principaux responsables de la réduction des rendements agricoles¹³³. Au niveau des cellules eucaryotes, l'aluminium possède des propriétés mutagènes, pro-inflammatoires, immunogènes, excitotoxiques et pro-oxydantes¹³⁴ (Figure 14).

L'aluminium est un cation trivalent qui ne subit pas de modifications oxydo-réductives. De ce fait, il est lié à divers troubles associés à une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical superoxyde (O₂⁻). Bien que le mécanisme exact de la toxicité de l'aluminium ne soit pas complètement élucidé, différentes études suggèrent que l'aluminium pourrait potentialiser événements oxydatifs et inflammatoires entraînant des lésions tissulaires¹³⁵⁻¹³⁸. Il exerce ses effets néfastes sur différents organes, notamment le système nerveux^{139,140}, les muscles squelettiques¹⁴¹, le système respiratoire¹⁴², le système cardiovasculaire¹⁴³ et le système urogénital^{144,145}.

L'aluminium, sous forme de chlorure d'aluminium, s'est révélé être embryotoxique et tératogène lorsqu'il est administré par voie parentérale à des animaux¹⁴⁶. Ellis, McCarthy et Herrington ont montré que l'administration intrapéritonéale quotidienne d'aluminium à des rats entraînait une diminution de la minéralisation osseuse, avec une restauration de l'activité lorsque les injections d'aluminium étaient arrêtées¹⁴⁷. Des recherches récentes sur des modèles animaux et humains ont démontré son potentiel toxique, et sa participation au développement de plusieurs pathologies, telles que les troubles osseux, l'anémie et les maladies neurodégénératives dont Alzheimer, Parkinson et les encéphalopathies¹⁴⁸⁻¹⁵². L'aluminium semble capable d'induire des modifications conformationnelles de la protéine β -amyloïde favorisant son agrégation. Mantyh et *al.* ont démontré *in vitro* que l'aluminium favorise l'agrégation de cette protéine pour former une plaque insoluble¹⁵³.

En raison de son utilisation historique comme chélateur du phosphate chez les patients dialysés¹³¹, il a été démontré que l'aluminium pourrait être responsable de graves lésions neurologiques, d'ostéomalacie, et de fractures pathologiques en cas de forte exposition^{154,155}. La toxicité accrue de l'aluminium chez les patients dialysés est liée à une forte accumulation tissulaire de l'aluminium, renforcée par le manque de fonction rénale de ces patients, qui est la principale voie d'excrétion de l'Al¹⁵⁶.

Chez les bébés prématurés, les effets de la toxicité de l'aluminium sont connus depuis près de 30 ans. Bishop et al. ont pour la première fois attiré l'attention sur ce sujet avec un rapport sur un bébé prématuré décédé d'une intoxication à l'aluminium en 1989¹⁵⁷. Après ce premier rapport, les mêmes auteurs ont examiné un total de 277 bébés prématurés recevant une solution d'alimentation parentérale standard ou une solution à faible teneur en aluminium¹⁵⁷. Dans cette étude, les nourrissons ayant reçu une solution à haute teneur en aluminium avaient des scores inférieurs à l'indice de développement mental de Bayley effectué au 18e mois. À la lumière de ces analyses, Bishop et al. ont émis l'hypothèse que les nourrissons recevant une nutrition parentérale à haute teneur en aluminium perdraient 1 point par jour sur l'indice de développement mental de Bayley¹⁵⁸. L'année suivante, Stockhausen et al. ont signalé que des morbidités telles que le trouble borderline, la cholestase et l'ostéopénie étaient plus répandues chez les prématurés recevant une teneur élevée en aluminium¹⁵⁹. La publication de ces études, a incité la FDA à publier un rapport recommandant de limiter l'apport en aluminium à 5 µg/kg/jour et rendre obligatoire l'indication sur l'étiquette de la teneur en aluminium des produits parentéraux¹⁶⁰.

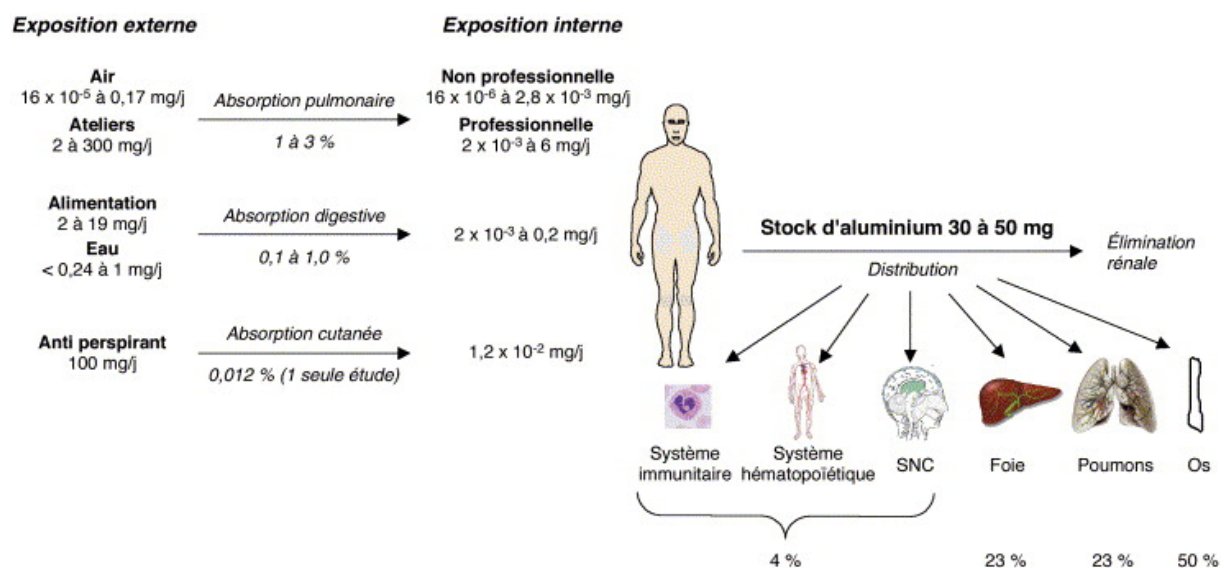


Figure 14 : L'aluminium possède des propriétés mutagènes, pro-inflammatoires, immunogènes, excitotoxiques¹⁶¹

En outre, plusieurs éléments de preuve soutiennent l'affirmation que l'aluminium est capable de provoquer un stress oxydatif à la fois en augmentant la génération d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) et en diminuant la capacité antioxydante du plasma sérial^{162,163}. Ce

mécanisme peut endommager les spermatozoïdes car ils sont très sensibles à l'exposition aux ROS en raison de leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés, les principaux composants des membranes cellulaires et intracellulaires.

IV. Aluminium et appareil reproducteur

Plusieurs études ont montré le potentiel dangereux de l'aluminium dans le développement et la physiologie du système reproducteur^{164,165}. Il a été démontré que l'aluminium se trouve en concentrations élevées dans le sperme¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. En 2014, au sein de notre équipe de recherche, le Dr Klein a montré que l'aluminium s'accumulait dans la tête des spermatozoïdes utilisant la coloration au Lumogallion¹⁶⁹. Or c'est dans la tête du spermatozoïde que l'on retrouve le noyau du spermatozoïde contenant son ADN.

Ces résultats nous ont encouragé à mener une revue systématique de la littérature scientifique afin d'évaluer l'impact de l'aluminium sur l'appareil reproducteur masculin. Beaucoup d'études ont été publiées ces dernières années sur ce sujet et notre travail a pour objectif d'en faire la synthèse. Dans la revue qui va suivre nous nous intéressons plus spécifiquement aux effets de l'aluminium sur les différents sites et voies physiologiques de l'appareil reproducteur masculin.

Revue systématique de la littérature :

Running Title: Review about aluminum and male fertility

A systematic review of the impact of aluminum on male fertility: separating fact from fiction

Mohamed Ghazi MD^{1,2}, Dimitrios Bitounis PhD², Michèle Cottier MD PhD^{1,2}, Jean-Philippe Klein MD PhD^{1,2}

1. Reproductive Biology department, University Hospital of Saint Etienne, Saint Etienne, France;
2. U1059, INSERM, SAINBIOSE, Univ Jean Monnet de Saint-Étienne, Mines Saint-Etienne, F-42270, France

Corresponding Author:

Jean-Philippe Klein

Reproductive Biology department, University Hospital of Saint Etienne, Saint Etienne, France
Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, Avenue Alber Raimond, 42270 Saint-Priest-en-Jarez, France
+33 4 77 82 83 07

jean.philippe.klein@univ-st-etienne.fr

Article Type: systematic review without meta-analysis

Funding statement: this work was funded by a grant from the Saint-Etienne University Hospital

Disclosure Statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

Attestation Statement:

- Data regarding any of the subjects in the study has not been previously published unless specified.
- Data will be made available to the editors of the journal for review or query upon request.

Word Count: 138 words for abstract and 7747 words for text

Capsule: This systematic review shows that aluminium has a small but consistent negative impact on male fertility and could participate to its decline throughout the world.

Abstract

Importance: Over the past fifty years, the concentration of sperm in men has been halved. The causes of this extreme decrease are not yet completely known.

Objective: In this systematic review, we take stock of the male environmental reprotoxicity of aluminum after birth.

Evidence review: We systematically screened the Medline database using the Pubmed search engine. A detailed analysis highlighted biases within many studies which required careful sorting of the available articles.

Findings: Overall, the literature revealed the existence of a limited but real toxicity of aluminum on the male reproductive system. In particular, it manifests as moderate alteration of the seminiferous epithelium causing a discreet yet significant reduction in the number of spermatozoa in the ejaculate. The mechanism of this toxicity could be the generation of oxidative stress at the testicular level, but there are not enough studies to confirm this hypothesis. On the other hand, aluminum does not seem to be an endocrine disruptor in testis.

Conclusion and relevance: Ultimately, aluminum could be one among many environmental toxicants contributing to the decline in male fertility observed throughout the world.

Keywords

Aluminium, environmental exposure, male fertility, reprotoxicity

Introduction

Between 1950 and 2013, aluminum production increased thirty-fold and is further expected to more than double by 2050¹⁷⁰. Expectedly, human exposure to aluminum, notably through food products, cosmetics, contamination of air and water and certain medicines (vaccines, gastric dressings, etc.) has never been so high and is expected to continue to increase.

However, aluminum is far from being an inert metal devoid of risks for human health. In fact, it has been associated with severe neurological damage, particularly due to its historical use as a phosphate chelator in dialysis patients or in the parenteral nutrition of newborns^{171–173}. Aluminum can also be the cause of immunological disorders, particularly in people vaccinated with aluminum-adjuvanted vaccines^{174,175}. Finally, aluminum has been implicated in the occurrence of osteomalacia in heavily exposed patients¹⁷⁶.

At the same time, a decrease in human fertility and particularly male fertility has been noted across the entire planet^{177–183}. It is even possible that this decline in fertility contributes to the decline in birth rates observed throughout the world¹⁸⁴. In this context, several research teams have focused on clarifying the potential impact of aluminum on male fertility.

The objective of this work is to—review the accumulated knowledge on the impact of environmental exposure to aluminum on men fertility. After having detailed the inclusion and exclusion criteria, we then present research results from cell-based, animal, and human epidemiological studies.

Material and methods

Studies identification

In order to conduct the most exhaustive and transparent review possible we have followed the reporting guidance for systematic reviews of clinical trials in health field: the PRISMA statement^{185,186}. We searched the Medline database through the Pubmed search engine using the following search equation (last query on January 13, 2023, with language filter set to French and English only):

```
("Aluminum"[Mesh] OR "Aluminum Compounds"[Mesh] OR "Aluminum"[TIAB] OR "Aluminium"[TIAB] ) AND ("Fertility"[Mesh] OR "Infertility, Male"[Mesh] OR "spermiotoxicity"[tiab] OR "reproductive disease "[tiab] OR "reproductive toxicity"[tiab] OR "testosterone"[MeSH Terms] OR "testosterone"[tiab] OR "testis"[MeSH Terms] OR "testis"[tiab] OR "spermatozoa"[MeSH Terms] OR "spermatozoa"[tiab] OR "sperm"[tiab] OR "semen"[MeSH Terms] OR "semen"[tiab] OR "leydig cells"[MeSH Terms] OR "leydig"[tiab] OR "sertoli cells"[MeSH Terms] OR "sertoli"[tiab] OR "germ cells"[MeSH Terms] OR "germ cells"[tiab] OR "germ cell"[tiab] OR "Semen Analysis"[Mesh] OR "Spermatogenesis"[Mesh] OR "Spermatogenesis"[tiab]) Filters: English, French Sort by: Most Recent
```

Inclusion and Exclusion criteria

From the obtained search results, studies which did not contribute to meeting our objective were then excluded. In particular, studies were excluded if they did not deal with the reprotoxicity of aluminum, were not performed on mammalian animal models, only dealt with the female reprotoxicity of aluminum, or only considered in utero exposure. The exposure of mothers to environmental toxicants can be the cause of significant reprotoxicity¹⁸⁷, however the mechanisms involved are probably very different from the mechanisms involved in born individuals, thus requiring a dedicated analysis.

Quality and bias assessment

The quality of the various articles and their possible biases were evaluated by two authors independently (M. Ghazi and JP. Klein) through the following points: presence of all essential information to understand the study (number of subjects studied, form of aluminum used, route and duration of exposure, dose), plausibility of the results in relation to male reproductive physiology, moderation in the interpretation of results, and overall quality of the manuscript. In case of doubts about the reported results, a trustworthiness questionnaire was applied.

Results

Eligible studies following literature research

A total of 373 articles were identified from our PubMed database search (Figure 15). After screening the titles and abstracts of these articles, 96 were determined eligible for full text review. Later, we searched for documents that cited any of the initially included studies as well as their references. Eight (8) more articles that fulfilled the above-stated inclusion criteria were found in these searches.

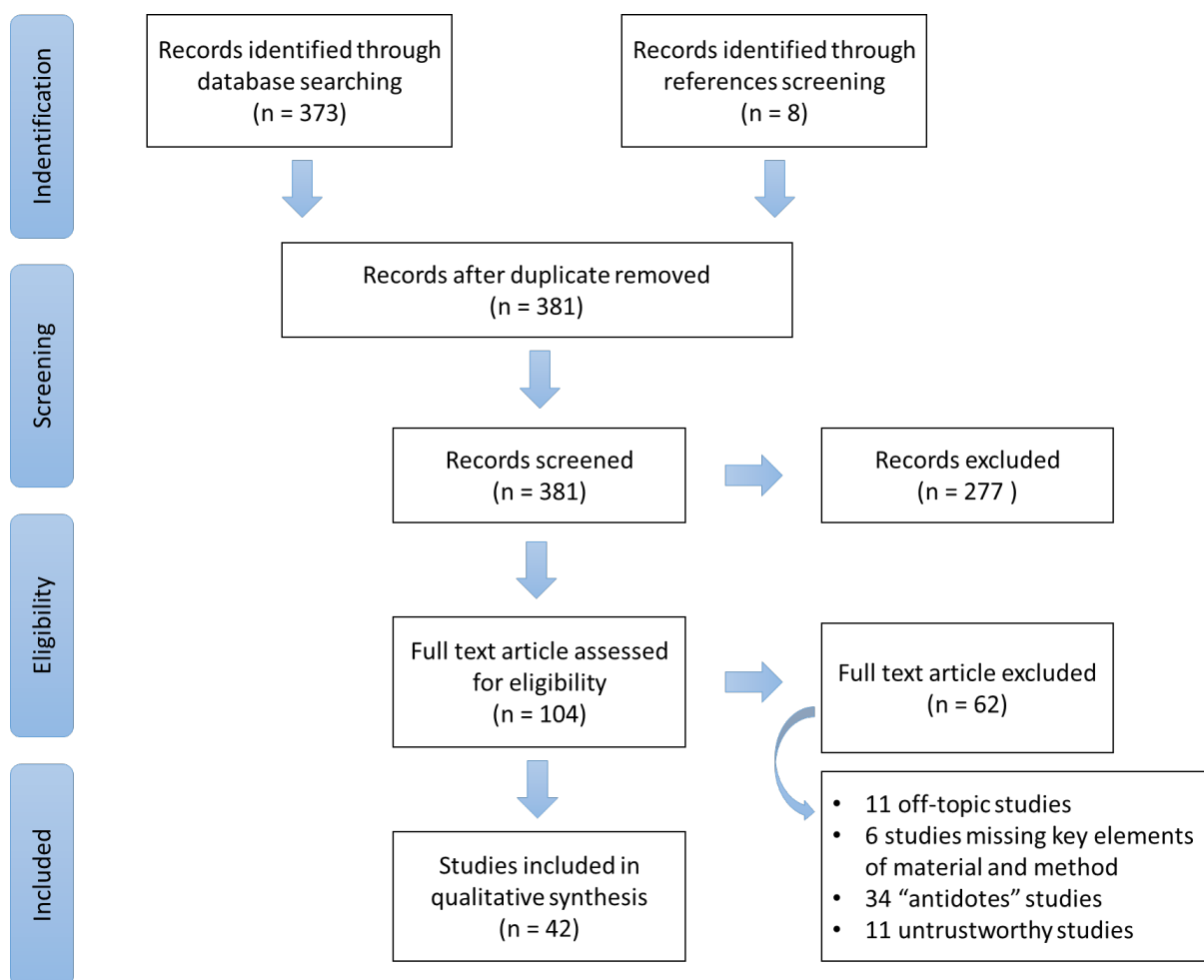


Figure 15 : The PRISMA diagram details the search and selection process applied during the review.

Eventually, 104 studies underwent independent, in-depth, full text analysis by two authors (M. Ghazi and JP. Klein). The first observation we made was that a high number of articles showed questionable results. Unlike the previous review of the literature on the subject carried out by Yokel¹⁸⁸, which took the postulate of not excluding any article on the basis of its quality, we chose to drastically exclude any article which presented possible bias or unreliable results. Specifically, out of the 104 studies retained on the basis of their title and abstract, 11 were excluded because they fell outside the subject of this review, two of which were due to a purely in utero exposure model. Six (6) studies were excluded because they were missing key elements of the materials and methods necessary to fully understand the results. Thirty-four (34) studies were excluded due to a particular construction that we called “antidote” studies; the precise reasons for these exclusions are detailed below. Finally, 11 studies were excluded for untrustworthy results, again, the reasons for these exclusions are detailed below.

Ultimately, this review was based on the results of the remaining 42 studies, the conclusions of which were synthesized and reported here.

Exclusion criterion: “antidote” studies

We excluded several animal studies, as well as one study on a human sperm model which were designed to include a control group, a group exposed to aluminum, and a group exposed to both aluminum and a compound. The latter would usually be an antioxidant, hypothesized to counterbalance the deleterious effects of aluminum. This experimental design was applied in 34 studies, all of which concluded that aluminum toxicity is more or less significantly elevated for the majority of the parameters studied. Curiously, the toxicity reported in these articles was significantly higher than that found in other articles that were not built on this model.

We chose to exclude this experimental design because we believe that it introduces interpretation and publication biases, leading to an overestimation of the reprotoxicity of aluminum. Indeed, to test the effectiveness of an “antidote” to aluminum reprotoxicity or to understand its potential mechanism, such toxicity must first be proven. It is therefore required for an article constructed in this way to first assume significant aluminum reprotoxicity. And these articles, invariably found the reprotoxicity of aluminum to be systematically significant and often very large. It has to be noted that this type of study is entirely valid to explore toxicity mechanisms or means to counter it. But the purpose of this review was above all to identify clear evidence for the existence of aluminum male reproductive toxicity. It is also notable that these articles most often come from publishing groups whose publications are regularly described as ‘problematic’ or ‘untrustworthy’¹⁸⁹. Finally, among these articles, many present inconsistent results that are not acknowledged let alone discussed by the authors. What is more, results are sometimes contradictory to each other and/or to what is known about male genital physiology, without these contradictions being discussed, attesting an insufficient understanding of the male genital tract physiology at best or erroneous results, at worst.

As an example, let’s consider the article by Behairy et al. which studies the impact of exposure to nanoparticles of aluminum trioxide and/or lead acetate on the functioning of the genital tract of male rats and the potential protective effect of quercetin¹⁹⁰. In this article the authors find a strong reduction in testicular weight in exposed rats (2.03 to 1.10 g which corresponds to a reduction of 46%) against a comparatively moderate reduction in the number of

spermatozoa (75.0 to 40.3 M/ml which corresponds also at a decrease of 46%). However, we know that in a man exposed to a reprotoxic agent, such as during chemotherapy, a halving of testicular volume corresponds to the complete disappearance of germ cells in the testicle, which clinically results in azoospermia¹⁹¹. The unexpected maintenance of significant spermatogenesis despite such a reduction in testicular volume is however not discussed by the authors. In the same study, the authors find a reduction in testosterone levels and spermatogenesis which they attribute to testicular toxicity of the metals studied as evidenced by their accumulation in the testicle and the measurement of local oxidative stress. In such a situation, the reduction in negative feedback exerted on the hypothalamic-pituitary axis should be the cause of an increase in circulating LH and FSH, but it is a decrease in these hormones that is observed. This type of observation going against the physiology of the male genital tract is highly improbable and should be pointed by the authors, which is not the case. Finally, still in the study by Behairy et al., the authors carried out immunohistochemical marking of the androgen receptor. The images show essentially cytoplasmic staining, but the androgen receptor is, like all steroid hormone receptors, a nuclear receptor¹⁹². This is not discussed by the authors either.

The point here is not to specifically criticize the study by Behairy et al., but to give an example of the problems encountered in this type of article. However, it would take too long to detail them for all the studies, which is why only the study by Behairy et al. is discussed in detail here. Ultimately these 34 studies were excluded from this review.

Exclusion criterion: untrustworthy studies

Other articles were not constructed on the model described above but still presented with credibility issues. Indeed, in a certain number of articles, it was surprising to see a perfect match between the reported results and the authors' initial hypotheses. We considered these results to be suspiciously good and therefore performed the REAPPRAISED test described by Gray et al.¹⁹³ to decide whether to include them or not. The results of this test are shown in Table 1.

Table 1 : Results of the REAPPRAISED test described by Gray et al.¹⁹³ for the 13 studied for which a doubt about their honesty was present. UR: Unrealized.

	Akinola et al. 2015	Bataineh et al. 1998	Da Silva Lima et al. 2022	Guo et al. 2001, 2002, 2005, 2006	Gupta et al. 2021	Sun et al. 2011, 2017; Zhu et al. 2014 and Liu et al. 2022
Research governance						
Are the locations where the research took place specified, and is this information plausible?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Is a funding source reported?	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Ethics						
Is there evidence that the work has been approved by a specific, recognized committee?	No	No	Yes	No	No	No
Are there any concerns about unethical practice?	No	No	No	Yes	No	No
Authorship						
Do all authors meet criteria for authorship?	UR	UR	UR	UR	UR	UR
Are contributorship statements present?	No	No	No	No	No	No
Are contributorship statements complete?	No	No	No	No	No	No
Is authorship of related papers consistent?	UR	UR	UR	Yes	UR	Yes
Productivity						
Is the volume of work reported by research group plausible, including that indicated by concurrent studies from the same group?	Yes	Yes	Yes	Hardly	No	Yes
Is the reported staffing adequate for the study conduct as reported?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Plagiarism						
Is there evidence of copied work?	No	No	No	No	No	No
Is there evidence of text recycling (cutting and pasting text between papers), including text that is inconsistent with the study?	No	No	No	No	No	No
Research conduct						
Do the numbers of animals purchased and housed align with numbers in the publication?	UR	UR	UR	UR	UR	UR
Is the interval between study completion and manuscript submission plausible?	UR	UR	UR	UR	UR	UR
Could the study plausibly be completed as described?	Yes	Yes	Yes	Hardly	Hardly	Yes
Analyses and methods						
Are the study methods plausible, at the location specified?	Yes	Yes	Yes	Yes	Maybe	Yes
Have the correct analyses been undertaken and reported?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Is there evidence of poor methodology, including:	No	No	No	Yes	Yes	Yes
Missing data	No	No	No	No	No	No
Inappropriate data handling	No	No	No	No	No	No
'P-hacking': biased or selective analyses that promote fragile results	No	No	No	No	No	No
Other unacknowledged multiple statistical testing	No	No	No	No	No	No
Is there outcome switching — that is, do the analysis and discussion focus on measures other than those specified in registered analysis plans?	No	No	No	No	No	No
Image manipulation						
Is there evidence of manipulation or duplication of images?	No	No	No	No	Yes	No
Statistics and data						
Are any data impossible?	Yes	No	No	No	Yes	No
Are subgroup means incompatible with those for the whole cohort?	No	No	No	No	No	No
Are the reported summary data compatible with the reported range?	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Are the summary outcome data identical across study groups?	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Are there any discrepancies between data reported in figures, tables and text?	No	No	No	No	No	No
Are statistical test results compatible with reported data?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Are any data implausible?	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes
Are any of the baseline data excessively similar or different between randomized groups?	UR	No	No	No	UR	No
Are any of the outcome data unexpected outliers?	No	No	No	No	No	No
Are the frequencies of the outcomes unusual?	No	No	No	Yes	Yes	Yes

<i>Are any data outside the expected range for sex, age or disease?</i>	No	No	No	No	Yes	No
<i>Are there any discrepancies between the values for percentage and absolute change?</i>	No	No	No	No	No	No
<i>Are the variances in biological variables surprisingly consistent over time?</i>	Yes	No	No	Yes	No	Yes
Errors						
<i>Are correct units reported?</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Are numbers of participants correct and consistent throughout the publication?</i>	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
<i>Are calculations of proportions and percentages correct?</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Are results internally consistent?</i>	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Are the results of statistical testing internally consistent and plausible?</i>	No	Yes	Yes	No	Yes	No
<i>Are other data errors present?</i>	Yes	No	No	No	Yes	No
<i>Are there typographical errors?</i>	No	No	No	No	Yes	Yes
Data duplication and reporting						
<i>Have the data been published elsewhere?</i>	No	No	No	No	No	No
<i>Is any duplicate reporting acknowledged or explained?</i>	No	No	No	No	No	No
<i>How many data are duplicate reported?</i>	0	0	Weight	0	0	0
<i>Are duplicate-reported data consistent between publications?</i>	UR	UR	Yes	No	UR	UR
<i>Are relevant methods consistent between publications?</i>	UR	UR	Yes	Yes	UR	Yes
<i>Is there evidence of duplication of figures?</i>	No	No	No	No	Yes	No
Final Decision	Excluded	Included	Included	Excluded	Excluded	Excluded

In the end, of the 13 articles tested, only 2 were retained^{194,195} while 11 were excluded from this review. The main reasons for these exclusions are as follows: the article by Akinola et al. was excluded due to unrealistically small standard deviations observed on sperm motility measurements¹⁹⁶. Given the number of rats and the measurement method, such standard deviations are simply impossible. Several studies by Guo et al. were similarly excluded, as multiple endpoints presented very low standard deviations in comparison to what is usually observed for similar data in other studies (mouse weight, testicular weight, hormonal dosages) which made them similarly highly improbable^{197–201}. Furthermore, the low quality of the histological images casts significant doubt on the accuracy of the reported morphological analyses. Regarding the article by Gupta et al.,²⁰² certain data are physiologically impossible to occur, such as the combination of 80% sperm mobility with only 40% vitality in the control group, suggesting that some dead sperm cell could move. Furthermore, proof of data falsification is provided in Figure 7 which presents images from histological sections of rats testis after exposure to different metals. Very clearly, the images presented for the control group, the group exposed to zinc, and the group co-exposed to aluminum and zinc come from the same section and, therefore, from the same rat. Regarding the articles by Liu et al., Sun et al., and Zhu et al.^{203–206}, the uncharacteristically low standard deviations for testicular weight compared to what is usually observed in other studies, make these measurements highly

improbable and led to their dismissal. Finally, the low quality of the histological images makes it impossible to control results which are physiologically very improbable.

Mature sperm model studies (Ex Vivo Studies)

Only two studies on cellular models were included in this review. The first is the study by Kaur et al. which tests the penetration of bovine mucus by human spermatozoa after exposure of the first to aluminum chloride at doses of up to 200 μM for 0 to 60 minutes before contact and then two hours afterwards²⁰⁷. A reduction in the penetration of mucus by spermatozoa was found compared to the control regardless of the dose of aluminum chloride or the duration of exposure. It is difficult to extrapolate the results of this study because it is likely that the toxicity exerted by aluminum is more on the quality of the cervical mucus than directly on the spermatozoa.

The second study is that of Kesserü and Leon which evaluates the impact of bringing human spermatozoa into contact with aluminum slides²⁰⁸. They note a moderate decrease in sperm mobility after five hours of exposure.

Ultimately, when it comes to mature sperm models, the information provided by these two studies is quite limited. The sperm is a cell with a short lifespan and which is not informative enough to assess environmental toxicity. Studies on developing germ cell models would provide much greater information to understand the possible mechanisms of aluminum reprotoxicity.

Animal model studies (In Vivo Studies)

Testicular biodistribution and biopersistence of aluminum

One of the first hypotheses put forward by authors interested in the male reproductive toxicity of aluminum is its capacity to interfere with the normal functioning of the testis through a direct toxicity mechanism. For such a hypothesis to be valid, it must be shown that aluminum can reach the testis according to the exposure route.

Among the studies selected, only five assessed this point. Each of these studies used different animal models (mouse, rat, rabbit), different forms of aluminum (aluminum chloride, aluminum nitrate, aluminum lactate and aluminum oxide), different exposure routes (oral, intravenous, intraperitoneal, aluminum disc implant), different doses up to 200 mg/kg/day and different exposure durations ranging from 6 hours to 6 months.

In total, only the study by Yokel and McNamara did not find testicular distribution of injected aluminum²⁰⁹. More than the intravenous exposure route or the dose, 600 $\mu\text{mol/kg}$ of

aluminum lactate, the authors attribute this absence of testicular distribution to the extremely short duration of exposure (6 hours). In the study by Liu and Stemmer, which exposed prepubertal rats to aluminum orally for 10 weeks, they found that the increase in aluminum concentration only reached significance for a diet depleted of Cu, as if there was a competition for the absorption of these two elements²¹⁰. In general, the liver seems to be the organ of choice for the distribution of aluminum^{209,211}. When a testicular distribution is observed, we calculated, when possible, the fraction of the injected aluminum reaching the testis: this is relatively low, ranging from 6×10^{-5} to 7×10^{-8} of the injected dose^{212,213}.

Ultimately, all the authors agree that the testis is not an organ in which the distribution of aluminum is particularly high. However, due to the low elimination capacity of this organ, chronic exposure could be the cause of a significant accumulation capable of causing local toxicity. However, the current literature does not yet confirm this hypothesis.

Biotoxicity

Through all the animal studies carried out on the subject, different markers of aluminum reprotoxicity have been evaluated. We studied them one by one by comparing the results reported in the studies included in this review.

Testis weight

The evolution of testicular weight is a simple marker which demonstrates a significant impact of the toxicant considered on spermatogenesis. Thus, even a modest reduction in testicular weight is generally synonymous with a strong alteration of spermatogenesis and therefore of the reproductive capacity of the individual.

Of all the studies included in this review, 15 measured testicular weight. Among them, ten found no variation in testicular weight^{213–221,210}. Four found a moderate decrease in testicular weight parallel to a decrease in body weight^{194,212,222,223}. It is surprising to note that these four studies emphasize the concomitant reduction in testicular weight and body weight because in men, low body weight is not correlated with reduced testicular volume²²⁴. That said, no clear explanation emerges from the detailed comparison of the studies from these two groups since overall, the animal models, the shape of the aluminum, the exposure route and the doses are very different both in the studies finding a reduction in testicular weight and in others. For example, the study by Bataineh et al.¹⁹⁴ which found the most significant reduction in testicular weight among the four aforementioned studies presents a very similar protocol (aluminum chloride at high dose orally) to the study by Miska-Schramm et al.²¹⁸ which finds

no reduction in testicular weight. It is thus possible to imagine that the testis sampling protocol is different between the studies which found a drop in testicular weight and the others, the former having been able to have a larger sample including a little adipose tissue which would explain the parallel evolution with body weight. This is probably particularly true for the study by Mouro et al. which subsequently finds no alteration in testicular histology thus proving that, in this case at least, the observed reduction in testicular weight is not linked to an abnormality in its functioning²²².

A final study, that of Kamboj and Kar, exposing male rats to an intra-testicular injection of aluminum sulfate at 0.08 mmol/kg, noted a reduction in testicular weight by half seven days after the injection²²⁵. The intra-testicular exposure route is most likely responsible for this observation. This result is therefore difficult to extrapolate as the chosen exposure route is not representative of classic exposure to aluminum.

Ultimately, it seems reasonable to conclude that, in the majority of cases, in adults, exposure to aluminum, even at high doses or for long periods, is not responsible for sufficient damage to spermatogenesis or testis integrity to be the cause of a significant drop in testicular weight.

Testicular histology

Of all the studies included in this review, 12 analyzed the evolution of the testicle histological appearance after exposure to aluminum. As any alteration of spermatogenesis leading to male fertility is associated to testis histological abnormalities²²⁶, it is therefore important to look for them.

Among these 12 studies, only three presenting very variable doses, routes and durations of exposure did not find any histological abnormality^{211,215,222}. It should be noted that the study by Liu and Stemmer even reports that aluminum tends to reduce the severity of histological alterations caused by a Zinc deficiency²²⁷. Of the nine studies which found histological abnormalities, four showed no image^{218,223,225,227}. This is all the more annoying since two of them are among the three studies that found a relatively significant alteration of testicular histology. These are the study of Kamboj and Kar²²⁵ but for which we have already seen that the particular route of exposure, namely intra-testicular injections, did not allow a real extrapolation of the results; the study by Llobet et al.²¹² which also found a relatively significant drop in testicular volume and the study by Miska-Schramm et al.²¹⁸. It should be noted that this last study was carried out on four-week-old voles while the sexual maturity of

male voles is occurring between 6 and 8 weeks. This pre-pubertal period could constitute a period of fragility and partly explain the more severe anomalies found in this study.

For the six other studies^{213,217,223,227-229}, the anomalies described and which are corroborated by the images when they are present are essentially a slight disorganization of the seminiferous tubes, the presence of immature cells in the lumen of the tubes and a reduction in the number of apical spermatozoa. These descriptions correspond to scores 8 and 9 of the Johnsen classification²²⁶, which are usually associated with moderate impairment of spermatogenesis, a moderate decrease in the number of sperm in the ejaculate and little or no impact on the reproductive capacity of the individual.

These histological results are consistent with the observations made on testicular weight. Indeed, the reduction in the number of germ cells after exposure to aluminum does not seem substantial, so no perceptible drop in testicular volume is expected.

Oxidative stress

One of the ways by which aluminum can exert its toxicity is the generation of intracellular oxidative stress. Indeed, it has been shown in a cellular model that aluminum can cause a disruption of iron metabolism and increase the bioavailability of free intracellular iron from iron-containing enzymes²³⁰. This can in turn generate free radicals leading to various harmful consequences for the cell.

As a result, four studies among those selected attempted to evaluate oxidative stress at the testicular level as an indicator of aluminum toxicity. Only the study by Chaitanya et al. who worked on a small dose (10 mg/kg/day), a short period of oral exposure (four weeks) and only five rats found no impact of exposure to aluminum on the studied markers: superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, lipid peroxidation level²³¹. The three other studies also worked on relatively low doses (8.3 to 100 mg/kg/day of aluminum chloride or nitrate), short exposure periods (14 to 60 days), orally or intraperitoneally, and they all found an alteration of most of the studied markers: decrease in catalase, increase Reactive Oxygen Species (ROS) measured by the Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) test, increase in malondialdehyde (MDA), increase in lipid peroxidation and proteins peroxidation; on the other hand, no variation in the activity of testicular SOD or glutathione (GSH) was observed^{213,217,220}. Finally, we can also note that Wang et al. study attempted to evaluate the protective effect of aluminum at a dose of 0.1 mg/kg/day on the testis in adult male rats exposed to sodium fluoride orally at a dose of 1 to

3 mg/kg/day for 90 days²³². They note for only one of the three groups that aluminum significantly limits the increase in oxidative stress measured by MDA and hydrogen peroxide (H₂O₂) dosage. Although this effect contradicts previous observations, it is nevertheless very limited and very inconsistent.

In view of these results, it is possible to hypothesize that aluminum could lead to an increase in oxidative stress at the testicular level. However, the small number of studies allows us neither to confirm this nor to make this mechanism the main cause of the histological damage reported above.

Hormonal regulation

From fetal life to adulthood, the hormonal regulation of the male reproductive system can be the target of chemical agents causing its dysfunction²³³. They are called endocrine disruptors. Among the studies included in this review, seven evaluated the capacity of aluminum to act as an endocrine disruptor.

Exposure of guinea pigs to a dose of approximately 30 to 60 mg/day of aluminum chloride in drinking water for 13 weeks did not find any significant alteration of testosterone when compared to the control nor any reduction in the expression of StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein)²²⁸. Similarly, exposure of male rats from their first day and for 90 days to aluminum chloride in drinking water at a dose of 4476 mg/l found no variation in LH and FSH levels compared to the control²¹⁵. The same goes for exposure of prepubertal rats to aluminum orally for 10 weeks with no significant impairment of testosterone synthesis, LH or FSH²¹⁰. It should be noted that a concomitant Cu-depleted diet leads to a significant reduction in serum testosterone which is not present in the case of a Cu-depleted diet in the absence of aluminum.

Gomes et al. and Leal et al., respectively exposing male gerbils at birth or male rats during puberty to aluminum chloride orally or intraperitoneally, each found a very discreet and non-significant increase in testosterone compared to the control^{216,234}. Exposure of adult male rats to a cumulative dose of 28 mg/kg of aluminum nitrate over 7 injections intraperitoneally every other day for two weeks reports a significant increase of unconjugated testosterone increasing from 5.5 ng/ml for the control group to 8.2 ng/ml for the exposed group²³⁵.

Finally, exposure of adult male rats to doses (in aluminum ion) of aluminum chloride ranging from 6.7×10^{-5} to 40 mg/kg/day for 112 days orally finds a significant and equivalent decrease in testosterone in all groups compared to the control which is associated with a slight ultra-

structural alteration of Leydig cells in electron microscopy²²². Note that according to the review by Yokel et al. the dose of aluminum from food is already 10 mg/kg/day on average in rats, making pointless the two lowest doses in this study and making it difficult to explain the significant drop in testosterone observed in these groups¹⁸⁸.

Ultimately, the modest and rather discordant results reported by these different studies do not really suggest that aluminum could have an endocrine disrupting effect. However, these studies are few and others should continue to explore this possibility.

Semen parameters

Ultimately, male fertility occurs through semen and spermatozoa quality. The study of semen parameters is therefore a key element in understanding the impact of aluminum on male fertility. Among the semen parameters studied in human, namely the number of spermatozoa in the ejaculate, the vitality and mobility of spermatozoa and the percentage of abnormal forms, the most representative of the quality of spermatogenesis and the best correlated with fertility is the number of sperm in the ejaculate.

Thus, among the studies included in this review, nine evaluated the impact of aluminum on semen parameters and in particular on the quantity of sperm produced (measurement of the number of epididymal sperm). Three studies found no reduction in the quantity of epididymal sperm. This was the study by Dong et al exposing guinea pigs to a dose of 30 to 60 mg/kg/day of aluminum chloride in drinking water for 13 weeks²²⁸, the study by Hirata-Koizumi et al exposing adult male rats to a dose of up to 44.2 mg/kg/day of ammonium aluminum sulfate in drinking water for 10 weeks²²¹ and from the Maghraoui study et al exposing adult male rats to the cumulative dose of 28 mg/kg of aluminum nitrate over 7 injections intraperitoneally every other day for two weeks²³⁵.

The six other studies^{212-214,218,219,222} found a moderate but significant reduction in the quantity of epididymal spermatozoa, usually around 25% with a maximum for the study by Miska-Schramm et al exposing male voles aged 4 weeks to a dose of up to 100 mg/kg/day (in aluminum equivalent) of aluminum chloride for 12 weeks orally²¹⁸. Once again, the particularity of this study compared to others is that it begins its exposure during the pre-pubertal period, which can increase its impact.

Such a reduction in the number of produced spermatozoa is perfectly compatible with the minor histological alterations identified in the testicular sections. However, due to their low

importance, they should not have a visible impact on the reproductive capacities of males exposed to aluminum.

Reproductive capacity

Among the seven studies evaluating the reproductive capacities of males exposed to aluminum, five found no impact on their sexual behavior, the number of females fertilized, the number of offspring obtained, their state of health or sex-ratio^{215,219,221,236,237}.

Only the studies by Bataineh et al. and Llobet et al. found a reduction in sexual behavior causing a reduction in fertilization of females brought into contact with exposed males compared to the control group^{194,212}. However, when the females are fertilized, the number of young obtained is the same as in the control group. In addition, these two studies found a significant reduction in the body weight of males exposed to aluminum, suggesting that the impact of aluminum toxicity is more on the general condition of the animal than specifically on the reproductive system.

Other organs of the male genital tract

Several studies have also focused on other organs of the male reproductive system. Although their role is less crucial than the testis, their dysfunction can alter the reproductive capacities of individuals but also be a sign of endocrine disruption.

The most studied organ, apart from the testis, is the prostate, in particular by the Da Silva Lima team which published three articles on the subject^{195,216,217}. Each time they exposed male gerbils to a dose of 10 mg/kg/day of aluminum chloride for 30 days orally. They do not observe any change in the weight of the prostate but a moderate alteration of its histology with a thickening of the glandular epithelium indicating its hyperactivation. A histological increase in cell proliferation is also noted, confirmed by overexpression of PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen). They believe that the cause of these changes is an overexpression of the androgen receptor which they observe in immunohistochemistry without proposing an explanation of the mechanism by which aluminum causes this overexpression.

Conversely, the study by Leal et al. exposing male rats to aluminum chloride intraperitoneally at doses of 7 mg/kg/day or 34 mg/kg/day between the 36th and 66th day of their development, which includes puberty, note a stability of the weight of the prostate but a slight and significant decrease in the glandular tissue/stroma ratio, a slight and significant increase in the marking of polynuclear neutrophils evidenced by Myeloperoxidase (MPO) staining and a slight reduction in the number of androgen receptors in the 34 mg/kg/day group²³⁴. They

also did not note any difference in cell proliferation markers. Given the similarity of the protocols with the studies of the Da Silva Lima team, the only explanation for this divergence we can think of is the intra-peritoneal exposure which leads to a higher bioavailability of aluminum, the direct toxicity on the prostate tissue exceeding in this case, its endocrine disrupting activity.

Signs of this toxicity are also found in the study by Martinez et al. which exposed adult male rats to a cumulative dose of 28 mg/kg of aluminum nitrate over 7 injections intraperitoneally every other day for two weeks and which noted a significant reduction in prostate weight²²⁹. A possible explanation for this prostatic toxicity would be the generation of local oxidative stress by aluminum since the authors note an increase in ROS measured by DCFH-DA and in lipid peroxidation measured by MDA. Likewise, Da Silva Lima's team also noted a significant reduction in catalase and SOD activity compared to the control.

The epididymis has also been studied. Among the six studies that focused on this organ, four found no alteration in weight or histology^{213,218,229,235}. The study by Mouro et al exposing adult male rats for 112 days to aluminum chloride orally found a reduction in epididymal weight from a dose of 10 mg/kg/d (in aluminum equivalent) which they associated with a decrease in sperm count²²². Likewise, the work of Bataineh et al. exposing adult male rats to a dose of approximately 220 mg/kg/day of aluminum chloride orally, found a reduction in epididymal weight, concomitant with a significant reduction in body weight, compared to the control group¹⁹⁴. Here again, the mechanism could be an increase in oxidative stress highlighted in the study by Martinez et al. by an increase in ROS measured by DCFH-DA and an increase in lipid peroxidation revealed by MDA.

The three studies which focused on the seminal vesicles found neither variation in weight nor histological alteration^{218,229,235}.

Finally, the study by Liu and Stemmer, which exposed male rats to aluminum in the diet at a dose of 1000 ppm for 120 days, found no histological damage to the pituitary gland²²⁷. This result is consistent with an absence of disruption of the hypothalamic-pituitary axis by aluminum as described above.

Ultimately, analyzes of other organs of the male reproductive system find either no alterations or minor alterations which probably do not have a notable impact on reproductive function. However, the existence of such alterations, even minimally, suggests that exposure to aluminum is not completely harmless for reproductive health.

Epidemiological studies

Animal studies are not sufficient to establish the reprotoxicity of an environmental pollutant. They must be supplemented by epidemiological studies because it is never certain that the observation of toxicity in animals can be transposed to humans but especially the absence of this toxicity in animals does not guarantee safety in humans. In the case of aluminum, we were surprised to see that the few epidemiological studies carried out on this subject provide an overview of the male reproductive toxicity of aluminum quite similar to animal studies.

The two post mortem studies by Reusche et al. were interested in the biodistribution and biopersistence of aluminum. The first was carried out on 12 patients (8 men) on dialysis with DAE (Dialysis-Associated Encephalopathy), 20 dialysis patients without DAE and 5 non-dialysis patients²³⁸. After silver staining of the testis and analysis by electron microscopy associated with LAMMA (Laser Microprobe Mass Analysis), the authors found significant testicular deposits of aluminum in the seminiferous tubes, in particular in the Sertoli cells, and in the Leydig cells of patients with DAE compared to all others. It is obvious that patients suffering from DAE had much higher exposure to aluminum than the environmental exposures faced by the majority of the population, but such a result nevertheless confirms the capacity of aluminum to deposit and accumulate within the human testis. Two years later, the same team carried out a second study, this time focusing on patients with chronic renal failure and dialysis patients receiving large quantities of oral aluminum to control phosphoremia or gastric pain²³⁹. They show, again, an accumulation of aluminum in the seminiferous tubules and the cytoplasm of Leydig cells; the longer the duration of dialysis and the higher the ingested quantity of aluminum, the larger aluminum accumulation is. This second study confirms that not only can aluminum accumulate within the testis in human but that it can do so from oral exposure.

Several studies then attempted to relate the quantity of aluminum in semen to spermogram abnormalities. Thus, in one of our previous studies, carried out on 62 patients consulting for a spermogram, we found a higher aluminum concentration in the sperm of patients who present oligozoospermia compared to others²⁴⁰. Some studies have not sought or found a link with the number of spermatozoa in the ejaculate but have found a link with other sperm parameters. Thus, in the study by Hovatta et al, carried out on employees of two factories, a refinery and a polyethylene factory, and 45 healthy donors, they measured the aluminum level by Atomic Absorption Spectrophotometry (AASP) in the seminal plasma and the spermatic

pellet. They found a correlation between the aluminum present in the sperm fraction and the motility as well as the morphology of the spermatozoa²⁴¹. Likewise, in the study by Dawson et al, carried out on 64 healthy donors, the quantity of aluminum in seminal plasma measured by AASP was significantly higher in asthenozoospermic patients²⁴². It should be noted that in the studies by Rodriguez et al on a model similar to the previous ones, no link was found between the aluminum concentration in seminal plasma and sperm parameters or the success of in vitro fertilization^{243,244}.

Another interesting element that emerges from these studies is the accumulation of aluminum within sperm. Indeed, we have shown by using Lumogallion staining that aluminum tends to accumulate in sperm head²⁴⁰. In addition, Ali et al study carried out on 64 donors with normal spermogram and 30 donors presenting at least one altered sperm characteristics, shows using an ICP-MS assay in sperm DNA that aluminum is the only element (along with Zinc whose presence is physiological) to be found almost systematically in spermatid DNA even though it is not always detected in semen²⁴⁵. Here too, the quantity of aluminum is significantly higher in sperm DNA in patients with oligozoospermia or teratozoospermia, while no such differences emerged for any of the other 14 elements tested in this study. However, the study by Wang et al who attempted to determine the impact of aluminum on the integrity of spermatid DNA on 1052 patients consulting for a spermogram found no correlation between the aluminum measured in the urine and sperm DNA integrity measured by an annexin V test or sperm DNA fragmentation measured by a COMET assay²⁴⁶. Of course, the fact that the measurement of aluminum was done in urine limits this result significance.

It is also interesting to note that in all these studies, the quantity of aluminum observed in semen is relatively high, up to several mg per liter of semen, which is well beyond the values usually found in other body fluids²⁴⁷. But does the presence of aluminum in semen really reflect environmental exposure to aluminum? The studies by Dawson et al., Hovatta et al. and Rodriguez et al. attempted to answer this question by evaluating the quantity of aluminum in the semen of patients occupationally exposed to aluminum compared to subjects who were apparently not exposed. If certain jobs did indeed result in a semen concentration of aluminum higher than control subjects: employed in a metal foundry, or in a refinery; others like employee in chemical or polyethylene factories gave a result against expectations with spermatid aluminum levels that were lower than control subjects^{241,248}. The place of residence

also seems to be linked to the spermatic quantity of aluminum but not the consumption of tobacco, alcohol or obesity²⁴⁴.

Discussion

Before answering the question “what is the impact of aluminum on male fertility?” » one observation is clear: the literature shows a large amount of bias. Even more troublesome than the technical quality is the poor code of conduct that had permeated many studies. Not all excluded articles were necessarily untrustworthy, but the question arises for a significant number of them. In a recent review published in the journal *Nature*, anesthesiologist John Carlisle was alarmed that his detailed analysis of source data from 150 clinical trials revealed that 44% of them had significant biases and that 26% of them were totally fanciful with a significant amount of data that was likely falsified¹⁸⁹. We ourselves had already noted this problem during our previous review of the literature on the impact of nanoparticles on male fertility, but it appears even more prominent here²⁴⁹. Publication or hypothesis confirmation bias is unavoidable in this type of work, but the level of anomalies observed here jeopardizes the ability of the scientific community and readership to reach a true or even accurate conclusion on the toxicity of aluminum on male fertility. It is interesting to note that in his review on the same subject, A Yokel, who did not exclude any article for problems of quality or distrust, concluded with great caution that the male reproductive toxicity of aluminum was generally lower than what the sum of the conclusions of the studies he cited would suggest¹⁸⁸. He justified this fact by essentially basing his conclusions on the few studies which follow the OECD recommendations as if he was also aware that a significant part of the work he reports is not trustworthy. We invite readers to also read this review which provides a different and complementary perspective to ours. Ultimately, the conclusions we reach are closely linked to the initial selection of articles that we made with the hope that we have made as few judgement errors as possible.

The second observation we made is the overall consistency of the results from the different articles included in this review. This overall consistency allows us to put forward several hypotheses concerning the reprotoxicity of aluminum. Thus, the aluminum which enters the body seems able to reach the testis in a relatively limited proportion. However, due to the testis' low capacity to eliminate it, it can accumulate there during prolonged exposure. Testicular aluminum is mainly taken over by macrophages, but it can nevertheless partly reach

the Sertoli cells' cytoplasm and the germ cells' nucleus. It can moderately disrupt spermatogenesis, probably in part by generating oxidative stress, which results in discreet histological abnormalities without impact on testicular weight. This impairment of spermatogenesis could be more severe in certain periods of fragility, particularly during puberty. This impairment of spermatogenesis shows in the spermatic characteristics which are very moderately altered with mainly a reduction in the number of spermatozoa in the ejaculate. These alterations have no quantifiable consequences on the reproductive capacity of individuals or on the health of the offspring. A priori, aluminum does not act as an endocrine disruptor in the testis or the hypothalamic-pituitary axis.

If this story seems very reassuring at first glance, it is not. Indeed, despite very careful sorting of studies and an almost systematic elimination of those finding large aluminum toxicity, we cannot conclude that it is completely safe for male fertility, even at the doses to which the population is usually exposed. We know that the decline in male fertility and the drop in sperm count currently observed is probably linked to multiple factors. Low exposure to a single factor will generally not have significant repercussions on spermatogenesis. On the other hand, combination of multiple factors can have a deleterious, synergistic nature. Thus, the observed reprotoxicity of aluminum, although minimal, is still worrying.

Therefore, we believe that the study of aluminum reprotoxicity must be continued, in particular through studies on cellular models which are sorely lacking in order to clarify its mechanisms. New larger epidemiological studies must also be carried out in order to confirm the first obtained results. Particular attention must be paid to assess the importance of the environmental exposure to which individuals are subject. Finally, the particularly worrying accumulation of aluminum in spermatic DNA and its consequences must be explained. In the meantime, we believe that exposure to aluminum, particularly in food, should be limited to what is strictly necessary and we believe that it would be advisable to ban food additives containing aluminum. Furthermore, we believe that a significant effort must be made by the scientific community as a whole to limit the number of fraudulent studies published on this subject, unfortunately this problem goes far beyond the scope of aluminum reprotoxicity.

Author Contributions

Michèle Cottier conceptualized, planned and supervised the work and interpreted some published data from the available literature; Mohamed Ghazi and Jean-Philippe Klein carried out the bibliographic research, read all articles, analyzed all publicly available data, and wrote the first draft of the article; Dimitrios Bitounis reviewed and corrected the manuscript and provided expertise in the interpretation of some results from the literature.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Saint-Etienne University Hospital for funding this work.

V. Physiologie de l'appareil reproducteur

1. Spermatogenèse

Le spermatozoïde est une cellule extrêmement spécialisée, exclusivement conçue pour transporter un génome haploïde jusqu'à l'ovocyte pour la fécondation, permettant la restauration de l'état diploïde et la formation d'une nouvelle cellule somatique ayant une capacité proliférative. La fabrication du spermatozoïde, ou spermatogenèse, est un processus complexe continu et précisément contrôlé qui comprend la prolifération mitotique des spermatogonies, suivie de deux divisions méiotiques des spermatocytes et enfin, la différenciation des spermatides haploïdes dans un processus appelé spermiogenèse²⁵⁰ (Figure 16).

La spermatogenèse est hautement conservée parmi de nombreux organismes. La phase méiotique assure l'haploïdisation du génome ainsi qu'un assortiment indépendant d'informations génétiques au sein des cellules germinales individuelles. Les cellules germinales de la phase post-méiotique peuvent être subdivisées en spermatides jeunes à noyaux ronds, spermatides intermédiaires (en cours d'élongation) à noyaux allongés et spermatides matures à noyaux condensés²⁵¹. Au cours de la spermatogenèse, la chromatine est compactée par échange d'histones avec des protéines transitionnelles et des protamines²⁵².

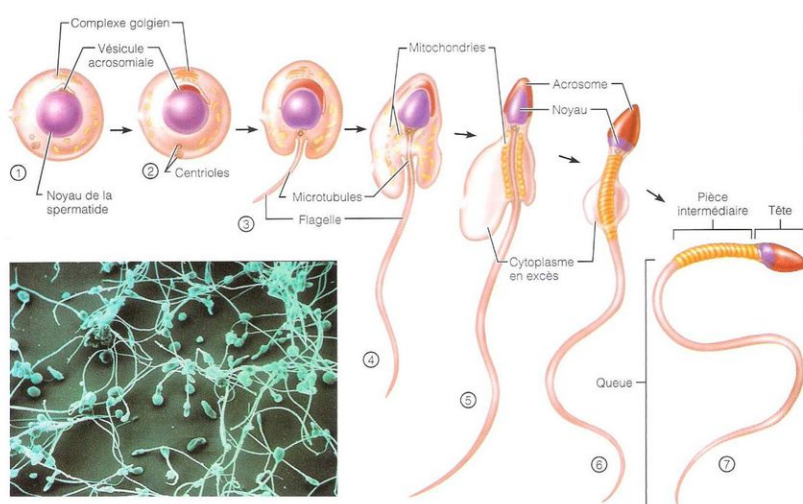


Figure 166 : Schéma de la spermiogenèse. Une spermatide ronde sera transformée en un spermatozoïde élançé à la fin du processus²⁵³.

Dès le dernier tiers du 19e siècle, le Suisse Friedrich Miescher et l'allemand Albrecht Kossel ont décrit des liaisons salines de l'acide nucléique avec deux substances complexantes différentes : les protamines et les histones^{254,255}. De plus, ils ont identifié les histones comme les principales protéines chromatinienne des cellules somatiques. Nous savons maintenant que dans de nombreux organismes, la spermiogenèse s'accompagne d'une réorganisation spectaculaire de la chromatine, passant d'une structure nucléosomale basée sur les histones à une structure largement basée sur les protamines^{251,256}.

2. La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

Nous savons que l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes est continuellement remise en question par des facteurs endogènes et exogènes, bien que différents mécanismes de réparation et de protection contre ces dommages soient actifs dans les cellules humaines²⁵⁷. Ceci est particulièrement pertinent dans les cellules germinales, qui doivent préserver l'intégrité de l'ADN pour transmettre le génome à la génération suivante. Dans ces cellules, les cassures double brin de l'ADN sont physiologiquement induites au cours de la spermatogenèse et de la spermiogenèse pour faciliter respectivement le croisement méiotique et la substitution histone-protamine²⁵⁸. Outre ces premiers dommages « physiologiques » à l'ADN, d'autres facteurs exogènes et endogènes pourraient affecter l'intégrité de l'ADN lors de la maturation et du stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme²⁵⁹⁻²⁶¹. Ainsi, l'intégrité de l'ADN est constamment menacée et son évaluation pourrait constituer une étape fondamentale dans l'évaluation de la compétence fonctionnelle des spermatozoïdes²⁶². Par conséquent, l'évaluation des dommages causés à l'ADN des spermatozoïdes pourrait être cruciale à la fois pour le diagnostic de l'infertilité et pour prédire le succès de l'AMP.

La fragmentation de l'ADN du spermatozoïde est un concept fondamentalement simple, basé sur une molécule d'acide désoxyribonucléique configurée selon le modèle de « *Watson et Crick* » qui a perdu sa continuité²⁶³. La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, due à divers facteurs exogènes et endogènes, affecte directement les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des spermatozoïdes, les rendant impuissants à exercer leurs fonctions de reproduction^{264,265}.

Il existe trois causes possibles de dommages à la chromatine et de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes : les échecs de protamination, l'apoptose et le stress oxydatif. La

fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes peut être une conséquence de ces processus, combinés ou non²⁶⁶.

Le stress oxydatif a été décrit comme la principale cause de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes²⁶⁷, en la provoquant directement ou indirectement. Un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activité des antioxydants déclenche des dommages à l'ADN. Un tel déséquilibre génère des dommages aux bases et des cassures de l'ADN double brin, induisant une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes²⁶⁸. Certaines études ont trouvé une relation claire entre la chaleur et le stress oxydatif²⁶⁹. Chez les béliers il a été rapporté une réduction de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes dans des conditions de stress thermique testiculaire²⁷⁰. Une exposition testiculaire à la chaleur génère un stress oxydatif et augmente la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, sans toutefois modifier les schémas de protamination et d'apoptose²⁷¹.

Lorsque la protamination ne se fait pas correctement, des troubles de la condensation de la chromatine se produisent²⁷². La protamination incomplète génère des spermatozoïdes plus vulnérables aux agents endogènes et exogènes, tels que les nucléases, les radicaux libres ou les mutagènes²⁷². L'enzyme ADN topoisomérase est responsable de la réparation des cassures de l'ADN au cours du processus de spermiogenèse. Lorsque cette procédure échoue, des cassures d'ADN subsistent dans le sperme. Une étude sur des souris knock-out pour les protéines « de transition » a détecté des altérations de la protamine et des dommages à la chromatine des spermatozoïdes entraînant une réduction de la fertilité et des échecs d'implantation d'embryons²⁷³. Chez les bovins, les spermatozoïdes à faible mobilité présentaient une diminution des transcrits de protamine²⁷⁴.

Une autre cause possible de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est l'échappement au processus apoptotique. L'apoptose est le terme utilisé pour désigner la mort cellulaire programmée qui se produit normalement dans de nombreux processus physiologiques. Les spermatozoïdes expriment des marqueurs de l'apoptose lors de la spermatogenèse et lors de la maturation à travers l'épididyme. Dans le testicule, l'apoptose est responsable du maintien de la proportion entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli, en éliminant les cellules germinales défectueuses et en contrôlant la production de spermatozoïdes²⁷⁵. La présence de molécules impliquées dans les voies de l'apoptose telles que les caspases, indique un possible échappement à l'apoptose et la présence des cassures double brin de l'ADN des spermatozoïdes. Ces cassures de l'ADN double brin sont liées à un manque de réparation de

l'ADN lors de la méiose, provoquant des fausses couches et des échecs d'implantation²⁷⁶. De plus, la présence du récepteur Fas et du gène p53 dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles indique que ces cellules auraient pu échapper au processus apoptotique²⁶¹.

3. Évaluation de la fragmentation de l'ADN

En plus des facteurs intrinsèques que nous avons décrit ci-dessus, la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes peut être causée par des facteurs extrinsèques comme l'exposition à la chaleur, le tabagisme, les polluants environnementaux et les chimiothérapies.

La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes augmente avec l'âge, elle double entre 20 et 60 ans²⁷⁷⁻²⁷⁹. Cette association a été attribuée à une exposition plus élevée aux ROS, à une compaction défectueuse de la chromatine des spermatozoïdes et à une apoptose désordonnée qui surviennent avec le vieillissement²⁸⁰. Les associations cliniques avec une augmentation de la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde incluent la varicocèle, qui induit des lésions testiculaires et une fragmentation de l'ADN du spermatozoïde par une augmentation de la température intra-testiculaire et un flux rétrograde de métabolites rénaux et surrénaliens^{281,282}. Les infections génito-urinaires et la leucocytospermie qui en résulte augmentent la production de ROS, augmentant ainsi la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde²⁸³⁻²⁸⁵. Une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a également été rapportée chez des hommes atteints d'un cancer des testicules et d'autres tumeurs malignes secondaire aux altérations endocriniennes ou au stress oxydatif associées à ces pathologies^{286,287}. De plus, la radiothérapie contre le cancer peut provoquer une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes²⁸⁸.

Le mode de vie et les facteurs environnementaux induisent la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Il est important de noter que les hommes obèses ont des niveaux de fragmentation de l'ADN plus élevés que les hommes de poids normal ou en surpoids^{289,290}. L'augmentation de la température scrotale, le déséquilibre endocrinien et l'inflammation systémique chronique sont probablement des mécanismes liant l'obésité à la fonction altérée des spermatozoïdes. En effet, des études ont montré une amélioration significative de la fragmentation de l'ADN et de la fertilité globale avec la perte de poids²⁹¹. D'autre part, les hommes diabétiques présentent des niveaux plus élevés de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en raison du stress oxydant, en association avec la génération de produits finaux de glycation avancée^{292,293}.

L'augmentation de la température scrotale est induite par des anomalies physiques telles que la cryptorchidie, les testicules rétractiles et la varicocèle, ainsi que par les maladies fébriles aiguës et les modes de vie sédentaires²⁹⁴⁻²⁹⁶. La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la décondensation de la chromatine sont observés en cas d'augmentation de la température du scrotum de 2 °C à 3 °C,^{271,297}. Elle serait en partie médiée par l'apoptose et par une expression élevée des protéines inductibles par le stress²⁹⁸.

Le bisphénol A et le styrène présents dans le caoutchouc synthétique ou les polyesters altèrent également l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes^{299,300}. L'effet des toxines professionnelles dépend de la proximité et de la durée de l'exposition³⁰¹. Par ailleurs, l'exposition aux ondes électromagnétiques, en particulier celles des téléphones portables, augmentent la production de ROS mitochondriales et la formation d'adduits à l'ADN, provoquant des dommages à l'ADN^{302,303}. Le tabagisme a également un impact négatif sur l'intégrité de l'ADN³⁰⁴⁻³⁰⁶ en raison des métabolites du tabac tels que la nicotine, le cadmium, le plomb et le benzopyrène. De même, consommation d'alcool peut augmenter la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde et provoquer de l'apoptose^{307,308}.

4. La fragmentation d'ADN en AMP

En touchant la moitié de tous les couples désirant un enfant, l'infertilité masculine représente une part très importante du spectre global des troubles de la fécondité. Malgré cela, l'homme fait rarement l'objet d'investigations approfondies. Actuellement, le spermogramme reste une technique de laboratoire considérée comme la référence pour tenter d'explorer l'infertilité masculine. Cette technique évalue les caractéristiques physiques du sperme telles que le temps de liquéfaction, le volume séminal et le PH ainsi que des paramètres des spermatozoïdes, notamment la concentration, la mobilité, la morphologie. Cependant, ces données d'évaluation du spermatozoïde selon sa fonction de « support » et moins son « contenu » réel, ne reflètent pas pleinement l'altération de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes³⁰⁹, qui pourrait être préjudiciable à la fécondation normale, au développement de l'embryon et au succès d'une AMP³¹⁰. De plus, il a été suggéré que les paramètres de qualité embryonnaire pourraient être directement corrélés à l'intégrité du génome du spermatozoïde, en raison de la transmission de matériel génétique endommagé à l'ovocyte³¹¹. Ceci est expliqué par le fait que c'est l'intégrité de la molécule d'ADN qui est la plus critique pour la syngamie, le développement embryonnaire et la grossesse³¹².

Il a été décrit que la présence de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté en FIV réduisait le taux de fécondation³¹³⁻³¹⁵. De tels résultats ont également été rapportés par l'étude de Borini et al.³¹⁶, qui ont trouvé une légère corrélation positive entre le taux de fragmentation et le taux de fécondation des ovocytes. Ce constat se rajoute à celui d'une corrélation inversement proportionnelle entre le paramètre fragmentation de l'ADN du spermatozoïde et les paramètres séminaux conventionnels tels que la concentration, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Ainsi, les patients ayant un taux important de fragmentation de l'ADN peuvent avoir un moindre pouvoir fécondant³¹⁷.

Les effets directs de la fragmentation de l'ADN spermatique sur l'évolution des embryons et sur les taux de grossesse ont également été explorés. Un DFI (*DNA Fragmentation Index*) supérieur à 30 % réduisait la qualité des embryons dans les protocoles ICSI³¹⁸ ainsi que leur taux de blastulation³¹⁹. d'autres études ont rapporté un retard dans la cinétique de développement de l'embryon³²⁰, ainsi que leur taux d'implantation^{319,321}. D'autre part, une association entre les taux de fragmentation de l'ADN du spermatozoïde à des échecs d'implantation et de FCS a été observée dans plusieurs études^{310,322,323,324}.

5. Aluminium et fragmentation de l'ADN spermatique : existe-il un lien ?

Il est actuellement admis qu'il y a de l'aluminium dans le sperme. Certaines études ont montré que les travailleurs exposés à la poussière d'aluminium présentaient des concentrations élevées d'aluminium dans leur sérum et leur plasma séminal^{325,326}. Et même si les quantités exactes varient d'une étude à l'autre, toutes trouvent des valeurs d'Al dans le sperme bien supérieures à celles trouvées dans d'autres fluides biologiques tels que le sérum ou l'urine³²⁷. Nous savons également que des concentrations élevées d'aluminium dans le sperme et le plasma séminal humains sont en corrélation avec une diminution de la numération, la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes¹⁶⁶. Le chlorure d'aluminium est capable de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS)^{328,329}. Chez les patients asthénospermiques, une production élevée de ROS dans le plasma séminal et une augmentation des lésions de la membrane spermatique induites par les ROS ont été détectées. En modifiant l'intégrité de la membrane, les ROS peuvent modifier la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes.

En 2014 notre équipe a rapporté la présence d'Aluminium au niveau de la tête des spermatozoïdes²⁴⁰, par la suite, en 2016, une étude d'Ali et al.¹⁶⁷ a montré, qu'après extraction de l'ADN du sperme, une concentration relativement élevée d'Al était trouvée au sein de cet ADN, indépendamment de celle retrouvée dans le plasma séminal. Cette accumulation d'Al

au sein de la tête du spermatozoïde et plus particulièrement dans l'ADN spermatique suscite de réelles inquiétudes. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que l'Al pouvait induire des dommages à l'ADN des cellules qui y sont exposées³³⁰⁻³³². Il a notamment été montré que l'Al pouvait, même à des doses relativement faibles (2 µg/mL), provoquer une fragmentation de l'ADN dans les lymphocytes humains³³³.

Ces constats nous ont amené à répondre à un appel d'offres local (AOL) lancé par la Direction Générale du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Saint-Etienne pour financer notre projet de recherche intitulé « impact de l'aluminium sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes des patients admis pour insémination artificielle ». Ce projet a pour objectif principal d'évaluer l'impact de l'aluminium sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes à travers une analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique chez des patients pris en charge en insémination artificielle avec sperme du conjoint.

Impact of aluminum on sperm DNA fragmentation in patients attempting an intra-uterine insemination

Short Title: Aluminum and sperm DNA fragmentation

Mohamed Ghazi^{1,2}, Carole Pélissier^{3,4}, Emilie Presles⁵, Philippe Telouk, Odile Sabido², Claude Lambert, Ines Harzallah, Isabelle Aknin, Lionel Mery, Michèle Cottier^{1,2}, Marc-Antoine Belaud-Rotureau^{6,7}, Raphaëlle Escoube, Jean-Philippe Klein^{1,2}

1. Reproductive Biology department, University Hospital Center of Saint Etienne, 42055, Saint Etienne, France
2. U1059, INSERM, SAINBIOSE, Univ Jean Monnet de Saint-Étienne, Mines Saint-Etienne, F-42270, France
3. Occupational Health Service, University Hospital Center of Saint-Etienne, 42055, Saint Etienne, France;
4. University Lyon 1, University of St Etienne, University Gustave Eiffel—UMRESTTE UMR_T9405, 42005 Saint-Etienne, France
5. Unité de Recherche Clinique, Service de Pharmacologie Clinique, University Hospital Center of Saint-Etienne, 42055, Saint Etienne, France;
6. Service de Biologie de la Reproduction - CECOS, CHU Rennes, Rennes, France
7. INSERM, EHESP, IRSET - UMR_S, 1085, Université Rennes, Rennes, France

Abstract

In recent years, several studies have shown a significant quantity of aluminum (Al) in human semen with a particular accumulation in the sperm head. In this work, we have evaluated the link between Al concentration and DNA fragmentation in the semen of patients performing intrauterine insemination. We also evaluated patients Al exposures using a questionnaire. In this study, no significant correlation between Al quantity in semen and sperm DNA fragmentation was found. Likewise, no difference in aluminum concentration in semen was found between patients exposed to aluminum and others in any of the exposure modalities explored, namely: occupational, dietary, cosmetic or medical exposure. In conclusion, in the context of this study, the aluminum present in semen does not seem to induce higher rate of sperm DNA fragmentation.

Introduction

Some metals are major pollutants distributed around the world, due to their natural occurrence on the earth's crust and their extraction for industry throughout human history. Both epidemiological and in vitro/in vivo studies have illustrated the association between chronic exposure to metals and health problems risk³³⁴.

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the earth's crust behind oxygen and silicon, accounting for almost a tenth of the earth's surface³³⁵. Examples of different Al forms include aluminum oxide, aluminum chlorohydrate, aluminum hydroxide, aluminum chloride and aluminum phosphate³³⁶. Its fields of use are diverse : construction industry and transport (building construction, automobile, aeronautics, naval, and railway), food industry (manufacture of kitchen utensils, boxes for packaging drinks, food preservation, additive for meals...) and medical applications (pharmaceutical industry, surgery, cosmetology...) ³³⁷. Aluminum is also used for water treatment (flocculating and clarifying agent)³³⁸. Since last decades, world production of aluminum is constantly increasing. It rose from 5 million tons in 1960 to 49 million tons in 2014, and domestic consumption increased by 350% in industrialized countries³³⁹. Expectedly, human exposure to aluminum through products food, cosmetics, environmental contamination and drugs, has never been so high and should continue to increase⁸⁴.

In humans, the main routes of chronic exposure to aluminum are the oral route (diet, water, oral medications), the cutaneous route (cosmetics and antiperspirants) and the respiratory route (inhalation of dust). Although aluminum is ubiquitous in the environment³⁴⁰, more than 80% of the usual exposure excluding occupational exposure is dietary exposure, particularly through foods containing aluminum compounds as food additives. The total dietary exposure to aluminum has been calculated ranging from 14 to 280 mg per week in the adult population. Approximately 0.1% of orally ingested aluminum is absorbed from the gastrointestinal tract and is bioavailable³⁴¹.

Declining birth rate in developed countries is a serious social problem¹⁸⁴. Infertility has been recognized as a public health issue worldwide by the World Health Organization (WHO)³⁴². Male infertility comprises half of the infertility cases³⁴³, moreover, the semen parameters have suffered a significant and continuous reduction in the past decades^{182,344}. Exposures to environmental and industrial toxins have been shown to play a critical role in this regard¹⁸⁴.

The development and physiology of the reproductive system has been demonstrated to be impacted by Al hazardous potential^{222,345}. Despite its earth abundance, Al does not present any biological function. Therefore, Al concentration into the human body should stay as low as possible. However, studies have shown that workers exposed to Al dust have elevated aluminum concentrations in their serum and seminal plasma^{346,347}.

Aluminum is found in high concentrations in semen^{240,241,245,348}. If the exact quantities vary from one study to another, all find Al values in the sperm much higher than what is found in other biological fluids such as serum or urine²⁴⁷. Moreover, aluminum is able to generate reactive oxygen species (ROS)²³⁰.

Klein et al.²⁴⁰, using lumogallion staining, showed that Al accumulate in the head of the spermatozoa. It is also in this region that the nucleus of the spermatozoon containing its DNA is localized. After extraction of sperm DNA, Ali et al.²⁴⁵ showed that a very high Al concentration was found within this DNA, much higher than that found in seminal plasma. This accumulation of Al within the head of the spermatozoon, especially in sperm DNA is worrying. Indeed, it has been shown on several occasions that Al can induce DNA damage^{349–351}. In particular, it has been demonstrated that, even for relatively low doses (2 µg/mL), Al could cause DNA fragmentation in human lymphocytes³⁵².

We have known for a long time that an increase in sperm DNA fragmentation can be a vector of male infertility. Several studies have in fact demonstrated its impact on fertility in the context of natural fertilization or fertilization after artificial insemination^{353,354}. It has also been shown that a high rate of sperm DNA fragmentation is the cause of an increased number of miscarriages regardless of the type of procreation considered³⁵⁵. We therefore hypothesize that an increase in DNA fragmentation due to the presence of aluminum in human semen could be a vector of male infertility.

In order to confirm this hypothesis, our main objective is to explore the correlation between the Al quantity in semen of patients consulting for artificial insemination and the rate of spermatid DNA fragmentation.

The choice to focus on patients treated with artificial insemination is both a scientific and practical choice. Scientific first, because it is in this population that an increase in sperm DNA

fragmentation could be the cause of a reduction in fertility. We also want to compare semen aluminum load between two groups of patients: patients for whom insemination will have resulted in a clinical pregnancy and others. Practical then, because artificial insemination is offered to patients with a sperm count ranging from normal to moderately low, which will allow us to have enough semen to carry out the analyses.

In addition of the previous objectives, our study will allow us to evaluate the link between Al quantity in semen and several environmental exposure routes using a questionnaire created for the occasion. Indeed, to our knowledge, there is no questionnaire to assess environmental exposure to aluminum. Furthermore, the currently available studies do not clearly show the existence of a correlation between environmental exposure to aluminum and the aluminum load in semen.

Material and Methods

Population

Eighty patients performing a first artificial insemination were recruited within the assisted reproduction technic center of Saint-Etienne University Hospital between 2018 and 2021. In order to be included in the study, eligible patients had to have a sufficient volume and concentration of sperm so that the collection of a semen portion would not reduce the success rate of the attempt. This prerequisite was the cause of the exclusion of more than 80% of initially eligible patients.

Ethical approval

In accordance with French legislation, patients were informed about the purpose of the study and were asked for their consent. The study was approved by the North West People Protection Committee II (France) September 27, 2017 (N° ID RCB: 2017-A01825-48).

Aluminum exposure questionnaire

We wanted to know if the concentration of aluminum in total semen was impacted by environmental exposure to aluminum. However, to our knowledge, there is no validated method allowing a simple assessment of environmental exposure to aluminum. This is why we developed a questionnaire that attempts to explore occupational (using the ISCO-88 classification), dietary (consumption of tap water, tea and herbal teas, prepared meals and quantification of vegetables and bread intake), tobacco, skin (deodorants and antiperspirants)

and drug (gastric dressing) exposure to aluminum. The whole questionnaire can be found in Supplementary data 1.

Before carrying out the attempt, each eligible patient was asked to complete the questionnaire assessing their level of exposure to aluminum. For each of the parameters we split our population into two groups: exposed and unexposed, and we compared the average level of spermatogenic aluminum between these two groups.

Samples collection

Sampling was carried out in accordance to the laboratory usual practices. The collection of semen was performed after a period of two to five days of sexual abstinence and the sample was processed by laboratory technicians according to a protocol combining both density gradient centrifugation and swim-up purification techniques.

Initial semen analysis was performed 30 min after collection of the sample by microscopic examination, including assessment of concentration on a Mackler® cell, and estimating progressive motility (expressed as a percentage of total sperm). These parameters were determined by standard methods recommended by World Health Organization guidelines³⁵⁶. Part of the whole semen was kept for AI analysis and part of the semen was deposited on the surface of one or more density gradients of PureSperm® 50%-70%-90% (Nicadon, Gothenburg, Sweden) and centrifuged at 300g for 25 minutes at room temperature. If not enough semen could be kept for aluminum analysis, the patient was excluded from the study. The supernatant consisting of seminal plasma was discarded, the 90% layer containing the best quality spermatozoa was rinsed in a washing medium: Flushing medium® (Origio, Denmark) and centrifuged at 600g for 10 minutes. The supernatant was once again discarded, and the pellet covered with a culture medium: IVF medium® (Origio, Denmark) and left at 37°C for 30 min, allowing to the most mobile spermatozoa to migrate to the surface (swim-up technique). This last supernatant was kept for the intra-uterine insemination while the unused pellet was kept to assess sperm DNA fragmentation. If the sperm count of the pellet was too low or no sperm pellet can be recovered, the patient was excluded from the study.

This same technique was used for making blank test: 1mL of Versylene® sterile water (Versylene Fresenius, France) was placed on the Puresperm® density gradient. After centrifugation, 0.5 mL of medium was collected at the bottom of the tube then 0.5 mL of IVF medium® was added.

Aluminum dosage

The samples were first frozen before being analyzed:

- A volume of 1.2mL of whole semen was collected in a Cryotube then frozen at -20°C until analysis.
- Blank: 1mL of liquid resulting from the application of the sperm preparation technique to sterile water was frozen at -20°C.

The Al assays were carried out in Lyon Geology Laboratory (École normale supérieure de Lyon, France). The technique used for Aluminum dosage is Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) described by Wilschefski et al.³⁵⁷ An iCAP Qnova Series ICP-MS Single Quadrupole (Thermo Fisher) was used to conduct the experiments. All samples were prepared by dilution (1:20, v/v) in a solution consisting of X-triton (0.1%). The samples presenting the higher concentration have been retested at PATERSON platform. Samples have been weighted, transposed in teflon beakers with 0.2 mL of concentrated HNO₃ (quality trace metal) then warmed up at 80°C overnight. The samples were diluted with MilliQ to obtain a solution at HNO₃ 2%. With an appropriate dilution, the sample have been measured on Triple-Quad Agilent 8800 ICP-MS/MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with collision mode to minimize the interferences.

DNA fragmentation:

Before performing the sperm DNA fragmentation technique, a sperm fixation is necessary in order to maintain the integrity of the DNA during storage. We used the 70% ethanol fixation technique³⁵⁸.

The samples were washed by adding 3mL of Phosphate-Buffered Saline (PBS), after centrifugation (10 min at 1500g), a sperm count and dilution were performed to obtain a suspension at 4 ± 1 M sperm/mL. Tubes with 600 μ L of cold absolute ethanol were placed in a tray of ice, and 300 μ L of the sperm suspension was added to it. The addition was done drop by drop without vortexing so as not to alter the membrane of the spermatozoa. For each patient, if possible, 8 tubes were prepared (4 for fragmentation and 4 for analysis backup). Fixed samples were kept in the freezer at -20°C until analysis. In order to ensure the stability of our fixed samples over time, we selected 3 samples with different levels of fragmentation. We fixed the samples at D0 and we measured the fragmentation rate at D0, D7 and D14.

The fragmentation rate was measured using the TUNEL technique - *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*. This technique reveals breaks in DNA strands using the properties of the enzyme TdT which can incorporate a deoxynucleotide on a free 3'-OH end³⁵⁹.

Analysis was performed according to the manufacturer's recommended protocol of the commercial kit APO-BrdU™ (Thermo Fisher Scientific). Washing and rehydration of the fixed spermatozoa were carried out beforehand. A permeabilization step of the cytoplasmic and nuclear membranes allows the intranuclear penetration of TdT. Finally, an incubation with Propidium Iodide (DNA intercalator) was performed, allowing quantification of the cell nuclei ploidy to perform a correct flow cytometry windowing on the haploid cells (spermatozoa).

The APO-BrdU™ kit includes a positive control and a negative control of human lymphoma cell line. For each patient, a negative control (without BrdUTP) was performed in order to define the basal fluorescence, then a triplicate of samples was analyzed in a two-dimensional histogram: the BrdUTP polymers locating the fragmentation sites revealed by an anti-BrdUTP antibody labeled with (Alexa Fluor™ 488), on the targeted haploid cell (Propidium Iodide). The detection of fluorescence was done by flow cytometry on a FACS Vantage SE cell-sorter type flow cytometer (BD Biosciences) on ten thousand events measured for each sample at a flow rate of 100-200 events/s. The final value is a mean of the results obtained from the three analyses minus the negative control. It is called DNA Fragmentation Index (DFI). In order to facilitate a better understanding of the manuscript, we will rather use the term "sperm DNA fragmentation".

Statistical analysis

Our main objective was to demonstrate the existence of a correlation between aluminum level in semen and sperm DNA fragmentation. To achieve this objective, we proposed to detect a minimum correlation (R^2) of 0.5 (difference from 0) with 90% statistical power. For an alpha risk of 0.01 (the relevant threshold for correlation), the number of subjects required was 53. However, this number of subjects did not take into account the potential effect of covariates such as age, smoking, a varicocele, exposure or a sperm infection. A priori adjustment for these confounding factors was very difficult. Although data existed in the literature on the impact of these factors on sperm DNA fragmentation, they were not sufficiently precise to enable us to reliably calculate their impact on the correlation we wished to measure. In addition, we had several secondary objectives for this study. One of these was to describe

aluminum levels in patients who did not achieve pregnancy during their first intra-uterine insemination, and in patients who did achieve pregnancy during their first intra-uterine insemination. The ultimate aim of these studies is to determine whether or not aluminium level is responsible for a reduction in fertility. In order to set up a large study able to properly answer this question, we need evidence to support this hypothesis. To be able to describe the level of aluminum in the group of patients who achieved pregnancy, we needed to obtain at least 10 pregnancies. However, the success rate for IUI is only 15%. For all these reasons, we decided to include 80 patients in the study.

The correlation between aluminum level and sperm DNA fragmentation was assessed using Spearman's coefficient, considering the non-Normal distribution of the tested data. The resulting p-value was reported. A scatter plot was also performed on the raw data and on the log-transformed data in order to normalize their distribution. To assess correlations between aluminum level and quantitative secondary endpoints, identical statistical methods were used. The relationship between aluminum level and qualitative secondary endpoints was assessed using a non-parametric Wilcoxon rank sum comparison test, as the data distribution did not follow a Normal distribution. A box-plot was also performed. Statistical analyses were performed using SAS version 9.4 software (SAS Institute Inc) and graphs using R[®] software version 4.2.1.

Results

Population description

All the relevant results obtained following the questionnaires answers and the analyses carried out have been compiled in Table 2. Thus, we note that a certain number of patients potentially have occupational exposure to aluminum, that their spermatic characteristics are good for a population treated with assisted reproduction technics (159 ± 89 million spermatozoa per ejaculate with a mobility of $45.9 \pm 5.2\%$), that their fragmentation rate is on average high ($36.65 \pm 24.45\%$) and that the success rate of their first insemination is lower than what we usually see (12.5% pregnancy compared to 19% usually observed in our center).

Table 2: Population description. DFI : DNA Fragmentation Index.

Patient characteristics		Mean \pm standard deviation or number of patients	Number of patients who provided data
Age		33.6 \pm 5.2	80
Aluminium exposure awareness		14 (20.0%)	70
Industrial workers according to ISCO-88		24 (31.2%)	77
Tobacco consumption	Current	24 (30.0%)	80
	Past	15 (18.8%)	80
Average tobacco consumption (cigarettes/day)		9.4 \pm 6.0	38 (1 missing)
Alimentary Data			
Tap water consumption		57 (71.3%)	80
Consumption of prepared meals at least 1/week		30 (37.5%)	80
Bread consumption at least 2/day		36 (45.0%)	80
Vegetables consumption at least 2/day		25 (31.3%)	80
Tea consumption at least 1/week		23 (28.8%)	80
Hygiene and health data			
Use of a deodorant or antiperspirant		59 (75.6%)	78
⇒ That contain aluminum		18 (32.7%)	55
Use of a gastric dressing this year		12 (15.6%)	77
Biological data			
Semen volume (ml)		3.33 \pm 1.17	80
Sperm number per ejaculate (M/ml)		159 \pm 89	80
Sperm mobility (%)		45.9 \pm 5.2	80
Sperm DNA fragmentation (DFI) (%)		34.72 \pm 23.98	80
Aluminum in whole semen (μg/l)		46.1 \pm 212.5	80
Intra-uterine insemination success			
For this attempt	Live birth	8 (10%)	80
	Spontaneous Miscarriage	2 (2.5%)	80
For all attempts	Live birth	25 (31.3%)	80
	Spontaneous Miscarriage	2 (2.5%)	80

DNA fragmentation stability

As the TUNEL tests assessing sperm DNA fragmentation were carried out in small series, certain samples could remain frozen for a few weeks before being analyzed. In order to ensure that this freezing time would not have an impact on the level of fragmentation, an evaluation of the stability of sperm DNA fragmentation was made on D0, one week and two weeks after

freezing for three patient samples with different level of fragmentation. No variation in the level of sperm DNA fragmentation was observed (Figure 17).

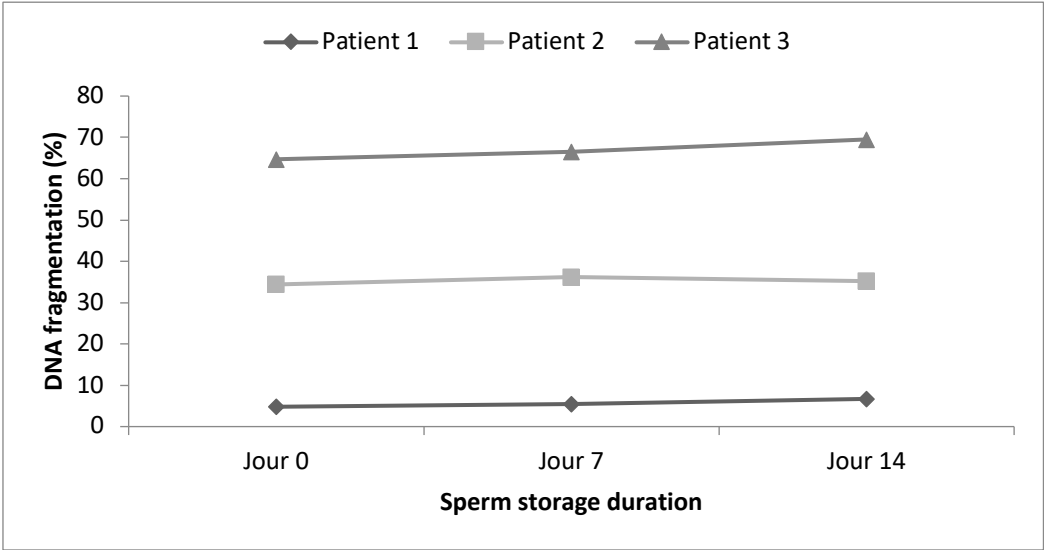


Figure 17 : Variation in sperm DNA fragmentation rate as a function of storage time after fixation in 3 patients with different levels of sperm DNA fragmentation.

Correlation between semen aluminum level and sperm DNA fragmentation

The main objective of this work was to investigate the existence of a correlation between the quantity of aluminum in whole semen and sperm DNA fragmentation. Let us first note that most patients had a relatively low semen aluminum level in comparison with previous studies ($46.1 \pm 212.5 \mu\text{g/l}$) except for some patients who could have a much higher quantity of aluminum, up to $1757.5 \mu\text{g/l}$.

Ultimately, with a Spearman correlation coefficient of 0.044 ($p = 0.698$), no statistically significant correlation was found between the quantity of aluminum in whole semen and sperm DNA fragmentation (Figure 18). Likewise, a comparison, using a non-parametric test, between the aluminum level in semen in patients with sperm DNA fragmentation greater than 30% and others did not find any statistically significant difference ($p = 0.286$).

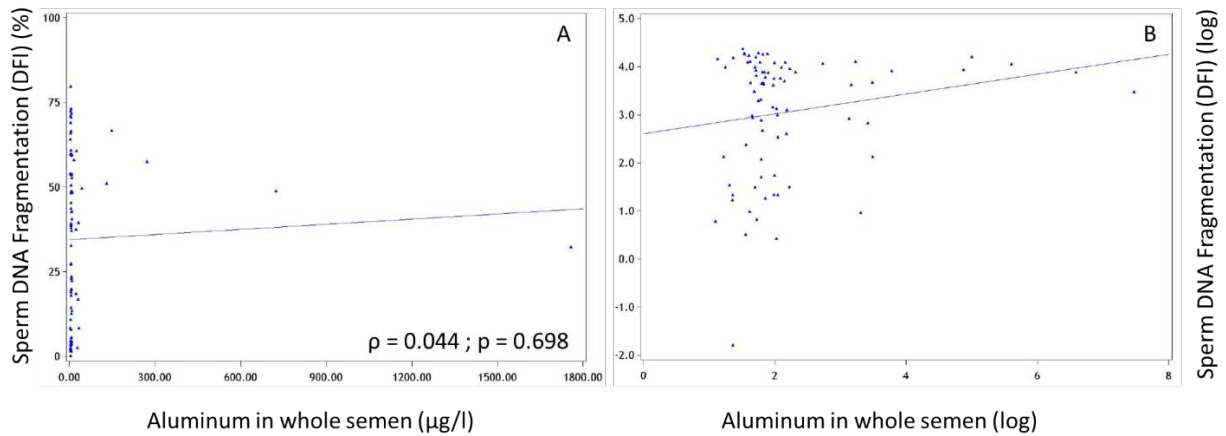


Figure 18 : Correlation between semen aluminum level and sperm DNA fragmentation (DFI= DNA Fragmentation Index). A: raw data. B: logarithmic transformation. ρ : Spearman's rank correlation coefficient.

Nevertheless, looking in detail at these results, we noted that the five patients with a semen aluminum level greater than 100 $\mu\text{g/l}$ all had sperm DNA fragmentation greater than 30%. Therefore, we wanted to know if these specific patients presented other potential causes of increased sperm DNA fragmentation. Indeed, the absence of such a cause could suggest that the presence of a significant quantity of aluminum in semen could be the cause of the sperm DNA fragmentation elevation, for these patients at least. However, among these five patients, only one did not report any cause of increased sperm DNA fragmentation (Table 3).

Table 3: Usual causes of a sperm DNA fragmentation elevation for the five patients with the highest level of aluminum in sperm. UR: Unrealized; DFI: DNA Fragmentation Index

Patient	1	2	3	4	5
Aluminum in whole semen ($\mu\text{g/l}$)	148	271	1757	131	724
Sperm DNA fragmentation (DFI) (%)	67	58	32	51	49
Age	32	26	34	35	36
Varicocele	UR	UR	No	UR	UR
Semen infection	No	No	No	No	No
BMI > 25	Yes	No	No	No	No
Chemo/radiotherapy	No	No	No	No	No
Heat exposure	No	No	Yes	No	No
Diabetes mellitus	No	No	No	No	No
Smoking	Yes	Stop 2019	No	No	Yes
Cannabis	Yes	Stop 2019	No	No	No
Alcohol	Daily	Stop 2018	Casual	No	Casual

In the end, this seems to refute our hypothesis that the presence of aluminum in semen could lead to an increase in sperm DNA fragmentation, at least in the context of this study.

Impact of aluminum exposure on semen aluminum level

We also wanted to know if the concentration of aluminum in total semen was impacted by environmental exposure to aluminum. Ultimately, no statistically significant difference was observed for any of the studied parameters. These included: occupational exposure reported by patients, occupational exposure according to the ISCO-88 classification, consumption of foods potentially having a high concentration of aluminum (tap water, prepared meals, bread, tea, vegetables), smoking, using deodorant containing aluminum, taking gastric bandages (Figure 19).

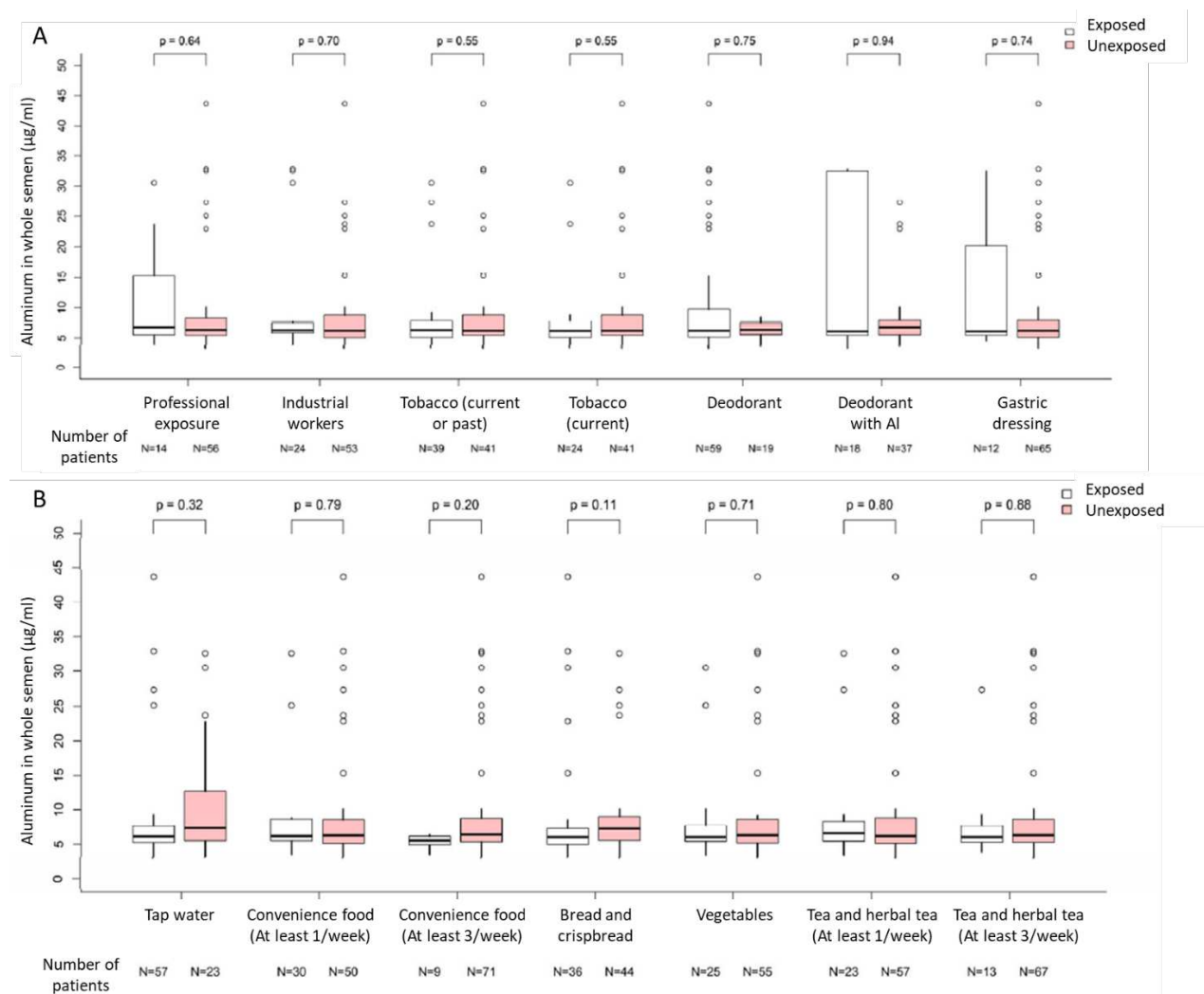


Figure 19: A. Box plots of the quantity of aluminum in whole semen according to occupational exposure and patient habits. B. Box plots of the amount of aluminum in whole semen according to the patients' food consumption

Impact of semen aluminum level on intra-uterine insemination success rate

Finally, we wanted to know if the quantity of aluminum observed in whole semen hinder intrauterine insemination success rate. To do this, we compared the average aluminum level between patients who achieved pregnancy after the first insemination attempt and the

others. We also compared the average aluminum level between patients who achieved pregnancy after their entire insemination attempt and the others.

Ultimately, no significant difference in aluminum concentration in whole semen was observed between patients who achieved pregnancy and those who did not, whether after the first insemination attempt ($p = 0.139$) or after all insemination attempts ($p = 0.218$).

Discussion

The main objective of this work was to investigate the existence of a correlation between the quantity of aluminum in semen and the sperm DNA fragmentation in patients performing artificial insemination. We found no significant correlation in this study between these two parameters. Furthermore, we were unable to demonstrate a link between environmental exposure factors to aluminum assessed using a questionnaire and the quantity of aluminum in semen. This is surprising, because at least regarding occupational exposure, the studies by Hovatta et al. and Dawson et al. were able to highlight significant differences between the most exposed subjects and the others^{241,248}. However, in these studies, the measurement of occupational exposure did not use elements reported by patients but was directly defined according to their workplace. Finally, no significant difference between the quantity of aluminum in the semen of patients who had successful ART treatment and the others was noted. This last point in particular is not surprising because given the reduced number of patients, a major negative impact of aluminum would have been necessary for this to translate into a reduction in pregnancy rates.

Before we can conclude, it is important to note that our study presents a bias and several limitations that we must detail.

First, the way patients were recruited introduces obvious selection bias. This population is not representative of the general population, since they are men performing ART. Furthermore, this population is also not representative of a usual population of patients treated with intrauterine insemination, because, due to technical constraints, only patients with a significant quantity of semen and spermatozoa were able to be included. Indeed, it was not possible to deprive patients of part of their semen when all of it was necessary for the attempt to be carried out. This particular selection bias explains some unusual results we observed, including the low pregnancy rate these patients achieved compared to what we usually observe at our center. This is most likely linked to the fact that by selecting a population with

very good semen quality, we are simultaneously selecting couples where the proportion of infertility of female origin increases. This being preponderant in the chances of obtaining a pregnancy through insemination, we certainly observe a reduction in the pregnancy rate.

We also noted that the quantity of aluminum measured in the patients' semen was on average lower than that found in our previous study (46.1 $\mu\text{g/l}$ versus 339 $\mu\text{g/l}$). The selection bias mentioned above could partly contribute to this observation. Indeed, during our previous study, we observed a higher quantity of aluminum in patients with oligozoospermia. The fact of having systematically excluded, for technical reasons, patients with lower semen quality, may have lowered the average quantity of aluminum measured in the semen of the patients finally included. However, this phenomenon should not be exaggerated because another explanation for this difference could be the use of different aluminum dosage techniques: Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) in our first study and ICP-MS in the second. By comparing the different studies that have measured the quantity of aluminum in semen, we see that the variations can be very significant. This makes it difficult to define an "expected" level of aluminum in semen which varies between 1 and 1000 $\mu\text{g/l}$. However, we note that, in most studies, the standard deviations are high with patients presenting quantities of aluminum much higher than others without either the causes or the consequences of such variations being yet well understood (Table 4).

Table 4: Comparison of semen mean aluminum content in available literature. AAS: Atomic Absorption Spectroscopy; ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy; ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Study	Population	Measurement technic	Measurement site	Mean aluminium quantity \pm standard deviation	Mean aluminum quantity in $\mu\text{g/l}$
Ali et al. 2017 ²⁴⁵	Control	ICP-MS	Seminal fluid	12.4 \pm 33.8 $\mu\text{g/l}$	12.4
			Sperm DNA	9.3 \pm 11.1 $\text{ng}/\mu\text{g}$	
Dawson et al. 1998 ³⁴⁸	Control	AAS	Seminal fluid	18 \pm 8 $\mu\text{g/l}$	18
Dawson et al. 2000 ²⁴⁸	Control	AAS	Seminal fluid	46 \pm 8 $\mu\text{g/dl}$	460
Hovatta et al. 1998 ²⁴¹	Whole population	AAS	Sperm pelet	1.93 \pm 3.37 mg/kg	1930
			Seminal fluid	0.74 \pm 1 mg/kg	740
Klein et al. 2014 ²⁴⁰	Whole population	AAS	Whole semen	339 \pm 256 $\mu\text{g/l}$	339
Rodriguez-Diaz et al. 2021 et 2022 ^{243,244}	Whole population	ICP-OES	Seminal fluid	2.64 \pm 4.2 mg/kg	2640
This study	Whole population	ICP-MS	Whole semen	46.1 \pm 212.5 $\mu\text{g/l}$	46.1

We also note that sperm DNA fragmentation is relatively high in our study: 34.72%. Despite the bias presented above, we note that this fragmentation rate is relatively close to that generally observed in patients treated in ART^{360,361}.

Another criticism that can be made here is the fact of having measured aluminum in total semen rather than in the sperm fraction. Initially we wanted to determine aluminum quantity on the sperm fraction after separation gradient. However, it turned out that the media we used contained large amount of aluminum, particularly PureSperm®, without this being specified in the instructions. Therefore, this made the measurement of aluminum in the sperm fraction after separation impossible. However, it is likely that the aluminum concentrations in total semen and in the sperm fraction are correlated since the first contains the second.

However, this point has never been proven and in their study, Ali et al. showed a discrepancy between the aluminum contained in seminal plasma and the aluminum contained in spermatid DNA²⁴⁵.

Ultimately, we found no correlation between sperm DNA fragmentation and the quantity of aluminum in semen. We also did not observe a significant difference in the amount of aluminum in semen between patients with high sperm DNA fragmentation and those without. Finally, even if the five patients with the highest quantity of aluminum in semen all had increased sperm DNA fragmentation, other causes for this increase can be found for four of them. Even taking into account the limitations of this study, it is at this stage reasonable to conclude that this work refutes our initial hypothesis, the aluminum present in semen does not clearly lead to an increase in sperm DNA fragmentation. However, this question deserves to be studied in more detail, in particular through work on germ cells model exposed to aluminum. In the absence of this type of work, it does not seem appropriate to multiply the number of studies in humans, even if a study with sperm DNA extraction, as is done by Ali et al.²⁴⁵, and seeking of a link between the amount of aluminum in sperm DNA and sperm DNA fragmentation could be relevant.

VI. Discussion, perspectives et conclusion

1. Discussion

Synthèse des résultats et de la littérature

Nous avons fait, le long de ce travail, une étude du lien entre l'aluminium et la fertilité masculine, à travers une revue exhaustive de la littérature, et une analyse expérimentale de l'exposition à l'aluminium, de sa présence dans le sperme total, et de son impact sur la fonction nucléaire des spermatozoïdes. Ce travail s'inscrit dans la continuité de celui du Dr Klein au cours duquel l'aluminium a été retrouvé dans le sperme à des concentrations bien supérieures à ce qui a été observé dans les autres liquides de l'organisme. De plus, cet aluminium était significativement plus élevé chez les patients présentant une oligozoospermie et s'accumulait dans la tête des spermatozoïdes. Forts de ces premiers résultats, il a été décidé que ces travaux seraient poursuivis par de nouvelles études dont j'ai eu la charge.

Nous sommes partis de deux constats indiscutables qui sont le déclin mondial de la numération des spermatozoïdes concomitant à une exposition croissante à l'aluminium. Notre analyse expérimentale avait pour objectif principal d'étudier l'existence d'une corrélation entre la quantité d'aluminium dans le sperme et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les patients pratiquant une insémination artificielle au sein de notre centre d'AMP. Nos résultats n'ont pas pu démontrer de lien entre les facteurs environnementaux d'exposition et la quantité d'aluminium dans le sperme. De même, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre la concentration de l'aluminium dans le sperme et les taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Nous avons également rédigé une revue systématique de la littérature scientifique afin de faire le tri entre ce qui est réellement démontré et ce qui reste de l'ordre de la spéculation au sujet de la reprotoxicité de l'aluminium. Au terme de notre analyse nous avons été particulièrement frappés par la cohérence globale des résultats rapportés par les différents articles sélectionnés. Ainsi nous avons montré que l'aluminium pouvait s'accumuler dans le testicule, suffisamment pour provoquer des anomalies histologiques et une réduction de la numération des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Et même si les quantités relevées ne sont pas très importantes, l'aluminium est un puissant générateur de stress oxydatif, et sa présence prolongée au niveau du testicule, en raison d'un défaut d'élimination, pourrait à elle seule expliquer ces anomalies. D'autre part, ces résultats ne nous permettent pas de considérer

l'aluminium comme un perturbateur endocrinien au niveau du testicule ou de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Limites de nos travaux

Afin d'aboutir à ces résultats nous avons dû braver quelques difficultés qui ont eu un impact sur les résultats de notre étude expérimentale.

Dans un premier temps, nous avons conçu ce projet en collaboration avec le Pr Exley, spécialiste mondialement reconnu de l'aluminium, qui nous a proposé de réaliser les dosages dans son laboratoire. Après la mise au point technique et la présentation des résultats préliminaires au congrès « *The Thirteenth Keele Meeting on aluminium* » au Mexique, nous n'avons malheureusement pas pu continuer les dosages des échantillons expédiés en raison de l'exclusion du Pr Exley de sa structure de recherche.

Ce retard de traitement des échantillons, se rajoute à celui causé par la pandémie du COVID-19, et aux doutes liés au futur de notre collaboration dans le contexte du BREXIT. Ceci nous a mis en difficulté car nos échantillons sont restés bloqués plus de 2 ans en Grande Bretagne. Finalement, nous avons pu récupérer les prélèvements et établir une nouvelle collaboration avec l'École Normale Supérieure (ENS) de Lyon pour un nouveau dosage de l'aluminium auquel nous avons pu obtenir la quantification de plusieurs autres éléments sur les mêmes échantillons (Plomb, Cadmium, Magnésium, Mercure etc...). Nous gardons précieusement ces résultats pour une analyse future.

Nous avons également été confronté à une contamination par nos milieux de préparation de sperme, notamment le PureSperm®, que nous n'avons pas pu détecter à temps du fait des retards dans les dosages qui devaient être réalisés par le Pr Exley. Dans ce contexte, les résultats d'aluminium au niveau du plasma séminal et de la préparation finale des spermatozoïdes n'ont malheureusement pas été exploités. Par conséquent, nous avons été forcés de ne prendre en compte que les résultats du dosage au niveau du sperme total. Nous regrettons cela car ces dosages faisaient partie des objectifs prévus initialement dans notre projet.

Par ailleurs, nous n'avons, en l'état actuel, pas encore mis en place d'analyse de routine de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dans notre laboratoire. De ce fait, les mesures ont été réalisées après une période de conservation assez variable qui dépend, à la fois, de la disponibilité de l'automate, de Madame Odile Sabido pour la mise en œuvre de l'appareil et l'interprétation des résultats, et de moi-même pour les techniques de préparation avant

passage en cytométrie en flux. Nous avons défini comme délai maximal 3 semaines (durée validée par nos tests) entre la conservation des spermatozoïdes et la mesure de la fragmentation d'ADN, que nous nous sommes efforcés de respecter dans la mesure du possible.

Une autre difficulté que nous avons rencontrée lors de ce travail a été causée par notre automate de mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Après une sérieuse panne l'ayant mis en réforme, nous avons dû refaire des tests sur un nouvel automate, dans un autre site, pour vérifier la compatibilité des nouveaux résultats avec ceux obtenus avec l'utilisation de l'ancien. Ces vérifications ont été concluantes et nous avons pu finalement terminer les analyses.

Enfin, et à l'instar de beaucoup d'équipes de recherche, nous avons dû accepter des compromis pour mener ce travail à terme. En effet, nous avons prévu initialement de n'inclure que les patients ayant donné leur consentement, rempli le questionnaire d'exposition et dont le prélèvement obtenu pour la première tentative d'IAC était exploitable pour nos analyses. Cependant, après avoir inclus 240 patients, nous n'avons pu obtenir qu'une trentaine de prélèvements exploitables. De ce fait nous avons décidé d'élargir l'inclusion aux tentatives suivantes d'insémination. Ce compromis pourrait lui aussi représenter une limite de ce travail car, par définition, les couples revenant pour une tentative d'IAC en plus n'auraient pas obtenu une grossesse lors de la première. Cela renforce le biais de sélection déjà évoqué dans la discussion de l'article.

Un autre compromis que nous avons dû concéder a été l'abandon de la technique de mesure de la méthylation de l'ADN spermatique prévue initialement dans nos objectifs secondaires, à cause d'une dégradation cellulaire importante induite par l'acide chlorhydrique (HCl). En effet, une étape de dénaturation de l'ADN nécessitant le traitement des spermatozoïdes à l'HCl est indispensable pour que les anticorps fluorescents atteignent les sites de méthylation. Après de multiples essais, l'importante quantité de débris ne nous permettait pas de quantifier le taux de méthylation et nos tentatives à répétition de trouver le dosage adéquat du HCl ont toutes été infructueuses. De plus, la validation de la technique s'est avérée assez délicate en l'absence d'un contrôle positif. Malgré la description de cette technique par Benchaib et al.³⁶² puis par d'autres équipes³⁶³⁻³⁶⁵ aucun cytogramme n'a été présenté dans ces publications, et nos sollicitations d'aide pour la mise en place de cette techniques sont restées sans réponses.

Quid de l'intégrité scientifique ?

En préambule, nous avons voulu rédiger une revue systématique de la littérature scientifique explorant la reprotoxicité masculine de l'aluminium. L'essence même d'une revue systématique de la littérature est de faire une synthèse rigoureuse, structurée et reproductible de la connaissance scientifique, afin de répondre, précisément à une question de recherche. Ceci passe par un repérage des biais et l'exclusion des articles pour lesquels ces biais impactent significativement les conclusions relayées.

D'expérience, nous savions d'emblée que nous serions confrontés à un certain nombre d'études ayant une méthodologie, des résultats ou des conclusions douteuses. Mais au fil de nos lectures des articles scientifiques en vue de leur inclusion dans notre analyse finale, nous avons été surpris par le nombre considérable d'articles peu dignes de confiance publiés sur le sujet et nous avons dû exclure plus de la moitié des articles retenus pour une lecture complète en raison des doutes sur leur fiabilité.

Nous nous retrouvons malheureusement dans un contexte où la course à la nouveauté et l'introduction d'une logique concurrentielle renforcée multiplient les risques de dérive. En tant que scientifiques, nous disposons de moyens et de connaissances nous permettant du juger, à leur juste valeur, les travaux qui nous sont proposés. Cependant, mon expérience personnelle de première revue systématique m'a appris que cela reste un exercice très compliqué. En effet, parmi la centaine d'articles que j'aurais inclus le Dr Klein a éliminé la majorité pour manque de fiabilité. Cette aventure, très enrichissante au demeurant, m'inspire plus de doute et de la méfiance vis-à-vis de l'information scientifique.

Seulement, le risque lié à cette course à la publication pourrait avoir des conséquences plus graves, dont la perte de confiance du public non scientifique. En septembre 2021, l'enquête spéciale Eurobaromètre 516³⁶⁶ sur les connaissances et les attitudes des citoyens européens à l'égard de la science et de la technologie a révélé que 86% des citoyens pensent que la science et la technologie exercent une influence globalement positive sur la société. Si la pandémie de coronavirus a mis en lumière l'importance de la recherche scientifique en tant que fournisseur de solutions aux défis mondiaux, elle a également illustré certains exemples de manquements à l'intégrité scientifique.

La confiance est fondamentale pour garantir une interaction fructueuse au sein de la communauté scientifique ainsi qu'entre celle-ci et la société dans son ensemble. L'intégrité scientifique, définie comme l'adhésion des communautés scientifiques et des professionnels

aux normes d'éthique et de rigueur les plus élevées dans leurs activités de recherche, doit être prise très au sérieux afin de conserver cette confiance.

Un premier effort international visant à favoriser une plus grande intégrité dans la recherche scientifique à l'échelle mondiale a été la Déclaration de Singapour sur l'intégrité de la recherche³⁶⁷. Cette initiative est le produit de l'effort collectif et des idées de 340 personnes de 51 pays et vise à inciter les gouvernements, les organisations et les chercheurs à élaborer des normes, des codes et des politiques pour promouvoir l'intégrité de la recherche, tant au niveau local que mondial. En France, une charte de déontologie des métiers de la recherche a été signée par France Universités à l'initiative de différents organismes de recherche dans l'hexagone. Cette mobilisation a été renforcée par la publication d'un Décret n° 2021-1572 du 3 décembre 2021 relatif au respect des exigences de l'intégrité scientifique par les établissements publics et fondations contribuant au service public de la recherche.

Les scientifiques et chercheurs doivent être capables de prendre des décisions fondées sur une solide compréhension du sujet et de ses implications potentielles pour la science et la société. Depuis 2016, le cadre national des études doctorales en France³⁶⁸ stipule que les écoles doctorales des universités françaises doivent veiller à ce que chaque doctorant reçoive une formation à l'éthique et à l'intégrité de la recherche. Au cours de la formation initiale en médecine, la lecture critique des articles scientifiques fait partie des disciplines enseignées. De plus, durant la formation scientifique à l'Université de Saint-Etienne, les étudiants assistent à un cours sur l'intégrité scientifique à l'année du Master 2, et doivent valider un module national auto-rythmé de 15 heures sur le même sujet durant les années de thèse. Il serait également intéressant d'intégrer une formation théorique accompagnée d'exercices pratiques permettant à l'étudiant d'acquérir les bons réflexes pour dépister les publications douteuses.

Aluminium : un toxique direct du système reproducteur

Au final, au vu de nos résultats et de ceux rapportés par la littérature que sait-on réellement aujourd'hui de la reprotoxicité masculine de l'aluminium ?

Notre analyse expérimentale nous permet raisonnablement de conclure que l'aluminium présent dans le sperme n'entraîne pas clairement une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Cependant, en raison de la contamination des prélèvements de préparation de spermatozoïdes, nous n'avons malheureusement pas étudié le lien entre l'aluminium intra-spermatique et la fragmentation de l'ADN.

Dans ce contexte, deux questions persistent : y a-t-il un lien entre cet aluminium intra-spermatique et la fragmentation d'ADN ? Et en dehors de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est-ce que cet aluminium est responsable d'autres mécanismes biologiques à effet délétère sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes ?

Avant même de connaître les résultats de nos travaux nous avons anticipé cette dernière question, et nous avons initié, en parallèle, de ce travail, un projet de recherche afin d'explorer un éventuel lien entre la concentration de l'aluminium et une augmentation du stress oxydant au niveau des spermatozoïdes. Ce travail a pour objectif de mesurer les taux de ROS spermatiques chez les patients de notre étude et d'évaluer la corrélation de ces taux avec les concentrations dosées de l'aluminium au niveau du sperme. Ce projet de Master 2 sera probablement poursuivi dans le cadre d'une future thèse au sein de notre équipe.

A première vue, les résultats de notre revue de la littérature peuvent être considérés peu éloquents en comparaison avec les effets spectaculaires décrits par de nombreux articles que nous avons exclu. Néanmoins, même après avoir éliminé toutes les études douteuses qui attribuent à l'aluminium une reprotoxicité excessive, les effets sont bel et bien là, et ceci est attesté par de nombreux travaux réalisés rigoureusement par des équipes de recherche crédibles. De plus, que ce soit dans nos travaux expérimentaux ou dans toutes ces études épidémiologiques incluses dans notre revue, nous avons retrouvé le même constat : la quantité d'aluminium observée dans le sperme est bien au-delà des valeurs habituellement retrouvées dans les autres fluides corporels. Ce métal, rappelons-le, n'a aucun rôle biologique bénéfique pour l'organisme hormis la toxicité dont il est capable et que nous avons détaillé dans un chapitre dédié.

L'ensemble de ces données nous amène à penser que l'aluminium pourrait être un des nombreux facteurs à l'origine de la diminution de la fertilité masculine. Avec ces résultats, il est légitime de le considérer comme un facteur direct responsable d'une diminution de la numération des spermatozoïdes et comme un cofacteur qui s'ajoute aux différents autres agents environnementaux exerçant un effet cocktail sur la fertilité. Forts de ces conclusions nous rejoignons les nombreux scientifiques qui appellent à une meilleure maîtrise de l'exposition environnementale à l'aluminium.

Comme nous l'avons évoqué auparavant, ce métal est omniprésent dans notre environnement et notre exposition est inévitable. Toutefois, il serait raisonnable de proposer des solutions pour la limiter, surtout dans un contexte où la natalité est en constante baisse.

En février 2022, le Pr Samir Hamamah, responsable du département de Biologie de la Reproduction du CHU de Montpellier a remis au ministre de la Santé, Olivier Véran, un plan de lutte contre l'infertilité. Ce document de 137 pages publié par le ministère des solidarités et de la santé, est intitulé « rapport sur les causes de l'infertilité ». Ce document comporte des propositions d'actions concrètes, afin d'engager une démarche active et coordonnée en France et notre travail s'inscrit parfaitement dans cette philosophie. La prévention de l'infertilité ne doit pas se concevoir au niveau individuel uniquement. Elle doit aussi comporter un volet collectif, social et politique. Ce qui nous amène à la question des normes d'exposition à l'aluminium en France et dans le monde, sont-ils, de nos jours, adaptés au degré de la toxicité d'aluminium ?

Considérons d'abord les normes aux États-Unis. En ce qui concerne l'exposition professionnelle, la limite d'exposition à l'aluminium est fixée à 15 mg/m³ de poussière totale et 5 mg/m³ de fraction respirable d'aluminium dans les poussières en moyenne sur une journée de travail de 8 heures. Pour l'alimentation, les valeurs limites d'aluminium tolérables peuvent aller jusqu'à 0.2mg dans l'eau du robinet et les bouteilles d'eau minérale. Pour le reste, La *Food and Drugs Association* (FDA) considère que l'aluminium utilisé comme additif alimentaire et dans les médicaments tels que les antiacides est généralement sans danger.³⁶⁹

De même qu'aux États-Unis, en France la réglementation concernant la concentration maximum d'aluminium dans l'eau à 0,2mg/l, en pratique celle-ci dépasse rarement 0,05 mg/l, pour des raisons sanitaires et de goût. Avant 2008, la dose hebdomadaire tolérable recommandée par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) était de 7mg/kg de poids corporel³⁷⁰. Aujourd'hui, le seuil est de 1 mg/kg de poids corporel par semaine³⁴¹. Pour un adulte d'une soixantaine de kilos, cela représente 8,5 mg/j. En milieu professionnel, la valeur limite moyenne d'exposition est de 5 mg/m³ pour les poussières inhalables et 10 mg/m³ pour les poussières totales.

L'apport humain moyen en aluminium a été calculé entre 14 et 105 mg d'aluminium par semaine pour un adulte de 70 kg³⁷¹. En cas d'administration de médicaments, cet apport peut atteindre 50 à 1 000 mg/jour³⁷².

En dehors de l'exposition professionnelle, nous pensons que la baisse des limites tolérables d'exposition à l'aluminium ne serait pas en mesure de la diminuer de manière considérable.

En termes d'apport alimentaire, l'homme semble dépasser les limites fixées par la réglementation. La baisse de l'exposition à l'aluminium passerait peut-être par l'arrêt des additifs alimentaires et le développement d'alternatives à l'aluminium utilisé au quotidien.

Existe-t-il des alternatives à l'aluminium ?

Les rapports, de plus en plus nombreux, sur la toxicité de l'aluminium ont motivé le développement de plusieurs alternatives à ce métal dans différents domaines. Ainsi, au niveau de l'industrie du transport, les composites peuvent remplacer l'aluminium dans les fuselages et les ailes des avions, de même, les composites, le magnésium, l'acier et le titane peuvent remplacer l'aluminium dans les transports terrestres⁸⁵. Dans le domaine la construction, les composites, l'acier, le vinyle et le bois peuvent remplacer l'aluminium. Il est à noter qu'une société bretonne de menuiserie propose, depuis peu, de fenêtres conçues en polymère organique laqué à la place de l'aluminium. De la même manière, dans le domaine de l'emballage, une autre société, américaine cette fois, propose une alternative aux aérosols en aluminium. Un premier aérosol entièrement en plastique sera commercialisé courant 2024. Il sera composé principalement de polyéthylène téréphtalate (PET) (le plastique des bouteilles d'eau). Les industriels de l'agro-alimentaire ont également compris cette demande, l'entreprise Nespresso, fleuron du café haut de gamme, a lancé des capsules en papier à la place de l'aluminium. De la même manière, Tetra Pak, fabricant international d'emballages alimentaires a annoncé qu'il lancera des briques sans aluminium en 2025.

En cosmétique, un déodorant est un produit destiné à limiter ou à masquer les mauvaises odeurs corporelles liées à la transpiration. À ne pas confondre avec les antitranspirants (ou antiperspirants), dont le mode d'action et les formules sont bien différents. Si les antitranspirants sans aluminium sont quasiment introuvables, les déodorants sans sels d'aluminium se généralisent en grande distribution. L'entreprise Narta, leader historique de l'antitranspirant a lancé un déodorant formulé avec de l'oxyde de magnésium promettant une efficacité comparable à celle des antitranspirants. Il est à noter qu'en pharmacie, les premiers "gels douche déodorants" commencent à faire leur apparition, l'usage de ces produits pourrait aider à limiter le risque d'exposition cosmétique à l'aluminium.

Au quotidien, l'aluminium peut facilement être remplacé par d'autres protections pratiques pour conserver les aliments : emballage en cire d'abeille ou « Bee wrap », bocaux en verre ou

boîtes hermétiques... d'autre part, les antiacides contenant du carbonate de calcium, ou du bicarbonate de sodium, comme le Gaviscon et l'alginate, sont une bonne alternative pour les patients ayant besoin de traitement antiacide. Des mesures hygiéno-diététiques simples peuvent également aider à réduire la consommation de ces médicaments.

Enfin, a quand les vaccins sans aluminium ? l'aluminium est un puissant agent pro-inflammatoire. Il est utilisé dans les vaccins depuis les années 1930 pour améliorer la réponse immunitaire, et cet usage est au cœur d'une grande polémique qui dépasse le cadre de ce travail. Sans prendre position, il nous semble intéressant d'étudier des alternatives à l'aluminium dans les vaccins. Nous pensons, par exemple, au phosphate de calcium.

Perspectives et conclusion :

Ce travail, malgré ses limites, apporte une réelle contribution sur la toxicité de l'aluminium. Nous démontrons que l'aluminium est toxique sur la fertilité masculine et, dans ce contexte, nous ne pouvons pas nous empêcher de nous demander qu'en est-il de la fertilité féminine ? la rédaction du texte de cette thèse est concomitante à la campagne de l'octobre rose. A cette occasion, rappelons que le lien entre l'aluminium et le cancer de sein est de plus en plus suspecté. Ce même aluminium est-il capable d'induire des perturbations hormonales ou cellulaires en lien avec une baisse de la fertilité féminine ? il nous paraît légitime d'étudier cette question plus en profondeur. D'autant que lors de notre recherche bibliographique nous n'avons pas rencontré beaucoup d'études traitant ce sujet.

Au niveau du centre de ressources biologiques du CHU de Saint-Etienne, nous avons gardé, quelques milliers de prélèvements de liquide folliculaire des patientes admises dans le cadre d'un Programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) intitulé « Prévalence des papillomavirus humains en Assistance Médicale à la Procréation et leur impact sur les résultats en fécondation in vitro : étude AMPAMAVIR ». Dans l'idéal, nous pourrions lancer un projet de recherche pour explorer un éventuel lien entre l'aluminium au niveau de l'ovaire et l'exposition environnementale des patientes. Nous pourrions également, le cas échéant, rechercher une probable altération de la fertilité en lien avec cet aluminium.

Dans un autre registre, une étude d'exposition sur des modèles de culture de cellules germinales humaines (issus par exemple de prélèvement de biopsie testiculaire) serait une voie très intéressante à la découverte des différents mécanismes de toxicité de l'aluminium

intra-testiculaire. De nombreux travaux ont déjà utilisé ces modèles pour étudier les effets de certains autres polluants³⁷³. Plus simple encore, nous recevons dans notre laboratoire des fragments de biopsie testiculaire pour nos patients azoospermes. Notre collaboration avec l'ENS de Lyon nous permettrait d'effectuer des dosages d'aluminium sur les reliquats de ces fragments afin d'étudier à plus grande échelle l'exposition environnementale grâce à notre questionnaire d'exposition. Enfin, les résultats de notre analyse expérimentale nous encouragent à poursuivre le projet de recherche d'un lien entre l'aluminium et le stress oxydant au niveau du spermatozoïde.

En conclusion nous n'avons, au terme de ce travail pas pu conclure à une innocuité de l'aluminium pour la fertilité masculine, bien au contraire. Cet aluminium est présent dans le testicule et participe activement à la perturbation de la fertilité même aux doses auxquelles la population est habituellement exposée. Rappelons qu'une étude menée par 60 millions de consommateurs a rapporté que la moitié des laits en poudre commercialisés en France contient de l'aluminium. Concrètement, cela signifie qu'un nourrisson de six mois consommant 4 biberons de 210 ml/jour ingère 897 µg d'aluminium par semaine s'il boit du lait 1er âge. Cet exemple montre à quel point l'exposition à l'aluminium est importante et devrait nous alerter sur la quantité d'aluminium à laquelle l'Homme est exposé à tout âge.

A la lumière de tout ce que nous avons appris grâce à ce travail, nous appelons à un contrôle plus strict de l'exposition à l'aluminium notamment alimentaire. La consommation d'aliments contenant de l'aluminium doit être limitée au strict nécessaire et nous pensons qu'il serait opportun d'interdire les additifs alimentaires contenant de l'aluminium.

Références bibliographiques

1. Espenshade, T. J., Guzman, J. C. & Westoff, C. F. The Surprising Global Variation in Replacement Fertility. *Population Research and Policy Review* **22**, 575–583 (2003).
2. Leridon, H. & Slama, R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Human Reproduction* **23**, 1312–1319 (2008).
3. Ogura, S. & Jakovljevic, M. M. Editorial: Global Population Aging - Health Care, Social and Economic Consequences. *Front Public Health* **6**, 335 (2018).
4. Zegers-Hochschild, F. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility* **92**, 1520–1524 (2009).
5. Inhorn, M. C. & Patrizio, P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update* **21**, 411–426 (2015).
6. Hamamah, P. S. & Berlioux, M. S. Rapport sur les causes d'infertilité.
7. ESHRE Capri Workshop Group. Europe the continent with the lowest fertility. *Hum Reprod Update* **16**, 590–602 (2010).
8. Belgherbi, S. & De La Rochebrochard, E. Can men be trusted in population-based surveys to report couples' medical care for infertility? *BMC Med Res Methodol* **18**, 111 (2018).
9. Raatikainen, K., Harju, M., Hippeläinen, M. & Heinonen, S. Prolonged time to pregnancy is associated with a greater risk of adverse outcomes. *Fertility and Sterility* **94**, 1148–1151 (2010).
10. Basso, O. Subfecundity as a Correlate of Preeclampsia: A Study within the Danish National Birth Cohort. *American Journal of Epidemiology* **157**, 195–202 (2003).
11. Buck Louis, G. M., Cooney, M. A. & Peterson, C. M. The ovarian dysgenesis syndrome. *J Dev Orig Health Dis* **2**, 25–35 (2011).
12. Wolf, D. A., Lee, R. D., Miller, T., Donehower, G. & Genest, A. Fiscal Externalities of Becoming a Parent. *Population and Development Review* **37**, 241–266 (2011).
13. Bitler, M. & Schmidt, L. Health disparities and infertility: impacts of state-level insurance mandates. *Fertility and Sterility* **85**, 858–865 (2006).
14. Holter, H., Anderheim, L., Bergh, C. & Möller, A. The psychological influence of gender infertility diagnoses among men about to start IVF or ICSI treatment using their own sperm. *Hum. Reprod.* **22**, 2559–2565 (2007).
15. Cook, E. P. Characteristics of the Biopsychosocial Crisis of Infertility. *Journal of Counseling & Development* **65**, 465–470 (1987).
16. Kirca, N. & Pasinlioglu, T. Psychosocial Problems in Infertility Treatment. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry* **5**, 162 (2013).
17. Boivin, J. A review of psychosocial interventions in infertility. *Social Science & Medicine* **57**, 2325–2341 (2003).
18. Bellone, M., Rigot, J.-M., Cottencin, O. & Goudemand, M. Retentissement sexuel, conjugal et social d'une population d'hommes stériles consultants en Andrologie: le point de vue du psychiatre de liaison. *Androl.* **13**, 435–444 (2003).
19. Lenzi, A., Lombardo, F., Salacone, P., Gandini, L. & Jannini, E. A. Stress, sexual dysfunctions, and male infertility. *J. Endocrinol. Invest.* **26**, 72–76 (2003).
20. Hart, R. J. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological Reviews* **96**, 873–909 (2016).
21. Juul, S. Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. *Human Reproduction* **14**, 1250–1254 (1999).

22. Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertility and Sterility* **90**, S154–S155 (2008).
23. Thoma, M. E. *et al.* Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and Sterility* **99**, 1324–1331.e1 (2013).
24. Wang, C. & Swerdloff, R. S. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility* **102**, 1502–1507 (2014).
25. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* (World Health Organization, 2010).
26. Skakkebaek, N. E. *et al.* Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological Reviews* **96**, 55–97 (2016).
27. Jensen, T. K., Jacobsen, R., Christensen, K., Nielsen, N. C. & Bostofte, E. Good Semen Quality and Life Expectancy: A Cohort Study of 43,277 Men. *American Journal of Epidemiology* **170**, 559–565 (2009).
28. Eisenberg, M. L. *et al.* Semen quality, infertility and mortality in the USA. *Human Reproduction* **29**, 1567–1574 (2014).
29. Eisenberg, M. L., Li, S., Cullen, M. R. & Baker, L. C. Increased risk of incident chronic medical conditions in infertile men: analysis of United States claims data. *Fertility and Sterility* **105**, 629–636 (2016).
30. Bloom, M. S. *et al.* Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. *Hum. Reprod.* **30**, 2645–2657 (2015).
31. Gore, A. C. *et al.* Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society’s Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews* **36**, 593–602 (2015).
32. Nordkap, L., Joensen, U. N., Blomberg Jensen, M. & Jørgensen, N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Molecular and Cellular Endocrinology* **355**, 221–230 (2012).
33. Nelson, C. M. K. & Bunge, R. G. Semen Analysis: Evidence for Changing Parameters of Male Fertility Potential. *Fertility and Sterility* **25**, 503–507 (1974).
34. Leto, S. & Frensilli, F. J. Changing parameters of donor semen. *Fertility and Sterility* **36**, 766–770 (1981).
35. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609–613 (1992).
36. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* **23**, 646–659 (2017).
37. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Human Reproduction Update* **29**, 157–176 (2023).
38. Lv, M.-Q. *et al.* Temporal trends in semen concentration and count among 327 373 Chinese healthy men from 1981 to 2019: a systematic review. *Human Reproduction* **36**, 1751–1775 (2021).
39. Winters, B. R. & Walsh, T. J. The Epidemiology of Male Infertility. *Urologic Clinics of North America* **41**, 195–204 (2014).
40. Hauser, R. *et al.* Male Reproductive Disorders, Diseases, and Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **100**, 1267–1277 (2015).
41. Levine, H. *et al.* Male reproductive health statement (XIIIth international symposium on Spermatology, may 9th–12th 2018, Stockholm, Sweden. *Basic Clin Androl* **28**, 13 (2018).

42. Auger, J., Eustache, F., Chevrier, C. & Jégou, B. Spatiotemporal trends in human semen quality. *Nat Rev Urol* **19**, 597–626 (2022).
43. Mann, U., Shiff, B. & Patel, P. Reasons for worldwide decline in male fertility. *Current Opinion in Urology* **30**, 296 (2020).
44. Virtanen, H. E., Jørgensen, N. & Toppari, J. Semen quality in the 21st century. *Nat Rev Urol* **14**, 120–130 (2017).
45. Lymperi, S. & Giwercman, A. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism Clinical and Experimental* (2018).
46. Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* **30**, 293–342 (2009).
47. Toyama, Y. & Yuasa, S. Effects of neonatal administration of 17 β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reproductive Toxicology* **19**, 181–188 (2004).
48. Richter, C. A. *et al.* In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology* **24**, 199–224 (2007).
49. Park, J. D., Habeebu, S. S. M. & Klaassen, C. D. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague–Dawley rats. *Toxicology* **171**, 105–115 (2002).
50. Kilcoyne, K. R. & Mitchell, R. T. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data. *Human Reproduction Update* **25**, 397–421 (2019).
51. Scheen, A. & Giet, D. RÔLE DE L'ENVIRONNEMENT DANS LES MALADIES COMPLEXES : pollution atmosphérique et contaminants alimentaires. *Revue médicale de Liège* (2012).
52. Rashid, H., Alqahtani, S. S. & Alshahrani, S. Diet: A Source of Endocrine Disruptors. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **20**, 633–645 (2020).
53. Melough, M. M., Maffini, M. V., Otten, J. J. & Sathyanarayana, S. Diet quality and exposure to endocrine-disrupting chemicals among US adults. *Environ Res* **211**, 113049 (2022).
54. Skoračka, K., Eder, P., Łykowska-Szuber, L., Dobrowolska, A. & Krela-Kaźmierczak, I. Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility—Underestimated Factors. *JCM* **9**, 1400 (2020).
55. Ferramosca, A. & Zara, V. Diet and Male Fertility: The Impact of Nutrients and Antioxidants on Sperm Energetic Metabolism. *IJMS* **23**, 2542 (2022).
56. Arab, A., Rafie, N., Mansourian, M., Miraghajani, M. & Hajianfar, H. Dietary patterns and semen quality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Andrology* **6**, 20–28 (2018).
57. Sermondade, N. *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* **19**, 221–231 (2013).
58. Borgerding, M. & Klus, H. Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* **57 Suppl 1**, 43–73 (2005).
59. Vine, M. F. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* **19**, 323–337 (1996).
60. Asare-Anane, H. *et al.* Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reprod Health* **13**, 90 (2016).
61. Dai, J.-B., Wang, Z.-X. & Qiao, Z.-D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl* **17**, 954–960 (2015).
62. du Plessis, S. S., Agarwal, A. & Syriac, A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet* **32**, 1575–1588 (2015).
63. Kucheria, K., Saxena, R. & Mohan, D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. *Andrologia* **17**, 558–563 (1985).

64. Li, Y., Lin, H., Li, Y. & Cao, J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* **95**, 116–123 (2011).
65. Semet, M. *et al.* The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology* **5**, 640–663 (2017).
66. Mieusset, R. & Bujan, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal of Andrology* **18**, 169–184 (1995).
67. Zhu, B., Walker, S. K., Oakey, H., Setchell, B. P. & Maddocks, S. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* **36**, 384–394 (2004).
68. Yin, Y., Hawkins, K. L., Dewolf, W. C. & Morgentaler, A. Heat Stress Causes Testicular Germ Cell Apoptosis in Adult Mice. *Journal of Andrology* **18**, 159–165 (1997).
69. Pérez-Crespo, M., Pintado, B. & Gutiérrez-Adán, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 40–47 (2008).
70. Yaeram, J., Setchell, B. P. & Maddocks, S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**, 647–653 (2006).
71. Code de la santé publique - Article L2141-2.
72. Chandra, A., Copen, C. E. & Stephen, E. H. Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010. *Natl Health Stat Report* 1–21 (2014).
73. Ben Messaoud, K., Bouyer, J. & de La Rochebrochard, E. Infertility Treatment in France, 2008–2017: A Challenge of Growing Treatment Needs at Older Ages. *Am J Public Health* **110**, 1418–1420 (2020).
74. de La Rochebrochard, É. 1 enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France. *Population & Sociétés* N° **556**, 1 (2018).
75. Cousineau, T. M. & Domar, A. D. Psychological impact of infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **21**, 293–308 (2007).
76. Boomsma, C. M., Heineman, M. J., Cohlen, B. J. & Farquhar, C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2007) doi:10.1002/14651858.CD004507.pub3.
77. *Encyclopedia of toxicology*. (Academic Press, 2014).
78. Plateau, J. Un texte fondateur de Henri Sainte-Claire Deville relatif à l'aluminium : la note aux comptes rendus de l'Académie des sciences du 6 février 1854. *bibnum* (2008) doi:10.4000/bibnum.437.
79. Siquin, J. De l'aluminium en Chine au IIIe siècle ! La « ceinture de Nanjing »: *Cahiers d'histoire de l'aluminium* n° **64**, 112–117 (2021).
80. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*,. vol. Vol. 3 (May 1852–May 1857).
81. Bourgarit, D. & Plateau, J. Quand l'aluminium valait de l'or : peut-on reconnaître un aluminium « chimique » d'un aluminium « électrolytique » ? *archeosciences* 95–105 (2005) doi:10.4000/archeosciences.560.
82. Laparra, M. Les faux jumeaux de l'aluminium. Charles Martin Hall et Paul Héroult, leurs premières recherches et leurs premiers choix technologiques. *Cahiers d'histoire de l'aluminium* **48**, 84 (2012).
83. Grinberg, I. & Plateau, J. Le brevet de Paul Héroult pour un procédé électrolytique de préparation d'aluminium. *bibnum* (2009) doi:10.4000/bibnum.664.
84. Cullen, J. M. & Allwood, J. M. Mapping the global flow of aluminum: from liquid aluminum to end-use goods. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 3057–3064 (2013).

85. *Mineral commodity summaries 2023*. <https://pubs.usgs.gov/publication/mcs2023> (2023) doi:10.3133/mcs2023.
86. Marechal, J.-P. L'Accord de Paris : un tournant décisif dans la lutte contre le changement climatique ? *Géoéconomie* **78**, 113 (2016).
87. Xiao, Y., Reuter, M. A. & Boin, Udo. Aluminium Recycling and Environmental Issues of Salt Slag Treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **40**, 1861–1875 (2005).
88. Opportunities for aluminium in a post-Covid economy. (2022).
89. Goullé, J.-P. & Grangeot-Keros, L. Aluminum and vaccines: Current state of knowledge. *Médecine et Maladies Infectieuses* **50**, 16–21 (2020).
90. Krupińska, I. Aluminium Drinking Water Treatment Residuals and Their Toxic Impact on Human Health. *Molecules* **25**, 641 (2020).
91. Exley, C. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts* **15**, 1807–1816 (2013).
92. Crisponi, G., Nurchi, V. M., Bertolasi, V., Remelli, M. & Faa, G. Chelating agents for human diseases related to aluminium overload. *Coordination Chemistry Reviews* **256**, 89–104 (2012).
93. Klotz, K. *et al.* The Health Effects of Aluminum Exposure. *Deutsches Ärzteblatt international* (2017) doi:10.3238/arztebl.2017.0653.
94. Skalny, A. V. *et al.* Assessment of hair metal levels in aluminium plant workers using scalp hair ICP-DRC-MS analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **50**, 658–663 (2018).
95. Tamada, T. Fluorimetric determination of aluminum in human serum and whole blood. *BUNSEKI KAGAKU* **53**, 435–440 (2004).
96. Genuis, S. J., Birkholz, D., Rodushkin, I. & Beesoon, S. Blood, urine, and sweat (BUS) study: monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 344–357 (2011).
97. Newton, D. & Talbot, R. Long-term retention of injected aluminium-26. *Hum Exp Toxicol* **31**, 1195–1198 (2012).
98. Davenport, S. *et al.* Silicon-Rich Mineral Water as a Non-Invasive Test of the 'Aluminum Hypothesis' in Alzheimer's Disease. *JAD* **33**, 423–430 (2012).
99. Roos, P. M., Vesterberg, O., Syversen, T., Flaten, T. P. & Nordberg, M. Metal Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Blood Plasma from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biol Trace Elem Res* **151**, 159–170 (2013).
100. Hovatta, O. *et al.* Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Human Reproduction* **13**, 115–119 (1998).
101. Klein, J. P., Mold, M., Mery, L., Cottier, M. & Exley, C. Aluminum content of human semen: Implications for semen quality. *Reproductive Toxicology* **50**, 43–48 (2014).
102. House, E., Esiri, M., Forster, G., Ince, P. G. & Exley, C. Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the medical research council's cognitive function and ageing study. *Metallomics* **4**, 56–65 (2012).
103. Exley, C. & House, E. R. Aluminium in the human brain. *Monatsh Chem* **142**, 357–363 (2011).
104. Yokel, R. A. & McNamara, P. J. Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview. 9.
105. *Encyclopedia of human nutrition*. (Elsevier/Academic Press, 2005).
106. Wesdock, J. C. & Arnold, I. M. F. Occupational and environmental health in the aluminum industry: key points for health practitioners. *J Occup Environ Med* **56**, S5-11 (2014).

107. Polizzi, S., Ferrara, M., Bugiani, M., Barbero, D. & Baccolo, T. Aluminium and iron air pollution near an iron casting and aluminium foundry in Turin district (Italy). *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 1339–1343 (2007).
108. Kandimalla, R., Vallamkondu, J., Corgiat, E. B. & Gill, K. D. Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development. *Brain Pathology* **26**, 139–154 (2016).
109. L Ingerman. ATSDR Aluminum Tox Profile. (2008).
110. Priest, N. D., Skybakmoen, E. & Jackson, G. The bioavailability of ingested ²⁶Al-labelled aluminium and aluminium compounds in the rat. *NeuroToxicology* **83**, 179–185 (2021).
111. Tria, J., Butler, E. C. V., Haddad, P. R. & Bowie, A. R. Determination of aluminium in natural water samples. *Analytica Chimica Acta* **588**, 153–165 (2007).
112. Allain, P., Gauchard, F. & Krari, N. Enhancement of aluminum digestive absorption by fluoride in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **91**, 225–231 (1996).
113. Priest, N. D. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *J. Environ. Monit.* **6**, 375–403 (2004).
114. Leblanc, J.-C. *et al.* Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. *Food Addit Contam* **22**, 624–641 (2005).
115. Turhan, S. Aluminium contents in baked meats wrapped in aluminium foil. *Meat Science* **74**, 644–647 (2006).
116. Kochian, L. V. *et al.* Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil* **247**, 109–119 (2002).
117. von Uexküll, H. R. & Mutert, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* **171**, 1–15 (1995).
118. Rao, K. S. J. Aluminium content in tea leaves and in differently prepared tea infusions. *Nahrung* **38**, 533–537 (1994).
119. Matsumoto, H., Hirasawa, E., Torikai, H. & Takahashi, E. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant and Cell Physiology* **17**, 127–137 (1976).
120. Flaten, T. P. Aluminium in tea—concentrations, speciation and bioavailability. *Coordination Chemistry Reviews* **228**, 385–395 (2002).
121. Koch, K. R., Pougnet, B., De Villiers, S. & Monteagudo, F. Increased urinary excretion of Al after drinking tea. *Nature* **333**, 122–122 (1988).
122. Exley, C., Begum, A., Woolley, M. P. & Bloor, R. N. Aluminum in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *Am. J. Med.* **119**, 276.e9–11 (2006).
123. Exley, C., Ahmed, U., Polwart, A. & Bloor, R. N. Elevated urinary aluminium in current and past users of illicit heroin. *Addiction Biology* **12**, 197–199 (2007).
124. Margolis, D. J. & Lewis, V. L. A literature assessment of the use of miscellaneous topical agents, growth factors, and skin equivalents for the treatment of pressure ulcers. *Dermatol Surg* **21**, 145–148 (1995).
125. Chan, A. & Ignoffo, R. J. Survey of topical oral solutions for the treatment of chemo-induced oral mucositis. *J Oncol Pharm Pract* **11**, 139–143 (2005).
126. Darbre, P. D. Aluminium and the human breast. *Morphologie* **100**, 65–74 (2016).
127. Becker, L. C. *et al.* Safety Assessment of Alumina and Aluminum Hydroxide as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol* **35**, 16S-33S (2016).
128. Laden, K. *Antiperspirants and Deodorants, Second Edition*,. (CRC Press, 1999).
129. Theodore de Saussure. *Recherches chimiques sur la végétation*.

130. Alfrey, A. C. *et al.* SYNDROME OF DYSPRAXIA AND MULTIFOCAL SEIZURES ASSOCIATED WITH CHRONIC HEMODIALYSIS: *ASAIO Journal* **18**, 257–261 (1972).
131. Alfrey, A. C., LeGendre, G. R. & Kaehny, W. D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* **294**, 184–188 (1976).
132. Perl, D. P. & Brody, A. R. Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science* **208**, 297–299 (1980).
133. Singh, S. *et al.* Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany* **137**, 177–193 (2017).
134. Exley, C. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie* **100**, 51–55 (2016).
135. Brenner, S. Aluminum neurotoxicity is reduced by dantrolene and dimethyl sulfoxide in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Trace Elem Res* **86**, 85–89 (2002).
136. Kaizer, R. R. *et al.* Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem* **99**, 1865–1870 (2005).
137. Cordeiro, J. M., Silva, V. S., Oliveira, C. R. & Gonçalves, P. P. Aluminium-induced impairment of Ca²⁺ modulatory action on GABA transport in brain cortex nerve terminals. *J Inorg Biochem* **97**, 132–142 (2003).
138. Abreo, K., Sella, M., Alvarez-Hernandez, X. & Jain, S. Antioxidants prevent aluminum-induced toxicity in cultured hepatocytes. *J Inorg Biochem* **98**, 1129–1134 (2004).
139. Bondy, S. C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology* **52**, 222–229 (2016).
140. Noremborg, S. *et al.* Silicon Reverses Lipid Peroxidation but not Acetylcholinesterase Activity Induced by Long-Term Exposure to Low Aluminum Levels in Rat Brain Regions. *Biol Trace Elem Res* **169**, 77–85 (2016).
141. Aghilinejad, M., Javad Mousavi, S. A., Nouri, M. K. & Ahmadi, A. B. Work-related musculoskeletal complaints among workers of Iranian aluminum industries. *Arch Environ Occup Health* **67**, 98–102 (2012).
142. Shaaban, L. H., Zayet, H. H., Aboufaddan, H. H. & Elghazally, S. A. Respiratory hazards: clinical and functional assessment in aluminum industry workers. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* **65**, 537–543 (2016).
143. Schmidt, P. M. *et al.* Aluminum exposure for one hour decreases vascular reactivity in conductance and resistance arteries in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **313**, 109–118 (2016).
144. Berihu, B. A. Histological and Functional Effect of Aluminium on Male Reproductive System. **6**, 11 (2015).
145. Sombra, L. L. *et al.* Assessment of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration-flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **30**, 1451–1458 (2003).
146. Cranmer, J. M., Wilkins, J. D., Cannon, D. J. & Smith, L. Fetal-placental-maternal uptake of aluminum in mice following gestational exposure: effect of dose and route of administration. *Neurotoxicology* **7**, 601–608 (1986).
147. Robertson, J. A. *et al.* Animal model of aluminum-induced osteomalacia: role of chronic renal failure. *Kidney Int* **23**, 327–335 (1983).
148. Erazi, H., Sansar, W., Ahboucha, S. & Gamrani, H. Aluminum affects glial system and behavior of rats. *C R Biol* **333**, 23–27 (2010).
149. Zhu, Y. *et al.* Ginsenoside Rb1 alleviates aluminum chloride-induced rat osteoblasts dysfunction. *Toxicology* **368–369**, 183–188 (2016).

150. Nampoothiri, M., Ramalingayya, G. V., Kutty, N. G., Krishnadas, N. & Rao, C. M. Insulin Combined with Glucose Improves Spatial Learning and Memory in Aluminum Chloride-Induced Dementia in Rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **36**, 159–169 (2017).
151. Zahedi-Amiri, Z., Taravati, A. & Hejazian, L. B. Protective Effect of *Rosa damascena* Against Aluminum Chloride-Induced Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res* **187**, 120–127 (2019).
152. Effects of subchronic aluminum exposure on spatial memory, ultrastructure and L-LTP of hippocampus in rats. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/2/38_255/_article/-char/en.
153. SPF, A. Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de la population française à l'aluminium. Eaux, aliments, produits de santé. <https://www.santepubliquefrance.fr/notices/evaluation-des-risques-sanitaires-lies-a-l-exposition-de-la-population-francaise-a-l-aluminium.-eaux-aliments-produits-de-sante>.
154. Ott, S. M. Aluminum - related osteomalacia. *Int J Artif Organs* **6**, 173–175 (1983).
155. Pierides, A. M., Edwards Jr., W. G., Cullum Jr, U. X., McCall, J. T. & Ellis, H. A. Hemodialysis encephalopathy with osteomalacic fractures and muscle weakness. *Kidney International* **18**, 115–124 (1980).
156. Christopher Exley, Ellen Burgess, J. ALUMINUM TOXICOKINETICS. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **48**, 569–584 (1996).
157. Bishop, N. J. *et al.* Increased concentration of aluminium in the brain of a parenterally fed preterm infant. *Arch Dis Child* **64**, 1316–1317 (1989).
158. Bishop, N. J., Morley, R., Day, J. P. & Lucas, A. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1557–1561 (1997).
159. von Stockhausen, H. B., Schrod, L., Brätter, P. & Rösick, U. Aluminium loading in premature infants during intensive care as related to clinical aspects. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* **4**, 209–213 (1990).
160. Aluminum in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition--FDA. Proposed rule. *Fed Regist* **63**, 176–185 (1998).
161. Gourier-Fréry, C. & Fréry, N. Aluminium. *EMC - Toxicologie-Pathologie* **1**, 79–95 (2004).
162. Chianese, R. & Pierantoni, R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants (Basel)* **10**, 92 (2021).
163. Maghraoui, S., Florea, A., Ayadi, A., Matei, H. & Tekaya, L. Changes in Organ Weight, Sperm Quality and Testosterone Levels After Aluminum (Al) and Indium (In) Administration to Wistar Rats. *Biol Trace Elem Res* **201**, 766–775 (2023).
164. Domingo, J. L. Reproductive and developmental toxicity of aluminum: A review. *Neurotoxicology and Teratology* **17**, 515–521 (1995).
165. Mouro, V. G. S. *et al.* How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? *Biological Trace Element Research* **183**, 314–324 (2018).
166. Dawson, E. B., Ritter, S., Harris, W. A., Evans, D. R. & Powell, L. C. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* **64**, 215–219 (1998).
167. Ali, S. *et al.* Mapping Fifteen Trace Elements in Human Seminal Plasma and Sperm DNA. *Biol Trace Elem Res* (2016) doi:10.1007/s12011-016-0772-6.
168. Hovatta, O. *et al.* Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum. Reprod.* **13**, 115–119 (1998).
169. Klein, J. P., Mold, M., Mery, L., Cottier, M. & Exley, C. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. *Reprod. Toxicol.* **50**, 43–48 (2014).
170. Cullen, J. M. & Allwood, J. M. Mapping the Global Flow of Aluminum: From Liquid Aluminum to End-Use Goods. *Environmental Science & Technology* 130311125652007 (2013) doi:10.1021/es304256s.

171. Alfrey, A. C., LeGendre, G. R. & Kaehny, W. D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* **294**, 184–188 (1976).
172. Alfrey, A. C. *et al.* Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **18**, 257–261, 266–267 (1972).
173. Bishop, N. J., Morley, R., Day, J. P. & Lucas, A. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1557–1561 (1997).
174. Gherardi, R. K., Eidi, H., Crépeaux, G., Authier, F. J. & Cadusseau, J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neurol* **6**, 4 (2015).
175. Authier, F.-J. & Gherardi, R. K. [Macrophage mediated myofasciites: current state of knowledge]. *Rev. Neurol. (Paris)* **163**, 985–993 (2007).
176. Ott, S. M. *et al.* Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition. *Ann. Intern. Med.* **98**, 910–914 (1983).
177. Swan, S. H., Elkin, E. P. & Fenster, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.* **105**, 1228–1232 (1997).
178. Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. & Jouannet, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* **332**, 281–285 (1995).
179. de Mouzon, J., Thonneau, P., Spira, A. & Multigner, L. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *BMJ* **313**, 43–45 (1996).
180. Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royère, D. & De Mouzon, J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod.* **28**, 462–470 (2013).
181. Geoffroy-Siraudin, C. *et al.* Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. *Asian J. Androl.* **14**, 584–590 (2012).
182. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum Reprod Update* **29**, 157–176 (2023).
183. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* **23**, 646–659 (2017).
184. Skakkebaek, N. E. *et al.* Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol* **18**, 139–157 (2022).
185. Harris, J. D., Quatman, C. E., Manring, M. M., Siston, R. A. & Flanigan, D. C. How to write a systematic review. *Am J Sports Med* **42**, 2761–2768 (2014).
186. Liberati, A. *et al.* The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *PLoS Med* **6**, (2009).
187. Steegers-Theunissen, R. P. M., Twigt, J., Pestinger, V. & Sinclair, K. D. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. *Human Reproduction Update* **19**, 640–655 (2013).
188. Yokel, R. A. Aluminum reproductive toxicity: a summary and interpretation of scientific reports. *Crit Rev Toxicol* **50**, 551–593 (2020).
189. Van Noorden, R. Medicine is plagued by untrustworthy clinical trials. How many studies are faked or flawed? *Nature* **619**, 454–458 (2023).
190. Behairy, A. *et al.* Quercetin Abates Aluminum Trioxide Nanoparticles and Lead Acetate Induced Altered Sperm Quality, Testicular Oxidative Damage, and Sexual Hormones Disruption in Male Rats. *Antioxidants (Basel)* **11**, 2133 (2022).
191. Wilhelmsson, M. *et al.* Adult testicular volume predicts spermatogenetic recovery after allogeneic HSCT in childhood and adolescence. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 1094–1100 (2014).

192. Suárez-Quian, C., Oke, O. & Vornberger, W. Localisation du récepteur des androgènes dans le testicule. *Andrologie* **7**, 293–304 (1997).
193. Grey, A., Bolland, M. J., Avenell, A., Klein, A. A. & Gunsalus, C. K. Check for publication integrity before misconduct. *Nature* **577**, 167–169 (2020).
194. Bataineh, H., Al-Hamood, M. H. & Elbetieha, A. M. Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. *Hum Exp Toxicol* **17**, 570–576 (1998).
195. da Silva Lima, D. *et al.* Subacute exposure to aluminum chloride causes prolonged morphological insults in the ventral male prostate and in the female prostate of adult gerbils. *Environ Toxicol* **37**, 299–309 (2022).
196. Akinola, O. B. *et al.* Combined effects of chronic hyperglycaemia and oral aluminium intoxication on testicular tissue and some male reproductive parameters in Wistar rats. *Andrologia* **48**, 779–786 (2016).
197. Guo, C.-H., Huang, C.-J., Chen, S.-T. & Wang Hsu, G.-S. Serum and testicular testosterone and nitric oxide products in aluminum-treated mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 53–60 (2001).
198. Guo, C.-H., Huang, C.-J., Chiou, Y.-L. & Hsu, G.-S. W. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biol Trace Elem Res* **86**, 145–157 (2002).
199. Guo, C.-H., Liao, S.-Y., Yuan, C.-Y. & Hsu, G.-S. W. Effects of peritoneal aluminum overload on polyamines and nitric oxide contents of testes and epididymis in the mice. *Environ Toxicol Pharmacol* **21**, 1–7 (2006).
200. Guo, C.-H., Lin, C.-Y., Yeh, M.-S. & Hsu, G.-S. W. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol* **19**, 33–40 (2005).
201. Guo, C.-H., Lu, Y.-F. & Hsu, G.-S. W. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **20**, 135–141 (2005).
202. Gupta, A., Kumar, A., Naqvi, S. & Flora, S. J. S. Chronic exposure to multi-metals on testicular toxicity in rats. *Toxicol Mech Methods* **31**, 53–66 (2021).
203. Sun, H. *et al.* Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats. *Biol Trace Elem Res* **144**, 1050–1058 (2011).
204. Sun, X. *et al.* Aluminum Chloride Causes the Dysfunction of Testes Through Inhibiting the ATPase Enzyme Activities and Gonadotropin Receptor Expression in Rats. *Biol Trace Elem Res* **183**, 296–304 (2018).
205. Zhu, Y. Z. *et al.* Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life Sci.* **102**, 36–40 (2014).
206. Liu, M. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated to protect against testicular damage caused by aluminum. *J Inorg Biochem* **232**, 111840 (2022).
207. Kaur, S. Effects of aluminium chloride on human spermatozoa. *Bull Environ Contam Toxicol* **40**, 444–446 (1988).
208. Kesserü, E. & León, F. Effect of different solid metals and metallic pairs on human sperm motility. *Int J Fertil* **19**, 81–84 (1974).
209. Yokel, R. A. & McNamara, P. J. Elevated aluminum persists in serum and tissues of rabbits after a six-hour infusion. *Toxicol Appl Pharmacol* **99**, 133–138 (1989).
210. Liu, J. Y. & Stemmer, K. L. Interaction between aluminum and zinc or copper and its effects on the pituitary-testicular axis. II. Testicular enzyme and serum gonadotropin assay. *Biomed Environ Sci* **3**, 11–19 (1990).
211. Drummond, J. L., Simon, M. R., Woodman, J. L. & Brown, S. D. Aluminum ion deposition in rat tissues following implantation of a ceramic-metal disc. *Biomater Med Devices Artif Organs* **11**, 147–159 (1983).

212. Llobet, J. M., Colomina, M. T., Sirvent, J. J., Domingo, J. L. & Corbella, J. Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fundam Appl Toxicol* **25**, 45–51 (1995).
213. Martinez, C. S. *et al.* Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. *Reprod. Toxicol.* **73**, 128–141 (2017).
214. D'Souza, S. P., Vijayalaxmi, K. K. & Naik, P. Assessment of genotoxicity of aluminium acetate in bone marrow, male germ cells and fetal liver cells of Swiss albino mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **766**, 16–22 (2014).
215. Dixon, R. L., Sherins, R. J. & Lee, I. P. Assessment of environmental factors affecting male fertility. *Environ Health Perspect* **30**, 53–68 (1979).
216. Gomes, L. da S. *et al.* Neonatal exposure to aluminum chloride disrupts branching morphogenesis and hormonal signaling of the ventral male prostate and female prostate of gerbils. *J Trace Elem Med Biol* **61**, 126559 (2020).
217. da Silva Lima, D. *et al.* Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils. *Exp Mol Pathol* **116**, 104486 (2020).
218. Miska-Schramm, A., Kapusta, J. & Kruczek, M. The Effect of Aluminum Exposure on Reproductive Ability in the Bank Vole (*Myodes glareolus*). *Biol Trace Elem Res* **177**, 97–106 (2017).
219. Hirata-Koizumi, M. *et al.* Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reprod Toxicol* **31**, 219–230 (2011).
220. Maghraoui, S. *et al.* Oxidative stress in blood and testicle of rat following intraperitoneal administration of aluminum and indium. *Acta Physiol Hung* **101**, 47–58 (2014).
221. Hirata-Koizumi, M. *et al.* Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1948–1959 (2011).
222. Mouro, V. G. S. *et al.* How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? *Biol Trace Elem Res* **183**, 314–324 (2018).
223. Pettersen, J. C., Hackett, D. S., Zwicker, G. M. & Sprague, G. L. Twenty-six week toxicity study with KASAL® (basic sodium aluminum phosphate) in beagle dogs. *Environ Geochem Health* **12**, 121–123 (1990).
224. Cannarella, R. *et al.* Testicular volume in 268 children and adolescents followed-up for childhood obesity—a retrospective cross-sectional study. *European Journal of Endocrinology* **188**, 331–342 (2023).
225. Kamboj, V. P. & Kar, A. B. Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. *J. Reprod. Fertil.* **7**, 21–28 (1964).
226. Johnsen, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* **1**, 2–25 (1970).
227. Liu, J. Y. & Stemmer, K. L. Interaction of aluminum with zinc and copper and its effects on pituitary-testicular axis: a histological study. *Biomed Environ Sci* **3**, 1–10 (1990).
228. Dong, C. *et al.* Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450_{scc} of related steroidogenesis in guinea pigs' testis. *Chemosphere* **147**, 345–351 (2016).
229. Maghraoui, S., Florea, A., Ayadi, A., Matei, H. & Tekaya, L. Histological and ultrastructural changes observed in testicles, epididymides, seminal vesicles and liver of rat after intraperitoneal administration of aluminum and indium. *J Trace Elem Med Biol* **73**, 126997 (2022).
230. Han, S. *et al.* How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale. *Cell Biol. Toxicol.* **29**, 75–84 (2013).

231. Chaitanya, T. V. B., Mallipeddi, K., Bondili, J. S. & Nayak, P. Effect of aluminum exposure on superoxide and peroxide handling capacities by liver, kidney, testis and temporal cortex in rat. *Indian J. Biochem. Biophys.* **49**, 395–398 (2012).
232. Wang, J. *et al.* The antagonism of aluminum against fluoride-induced oxidative stress and c-Fos overexpression in rat testes. *Toxicology Mechanisms and Methods* **24**, 136–141 (2014).
233. Rodprasert, W., Toppari, J. & Virtanen, H. E. Endocrine Disrupting Chemicals and Reproductive Health in Boys and Men. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, 706532 (2021).
234. Leal, F. A. V. D. *et al.* Exposure to aluminium chloride during the peripuberal period induces prostate damage in male rats. *Acta Histochem* **124**, 151843 (2022).
235. Maghraoui, S., Florea, A., Ayadi, A., Matei, H. & Tekaya, L. Changes in Organ Weight, Sperm Quality and Testosterone Levels After Aluminum (Al) and Indium (In) Administration to Wistar Rats. *Biol Trace Elem Res* (2022) doi:10.1007/s12011-022-03180-z.
236. Domingo, J. L., Paternain, J. L., Llobet, J. M. & Corbella, J. The effects of aluminium ingestion on reproduction and postnatal survival in rats. *Life Sci* **41**, 1127–1131 (1987).
237. Zelic, O., Dimitrijevic, B., Vasilijevska, M., Dujic, A. & Lekic, P. C. A dental implant: aluminium trioxide exhibited no effect on mouse reproductive and mutagenic potential. *J Clin Periodontol* **25**, 892–896 (1998).
238. Reusche, E., Lindner, B. & Arnholdt, H. Widespread aluminium deposition in extracerebral organ systems of patients with dialysis-associated encephalopathy. *Virchows Arch* **424**, 105–112 (1994).
239. Reusche, E. *et al.* Correlation of drug-related aluminum intake and dialysis treatment with deposition of argyrophilic aluminum-containing inclusions in CNS and in organ systems of patients with dialysis-associated encephalopathy. *Clin Neuropathol* **15**, 342–347 (1996).
240. Klein, J. P., Mold, M., Mery, L., Cottier, M. & Exley, C. Aluminum content of human semen: Implications for semen quality. *Reprod. Toxicol.* **50**, 43–48 (2014).
241. Hovatta, O. *et al.* Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum Reprod* **13**, 115–119 (1998).
242. Dawson, E. B., Ritter, S., Harris, W. A., Evans, D. R. & Powell, L. C. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* **64**, 215–219 (1998).
243. Rodríguez-Díaz, R. *et al.* Influence of Seminal Metals on Assisted Reproduction Outcome. *Biol Trace Elem Res* (2022) doi:10.1007/s12011-022-03256-w.
244. Rodríguez-Díaz, R. *et al.* Associations of Semen Quality with Seminal Non-essential Heavy Metals in Males from the Canary Islands. *Biol Trace Elem Res* **199**, 4525–4534 (2021).
245. Ali, S. *et al.* Mapping Fifteen Trace Elements in Human Seminal Plasma and Sperm DNA. *Biol Trace Elem Res* **175**, 244–253 (2017).
246. Wang, Y.-X. *et al.* Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. *Environ Int* **94**, 177–188 (2016).
247. Valkonen, S. & Aitio, A. Analysis of aluminium in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Sci. Total Environ.* **199**, 103–110 (1997).
248. Dawson, E. B., Evans, D. R., Harris, W. A. & Powell, L. C. Seminal Plasma Trace Metal Levels in Industrial Workers. *BTER* **74**, 97–106 (2000).
249. Klein, J.-P. *et al.* Impact of Nanoparticles on Male Fertility: What Do We Really Know? A Systematic Review. *Int J Mol Sci* **24**, 576 (2022).
250. *Andrology: male reproductive health and dysfunction.* (Springer, 2010).
251. Dadoune, J. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Res & Technique* **61**, 56–75 (2003).

252. O'Donnell, L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* **4**, e979623 (2014).
253. Lin, J. B. & Troyer, D. Testicular Anatomy and Physiology. in *Pathobiology of Human Disease* 2464–2475 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.05102-9.
254. Kossel, A. Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkerns. *bchm* **8**, 511–515 (1884).
255. Miescher, F. Das Protamin, eine neue organische Base aus den Samenfäden des Rheinlachs. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **7**, 376–379 (1874).
256. Braun, R. E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* **28**, 10–12 (2001).
257. Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med* **361**, 1475–1485 (2009).
258. Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. & Renkawitz-Pohl, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1839**, 155–168 (2014).
259. Moustafa, M. H. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction* **19**, 129–138 (2004).
260. Ramos, L., De Boer, P., Meuleman, E., Braat, D. & Wetzels, A. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reproductive BioMedicine Online* **8**, 392–397 (2004).
261. Sakkas, D. *et al.* The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Human Fertility* **7**, 99–103 (2004).
262. Lewis, S. E. M., Agbaje, I. & Alvarez, J. Sperm DNA Tests as Useful Adjuncts to Semen Analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **54**, 111–125 (2008).
263. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **248**, 765–765 (1974).
264. Al Omrani, B. *et al.* Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reprod Biol Endocrinol* **16**, 49 (2018).
265. González-Marín, C., Gosálvez, J. & Roy, R. Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *IJMS* **13**, 14026–14052 (2012).
266. Portella-Ruiz, J. R. & Gonzales-Rengifo, G. F. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecol Obstet Mex* **84**, 462–473 (2017).
267. Sakkas, D. & Alvarez, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* **93**, 1027–1036 (2010).
268. Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* **79**, 829–843 (2003).
269. Blumer, C. G. *et al.* Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and Sterility* **90**, 1716–1722 (2008).
270. Hamilton, T. R. dos S. *et al.* Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction* **151**, 379–390 (2016).
271. Hamilton, T. R. D. S. *et al.* Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 5413056 (2018).
272. Sotolongo, B., Huang, T. T. F., Isenberger, E. & Ward, W. S. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* **26**, 272–280 (2005).

273. Suganuma, R., Yanagimachi, R. & Meistrich, M. L. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* **20**, 3101–3108 (2005).
274. Ganguly, I. *et al.* Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF×Sahiwal) bulls. *Res Vet Sci* **94**, 256–262 (2013).
275. Shukla, K. K., Mahdi, A. A. & Rajender, S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 746–754 (2012).
276. Ribas-Maynou, J. & Benet, J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel)* **10**, 105 (2019).
277. Bungum, M. *et al.* The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* **19**, 1401–1408 (2004).
278. Alshahrani, S. *et al.* Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod Biol Endocrinol* **12**, 103 (2014).
279. Pino, V., Sanz, A., Valdés, N., Crosby, J. & Mackenna, A. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod* **24**, 82–86 (2020).
280. Petersen, C. G. *et al.* The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assist Reprod* **22**, 323–330 (2018).
281. Zorngiotti, A. W. & Macleod, J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* **24**, 854–863 (1973).
282. Goldstein, M. & Eid, J. F. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* **142**, 743–745 (1989).
283. Gallegos, G. *et al.* Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* **90**, 328–334 (2008).
284. Babazadeh, Z. *et al.* Sperm DNA damage and its relation with leukocyte DNA damage. *Reprod Toxicol* **29**, 120–124 (2010).
285. Agarwal, A. *et al.* Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia. *Reprod Biol Endocrinol* **12**, 126 (2014).
286. Marchlewska, K. *et al.* Sperm DNA Fragmentation Index and Hyaluronan Binding Ability in Men from Infertile Couples and Men with Testicular Germ Cell Tumor. *Biomed Res Int* **2016**, 7893961 (2016).
287. Kumar, K. *et al.* Evaluation of sperm DNA quality in men presenting with testicular cancer and lymphoma using alkaline and neutral Comet assays. *Andrology* **6**, 230–235 (2018).
288. Chatterjee, R., Haines, G. A., Perera, D. M., Goldstone, A. & Morris, I. D. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* **15**, 762–766 (2000).
289. Fariello, R. M. *et al.* Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* **110**, 863–867 (2012).
290. Pearce, K. L., Hill, A. & Tremellen, K. P. Obesity related metabolic endotoxemia is associated with oxidative stress and impaired sperm DNA integrity. *Basic Clin Androl* **29**, 6 (2019).
291. Mir, J., Franken, D., Andrabi, S. W., Ashraf, M. & Rao, K. Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men. *Andrologia* (2018) doi:10.1111/and.12957.
292. Agbaje, I. M. *et al.* Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* **22**, 1871–1877 (2007).
293. Karimi, J., Goodarzi, M. T., Tavilani, H., Khodadadi, I. & Amiri, I. Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. *Andrologia* **44 Suppl 1**, 280–286 (2012).

294. Sheynkin, Y., Jung, M., Yoo, P., Schulsinger, D. & Komaroff, E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* **20**, 452–455 (2005).
295. Mieusset, R., Bujan, L., Massat, G., Mansat, A. & Pontonnier, F. Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism. *Hum Reprod* **10**, 613–619 (1995).
296. Bujan, L., Daudin, M., Charlet, J. P., Thonneau, P. & Mieusset, R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod* **15**, 1355–1357 (2000).
297. Paul, C., Murray, A. A., Spears, N. & Saunders, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* **136**, 73–84 (2008).
298. Shiraishi, K., Takihara, H. & Matsuyama, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World J Urol* **28**, 359–364 (2010).
299. Migliore, L. *et al.* Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod* **17**, 2912–2918 (2002).
300. Meeker, J. D. *et al.* Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* **30**, 532–539 (2010).
301. Wijesekara, G. U. S., Fernando, D. M. S., Wijerathna, S. & Bandara, N. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility. *Ceylon Med J* **60**, 52–56 (2015).
302. Desai, N. R., Kesari, K. K. & Agarwal, A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 114 (2009).
303. De Iuliis, G. N., Newey, R. J., King, B. V. & Aitken, R. J. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One* **4**, e6446 (2009).
304. Künzle, R. *et al.* Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* **79**, 287–291 (2003).
305. Calogero, A. *et al.* Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. *Reprod Biomed Online* **19**, 564–571 (2009).
306. Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A. & Esteves, S. C. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol* **70**, 635–645 (2016).
307. Talebi, A. R., Sarcheshmeh, A. A., Khalili, M. A. & Tabibnejad, N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol* **45**, 403–409 (2011).
308. Akang, E. *et al.* Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? *Journal of Experimental and Clinical Anatomy* **16**, 53–53 (2017).
309. Guzick, D. S. *et al.* Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* **345**, 1388–1393 (2001).
310. Simon, L., Emery, B. R. & Carrell, D. T. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **44**, 38–56 (2017).
311. Li, M.-W. & Lloyd, K. C. K. DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Sci Rep* **10**, 3833 (2020).
312. Bungum, M. *et al.* Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI: Spermatozoa DNA damage measured by SCSA. *International Journal of Andrology* **35**, 485–490 (2012).
313. Wang, Q. *et al.* The effect of sperm DNA fragmentation on in vitro fertilization outcomes of unexplained infertility. *Clinics (Sao Paulo)* **78**, 100261 (2023).

314. Tang, L. *et al.* Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* **50**, 101868 (2021).
315. Malić Vončina, S., Stenqvist, A., Bungum, M., Schyman, T. & Giwercman, A. Sperm DNA fragmentation index and cumulative live birth rate in a cohort of 2,713 couples undergoing assisted reproduction treatment. *Fertil Steril* **116**, 1483–1490 (2021).
316. Borini, A. *et al.* Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* **21**, 2876–2881 (2006).
317. Evgeni, E., Lymberopoulos, G., Gazouli, M. & Asimakopoulos, B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **188**, 17–23 (2015).
318. Salehi, M., Afarinesh, M. R., Haghpanah, T., Ghaffari Novin, M. & Farifteh, F. Impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome and incidence of apoptosis of human pre-implantation embryos obtained from in vitro matured MII oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **510**, 110–115 (2019).
319. Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Provenza, R. R., Iaconelli, A. & Borges, E. Oocyte ability to repair sperm DNA fragmentation: the impact of maternal age on intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* **116**, 123–129 (2021).
320. Casanovas, A. *et al.* Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril* **111**, 699-707.e1 (2019).
321. Chen, L., Fang, J., Jiang, W., Wang, J. & Li, D. Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Journal of Ovarian Research* **13**, 52 (2020).
322. Coughlan, C. *et al.* Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl* **17**, 681–685 (2015).
323. Muratori, M. *et al.* Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3624 (2016).
324. McQueen, D. B., Zhang, J. & Robins, J. C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* **112**, 54-60.e3 (2019).
325. Elinder, C. G., Ahrengart, L., Lidums, V., Pettersson, E. & Sjögren, B. Evidence of aluminium accumulation in aluminium welders. *Br J Ind Med* **48**, 735–738 (1991).
326. Dawson, E. B., Evans, D. R., Harris, W. A. & Powell, L. C. Seminal Plasma Trace Metal Levels in Industrial Workers. *BTER* **74**, 97–106 (2000).
327. Valkonen, S. & Aitio, A. Analysis of aluminium in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Sci. Total Environ.* **199**, 103–110 (1997).
328. Guo, C.-H., Liao, S.-Y., Yuan, C.-Y. & Hsu, G.-S. W. Effects of peritoneal aluminum overload on polyamines and nitric oxide contents of testes and epididymis in the mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **21**, 1–7 (2006).
329. Yousef, M. I., El-Morsy, A. M. A. & Hassan, M. S. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology* **215**, 97–107 (2005).
330. Celik, H., Celik, N., Kocyigit, A. & Dikilitas, M. The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. *Clin. Biochem.* **45**, 1629–1633 (2012).
331. Mihaljević, Z., Ternjej, I., Stanković, I., Kerovec, M. & Kopjar, N. Application of the comet assay and detection of DNA damage in haemocytes of medicinal leech affected by aluminium pollution: a case study. *Environ. Pollut.* **157**, 1565–1572 (2009).

332. Murali Achary, V. M. & Panda, B. B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis* **25**, 201–209 (2010).
333. Lankoff, A. *et al.* A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Lett.* **161**, 27–36 (2006).
334. Järup, L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* **68**, 167–182 (2003).
335. Gupta, N., Gaurav, S. S. & Kumar, A. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. *American Journal of Plant Sciences* **2013**, (2013).
336. Cardiano, P. *et al.* Sequestration of Aluminium(III) by different natural and synthetic organic and inorganic ligands in aqueous solution. *Chemosphere* **186**, 535–545 (2017).
337. Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission.; Knovel (Firm). *Codex alimentarius commmission: procedural manual*. (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2010).
338. Exley, C. Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer’s disease? *Mol Med Today* **4**, 107–109 (1998).
339. Gourier-Fréry, C. & Fréry, N. Aluminium. *EMC - Toxicol.-Pathol.* **1**, (2004).
340. *Encyclopedia of Toxicology*. (Academic Press, 2014).
341. European Food Safety Authority (EFSA). Safety of aluminium from dietary intake - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA J* **6**, 754 (2008).
342. ESHRE Capri Workshop Group. Europe the continent with the lowest fertility. *Hum Reprod Update* **16**, 590–602 (2010).
343. Miyamoto, T., Minase, G., Okabe, K., Ueda, H. & Sengoku, K. Male infertility and its genetic causes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **41**, 1501–1505 (2015).
344. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* **23**, 646–659 (2017).
345. Domingo, J. L. Reproductive and developmental toxicity of aluminum: a review. *Neurotoxicol Teratol* **17**, 515–521 (1995).
346. Elinder, C. G., Ahrengart, L., Lidums, V., Pettersson, E. & Sjögren, B. Evidence of aluminium accumulation in aluminium welders. *Br J Ind Med* **48**, 735–738 (1991).
347. Dawson, E. B., Evans, D. R., Harris, W. A. & Powell, L. C. Seminal plasma trace metal levels in industrial workers. *Biol Trace Elem Res* **74**, 97–105 (2000).
348. Dawson, E. B., Ritter, S., Harris, W. A., Evans, D. R. & Powell, L. C. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* **64**, 215–219 (1998).
349. Celik, H., Celik, N., Kocyigit, A. & Dikilitas, M. The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. *Clin. Biochem.* **45**, 1629–1633 (2012).
350. Mihaljević, Z., Ternjej, I., Stanković, I., Kerovec, M. & Kopjar, N. Application of the comet assay and detection of DNA damage in haemocytes of medicinal leech affected by aluminium pollution: a case study. *Environ. Pollut.* **157**, 1565–1572 (2009).
351. Murali Achary, V. M. & Panda, B. B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis* **25**, 201–209 (2010).
352. Lankoff, A. *et al.* A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Lett.* **161**, 27–36 (2006).
353. Spanò, M. *et al.* Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.* **73**, 43–50 (2000).

354. Bungum, M. *et al.* Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* **22**, 174–179 (2007).
355. Robinson, L. *et al.* The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* **27**, 2908–2917 (2012).
356. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* (World Health Organization, 2021).
357. Wilschefski, S. C. & Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev* **40**, 115–133 (2019).
358. Organization, W. H. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.* (World Health Organization, 2010).
359. Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D. & Zhao, H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* **44**, 250–254 (2008).
360. Muriel, L. *et al.* Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* **21**, 738–744 (2006).
361. Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F. & Bleau, G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* **20**, 3446–3451 (2005).
362. Benchaib, M. *et al.* Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* **20**, 768–773 (2005).
363. Barzideh, J., Scott, R. J. & Aitken, R. J. Analysis of the global methylation status of human spermatozoa and its association with the tendency of these cells to enter apoptosis. *Andrologia* **45**, 424–429 (2013).
364. Leter, G. *et al.* Exposure to perfluoroalkyl substances and sperm DNA global methylation in Arctic and European populations. *Environ Mol Mutagen* **55**, 591–600 (2014).
365. Tunc, O. & Tremellen, K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* **26**, 537–544 (2009).
366. Eurobaromètre spécial 516: Connaissances et attitudes des citoyens européens à l'égard de la science et de la technologie - Data Europa EU. https://data.europa.eu/data/datasets/s2237_95_2_516_eng?locale=fr.
367. Resnik, D. B. & Shamoo, A. E. The Singapore Statement on Research Integrity. *Account Res* **18**, 71–75 (2011).
368. *Arrêté du 25 mai 2016 fixant le cadre national de la formation et les modalités conduisant à la délivrance du diplôme national de doctorat.*
369. Aluminum | Public Health Statement | ATSDR. <https://wwwn.cdc.gov/tsp/phs/phs.aspx?phsid=1076&toxid=34>.
370. Evaluation of certain food additives and contaminants : thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9241207760>.
371. Dordevic, D. *et al.* Aluminum contamination of food during culinary preparation: Case study with aluminum foil and consumers' preferences. *Food Science & Nutrition* **7**, 3349–3360 (2019).
372. Cuciureanu, R., Urzică, A., Voitcu, M. & Antoniu, A. [Assessment of daily aluminum intake by food consumption]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* **104**, 107–112 (2000).
373. Fouchet, P. Les effets des polluants sur les cellules souches germinales humaines. *Les cahiers de la Recherche : Santé, Environnement, Travail* **27** (2018).

Résumé

En 2023, une revue systématique de la littérature a fourni pour la première fois des preuves solides d'un déclin mondial du nombre de spermatozoïdes, en contrepartie l'exposition humaine à l'aluminium n'a jamais été aussi importante et ne cesse d'augmenter. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact de l'aluminium sur la fertilité masculine à travers une revue systématique de la littérature et la recherche d'un éventuel lien entre la concentration d'aluminium spermatique et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, chez 80 patients admis pour insémination artificielle au CHU de Saint-Etienne. Les résultats de l'analyse de la littérature ont montré que l'aluminium est capable d'induire une baisse de la numération des spermatozoïdes ainsi que des lésions histologiques au niveau testiculaire. L'analyse expérimentale quant à elle, n'a pas retrouvé de corrélation entre l'aluminium et la fragmentation d'ADN des spermatozoïdes. En conclusion l'aluminium représente un facteur de reprotoxicité sur la fertilité masculine. Un contrôle de l'exposition notamment alimentaires sont à discuter pour limiter son impact.

Abstract

In 2023, a systematic review provided for the first time, strong evidence of a global decline in sperm count, yet human exposure to aluminum is at an all-time high and continues to increase. The aim of this work is to evaluate the impact of aluminum on male fertility through a systematic review and the evaluation of a possible link between aluminum concentration and sperm DNA fragmentation, in 80 male candidates for artificial insemination at the Saint-Etienne University Hospital. The results of the literature analysis showed that induce a drop in sperm count as well as histological lesions at the testicular level. However, the experimental analysis, did not find any correlation between aluminum and sperm DNA fragmentation. In conclusion, aluminum is a toxic factor on male fertility. A control of exposure, particularly food exposure, should be discussed to limit its impact.