



HAL
open science

Facteurs environnementaux et qualité séminale

Yara Mileth Carrejo Gironza

► **To cite this version:**

Yara Mileth Carrejo Gironza. Facteurs environnementaux et qualité séminale. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB003 . tel-04961300

HAL Id: tel-04961300

<https://theses.hal.science/tel-04961300v1>

Submitted on 21 Feb 2025

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : « Épidémiologie, Analyse de Risque, Recherche Clinique »

Par

« Yara Mileth CARREJO GIRONZA »

« « Facteurs environnementaux et qualité séminale » »

Thèse présentée et soutenue à « Rennes », le « 30 Janvier 2023 »

Unité de recherche : INSERM U1085 - Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset)

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Fleur DELVA Médecin de Santé Publique -Centre ARTEMIS CHU de Bordeaux.
Équipe EPICENE Centre INSERM U 1219 Population Health Center ISPED
Université de Bordeaux

Jeanne PERRIN PU Médecine et Biologie de la Reproduction & du Développement
Faculté de Médecine Aix Marseille Université
Laboratoire d'Assistance Médicale à la Procréation
Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme- CECOS
Laboratoire de Biologie de la Reproduction Hôpital La Conception – Marseille.

Composition du Jury :

Président : Luc MULTIGNIER DR INSERM UMR1085, Univ Rennes 1, Rennes
Examinatrices : Fleur DELVA Médecin de Santé Publique – Centre ARTEMIS CHU de Bordeaux.
Équipe EPICENE Centre INSERM U 1219 Population Health Center
ISPED

Jeanne PERRIN PU Médecine et Biologie de la Reproduction & du Développement
Faculté de Médecine Aix Marseille Université
Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme- CECOS
Laboratoire de Biologie de la Reproduction Hôpital La Conception –Marseille

Cette thèse a été préparée dans le cadre du Réseau doctoral en santé publique animé par l'École des Hautes Études en Santé Publique (EHESP).

À mes parents: pour leur ténacité, leur obstination et ma vie

À Nancy et Ranulfo: pour l'exemple et les réprimandes

À John: pour exister

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury de cette thèse, en particulier Luc Multigner pour la présidence du jury. De la même manière, je tiens à exprimer ma gratitude à Fleur Delva et Jeanne Perrin, qui consacrent leur temps et leur attention à la rédaction des comptes rendus de ce travail et à l'évaluation de cette thèse.

À ma directrice de thèse : Bénédicte Jacquemin pour m'avoir guidé durant ces années. Tu auras toujours ma gratitude pour ta patience, ton soutien et pour ton soutien inconditionnel dans les circonstances exceptionnelles dans lesquelles cette thèse a été réalisée. Tu as toujours été là pour m'encourager à constamment regarder vers l'avant, à croire en mon travail et en moi.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe 9 Elixir for Life Course Epidemiology and Exposure Science for Environmental Health pour toute leur collaboration lors de mon passage à l'Institut de Recherche en Santé Environnement Travail de Rennes, spécialement à Cécile Chevrier et Ronan Garlantézec pour leurs conseils avisés et leur bienveillance.

À Rafael Lafuente, Responsable du Laboratoire d'Andrologie au CIRH pour ses conseils et son accompagnement tout au long de cette démarche. Muchísimas gracias por todo.

Et enfin, à mon mari, partenaire, complice et ami : John Sandoval Moreno, mon petit canard. Tu as toujours été mon soutien et ma force. Tu ajoutes simplement de la couleur et de la forme à ma vie et je n'aurai jamais de mots pour te remercier des sacrifices que tu as faits durant ces trois années pour m'aider à atteindre cet objectif. Sin tí, simplemente NO.

Merci pour tout,

Yara Mileth Carrejo Gironza

Rennes, Janvier 2023.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	3
1.1 FONCTION REPRODUCTRICE MASCULINE	3
1.1.1 SPERMATOZOÏDE HUMAINE.....	3
1.1.2 SPERMATOGENESE	5
1.1.2.1 Phase proliférative ou spermatogonique	5
1.1.2.2 Phase méiotique ou spermatocytogenèse	6
1.1.2.3 Spermiogenèse	6
1.1.3 MATURATION EPIDIDYMAIRE	9
1.1.4 LE CONTROLE HORMONAL DE LA SPERMATOGENESE	11
1.1.5 THERMOREGULATION DE LA SPERMATOGENESE	11
1.1.6 LES CAUSES DE L'INFERTILITE MASCULINE	13
1.2 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET QUALITE SPERMATIQUE.....	17
1.2.1 DEFINITION	17
1.2.2 POLLUTION DE L'AIR EXTERIEUR	17
1.2.2.1 Oxydes d'azote	18
1.2.2.2 Matières particulaires (PM).....	19
1.2.2.3 Estimations de l'exposition à la pollution de l'air en épidémiologie	19
1.2.2.4 Pollution de l'air et santé.....	20
1.2.3 TEMPERATURE AMBIANTE.....	22
CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	25
2.1 OBJECTIF PRINCIPAL ET OBJECTIFS SPECIFIQUES	25
2.1.1 OBJECTIF PRINCIPAL	25
2.1.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES	25
2.2 HYPOTHESES	25
CHAPITRE 3. MÉTHODOLOGIE	27
3.1 POPULATIONS	27
3.1.1 LA COHORTE SEMAP (POUR L'ETUDE DES EFFETS DE L'EXPOSITION AUX POLLUANTS DE L'AIR SUR QUALITE SPERMATIQUE).....	27
3.1.2 LA COHORTE DE POTENTIELS DONNEURS DE SPERME (POUR L'ETUDE DES EFFETS DE L'EXPOSITION A LA TEMPERATURE AMBIANTE SUR QUALITE SPERMATIQUE).....	28
3.2. PARAMETRES CLASSIQUES D'UN SEMINOGRAMME	28
3.2.1 PARAMETRES SPERMATIQUES CLASSIQUES	28
3.2.2 FRAGMENTATION DE L'ADN	29
3.3. VARIABLES D'EXPOSITION.....	30
3.3.1. POLLUTION DE L'AIR EXTERIEUR	30
3.3.2. TEMPERATURE AMBIANTE.....	31
3.3.3. AUTRES VARIABLES D'INTERET	32
3.3.4. ANALYSES STATISTIQUES	32

CHAPITRE 4. RESULTATS.....	33
4.1 ASSOCIATIONS ENTRE LA POLLUTION DE L'AIR EXTERIEUR ET PARAMETRES SPERMATIQUES : ÉVIDENCES RECUEILLIES AUPRES D'HOMMES DE COUPLES AYANT FREQUENTE UNE CLINIQUE DE FERTILITE A BARCELONE, EN ESPAGNE.»	33
4.1.1 RESUME EN FRANÇAIS.....	33
4.1.2 INTRODUCTION.....	34
4.1.3 MATERIAL AND METHODS.....	35
4.1.3.1 Study design and subject recruitment	35
4.1.3.2 Semen collection and analyses	36
4.1.3.3 Air pollution data and exposure assessment	36
4.1.3.4 Statistical analysis.....	37
4.1.4 RESULTS.....	40
4.1.4.1 Study population	40
4.1.4.2 Estimation of the effects of long-term exposure to air pollutants in the sperm parameters	46
4.1.4.3 Stratified analyses.....	50
4.1.4.4 Sensitivity analyses.....	58
4.1.5 DISCUSSION.....	64
4.1.5.1 Comparison with the literature	64
4.1.5.2 Association between sperm quality parameters and exposure to air pollutants during different exposure windows	65
4.1.5.3 Possible mechanisms.	66
4.1.5.4 Strength and limitations	67
4.1.6 CONCLUSIONS	68
4.1.7 REFERENCES.....	69
4.2. EFFET DE LA TEMPERATURE AMBIANTE SUR LA QUALITE SPERMATIQUE : UNE ETUDE SUR DES HOMMES JEUNES ET EN BONNE SANTE.....	74
4.2.1 RESUME EN FRANÇAIS.....	74
4.2.2 INTRODUCTION.....	75
4.2.3 MATERIAL AND METHODS.....	75
4.2.3.1 Study design and subject recruitment	75
4.2.3.2 Semen collection and analyses	76
4.2.3.3 Temperature data determination	76
4.2.3.4 Statistical analysis.....	77
4.2.3.5 Sensitivity analysis	78
4.2.4 RESULTS.....	79
4.2.4.1 Study population	79
4.2.4.2 Ambient temperature and sperm parameters	79
4.2.4.2.2 Progressive motility	80
4.2.4.2.3 Seminal volume	81
4.2.4.2.5 Sensitivity analysis	83
4.2.5 DISCUSSION.....	86
4.2.5.1 Comparison with the literature	86
4.2.5.2 Possible mechanisms	87
4.2.5.3 Strengths and limitations	88
4.2.6 REFERENCES.....	89
CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	93
5.1. DISCUSSION.....	93
5.1.1 POLLUTION DE L'AIR	93

5.1.2 TEMPERATURE AMBIANTE.....	94
5.2 FORCE ET LIMITES DE L'ETUDE	95
5.3 CONCLUSION	96
5.4 PERSPECTIVES.	96
ANNEXE 1. DOCUMENT INFORMATIF DESTINE AUX PATIENTS SUR LE PROJET.....	99
ANNEXE 2. CONSENTEMENT A PARTICIPER A L'ETUDE	103
ANNEXE 3: QUESTIONNAIRE SUR L'EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE	104
BIBLIOGRAPHIE	119

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1. MORPHOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE MATURE.....	4
FIGURE 1.2. REPRESENTATION DES DIFFERENTES PHASES DE LA SPERMATOGENESE.....	9
FIGURE 3.1. DISTRIBUTIONS DES NIVEAUX DE POLLUTION DE L'AIR A BARCELONE MODELISEE A PARTIR DES MODELES LUR.....	31
FIGURE 4.1. (FIG. 1 OF THE MANUSCRIPT). FLOW CHART OF THE EXCLUSION CRITERIA FOR THE STUDY PARTICIPANTS.....	41
FIGURE 4.2 (FIG. 2 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON PROGRESSIVE MOTILITY BY EXPOSURE WINDOW, ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS...47	47
FIGURE 4.3 (FIG. 3 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON SEMINAL VOLUME BY EXPOSURE WINDOW, ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING.....47	47
FIGURE 4.4 (FIG. 4 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON TOTAL SPERM NUMBER BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS...48	48
FIGURE 4.5 (FIG. 5 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON SPERM CONCENTRATION BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS...49	49
FIGURE 4.6 (FIG. 6 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON DNA FRAGMENTATION BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS...49	49
FIGURE 4.7 (FIG. S1 OF THE MANUSCRIPT): STRATIFIED EFFECTS OF AIR POLLUTANTS ON PROGRESSIVE MOTILITY BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.....51	51
FIGURE 4.8 (FIG. S2 OF THE MANUSCRIPT): STRATIFIED EFFECTS OF AIR POLLUTANTS ON SEMINAL VOLUME BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.....52	52
FIGURE 4.9 (FIG. S3 OF THE MANUSCRIPT): STRATIFIED EFFECTS OF AIR POLLUTANTS ON TOTAL SPERM NUMBER BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.....54	54
FIGURE 4.10 (FIG. S4 OF THE MANUSCRIPT): STRATIFIED EFFECTS OF AIR POLLUTANTS ON SPERM CONCENTRATION BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.....56	56
FIGURE 4.11 (FIG. S5 OF THE MANUSCRIPT): STRATIFIED EFFECTS OF AIR POLLUTANTS ON DNA FRAGMENTATION BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.....57	57
FIGURE 4.12 (FIG. S6 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON SPERM PARAMETERS BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.59	59
FIGURE 4.13 (FIG. S7 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AIR POLLUTANTS ON SPERM PARAMETERS BY EXPOSURE WINDOW ADJUSTED FOR AGE, BMI, ALCOHOL CONSUMPTION AND SMOKING STATUS.61	61
FIGURE 4.14 (FIGURE 1 OF THE MANUSCRIPT): ASSOCIATION BETWEEN SPERM CONCENTRATION AND AMBIENT TEMPERATURE AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS; ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, AND SES.80	80
FIGURE 4.15 (FIGURE 2 OF THE MANUSCRIPT): ASSOCIATION BETWEEN PROGRESSIVE MOTILITY AND AMBIENT TEMPERATURE AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS; ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, AND SES.81	81
FIGURE 4.16 (FIGURE 3 OF THE MANUSCRIPT): ASSOCIATION BETWEEN SEMINAL VOLUME AND AMBIENT TEMPERATURE AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS; ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, AND SES.82	82
FIGURE 4.17 (FIGURE S4 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AMBIENT TEMPERATURE ON SPERM CONCENTRATION AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS, ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, SES AND DIFFERENT AIR POLLUTANTS.83	83

FIGURE 4.18 (FIGURE S5 OF THE MANUSCRIPT): EFFECT OF AMBIENT TEMPERATURE ON PROGRESSIVE MOTILITY AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS, ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, SES AND DIFFERENT AIR POLLUTANTS.84

FIGURE 4.19 (FIGURE S6 OF THE MANUSCRIPT). EFFECT OF AMBIENT TEMPERATURE ON SEMINAL VOLUME AT THE DIFFERENT EXPOSURE WINDOWS, ADJUSTED PER AGE, SMOKING HABITS, SES AND DIFFERENT AIR POLLUTANTS.85

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 CLASSIFICATION DE L'INFERTILITE MASCULINE EN FONCTION DE SON ORIGINE	14
TABLEAU 1.2 ANOMALIES DU SPERME ASSOCIEES AU VOLUME SEMINAL, A LA CONCENTRATION SPERMATIQUE, AU NOMBRE TOTAL DE SPERMATOZOÏDES ET A LA MOTILITE DES SPERMATOZOÏDES. VALEURS-LIMITES DE REFERENCE DE L'OMS (2010) POUR L'EXAMEN ET LE TRAITEMENT DU SPERME HUMAIN.....	15
TABLEAU 1.3 VALEURS LIMITES DE LA QUALITE DE L'AIR SELON L'UNION EUROPEENNE ET L'OMS	18
TABLEAU 1.4 CLASSIFICATION ET DESCRIPTION DES DIFFERENTES MATIERES PARTICULAIRES EN EPIDEMIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE.....	19
TABLEAU 4.1 (TABLE 1 OF THE MANUSCRIPT): CHARACTERISTICS AND LIFESTYLE FACTORS OF THE STUDY POPULATION.....	42
TABLEAU 4.2 (TABLE S1 OF THE MANUSCRIPT): SOCIO-DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND LIFESTYLE FACTORS OF STUDY PARTICIPANTS COMPARED TO EXCLUDED INDIVIDUALS. *: FOR SOME PATIENTS, THIS INFORMATION IS MISSING. THE PERCENTAGE IS RELATIVE WITH RESPECT TO THE VALIDATED INFORMATION FOR THESE DEMOGRAPHIC VARIABLES.	43
TABLEAU 4.3 (TABLE S2 OF THE MANUSCRIPT): SOCIODEMOGRAPHIC AND LIFESTYLE CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS BASED ON THE NUMBER OF SAMPLES SUPPLIED.....	44
TABLEAU 4.4 (TABLE 2 OF THE MANUSCRIPT): DESCRIPTIVE ANALYSIS OF THE SPERM PARAMETERS OF THE TOTAL POPULATION INCLUDED IN THE STUDY AND WHO ATTEND AN ASSISTED REPRODUCTION CENTER. *SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA): REFERENCE VALUES.	45
TABLEAU 4.5 (TABLE 3 OF THE MANUSCRIPT): DESCRIPTION OF THE AIR POLLUTANTS MODELED TO THE ADDRESS OF RESIDENCE FOR EXPOSURE WINDOW BETWEEN 0 - 90 DAYS BEFORE SAMPLING. MEAN (SD) IN MG / M ³ EXCEPT FOR PM _{2.5} ABSORBANCE 10 ⁻⁵ M ⁻¹	46
TABLEAU 4.6 (TABLE S3 OF THE MANUSCRIPT): ADJUSTED ODDS RATIOS FOR PROGRESSIVE MOTILITY ASSOCIATED WITH IQR-SCALED AIR POLLUTANTS BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE BMI, SMOKING STATUS, AND ALCOHOL CONSUMPTION.....	62
TABLEAU 4.7 (TABLE S4 OF THE MANUSCRIPT): ADJUSTED ODDS RATIOS FOR SEMINAL VOLUME ASSOCIATED WITH IQR-SCALED AIR POLLUTANTS BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE BMI, SMOKING STATUS, AND ALCOHOL CONSUMPTION.....	63
TABLEAU 4.8 (TABLE S5 OF THE MANUSCRIPT): ADJUSTED ODDS RATIOS FOR TOTAL SPERM NUMBER ASSOCIATED WITH IQR-SCALED AIR POLLUTANTS BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE BMI, SMOKING STATUS, AND ALCOHOL CONSUMPTION.....	63
TABLEAU 4.9 (TABLE S6 OF THE MANUSCRIPT): ADJUSTED ODDS RATIOS FOR SPERM CONCENTRATION ASSOCIATED WITH IQR-SCALED AIR POLLUTANTS BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE BMI, SMOKING STATUS, AND ALCOHOL CONSUMPTION.....	63
TABLEAU 4.10 (TABLE S7 OF THE MANUSCRIPT): ADJUSTED ODDS RATIOS FOR DNA FRAGMENTATION ASSOCIATED WITH IQR-SCALED AIR POLLUTANTS BY EXPOSURE WINDOW. ADJUSTED FOR AGE BMI, SMOKING STATUS, AND ALCOHOL CONSUMPTION.....	63
TABLEAU 4.11 (TABLE 1 OF THE MANUSCRIPT): AVERAGE ANNUAL TEMPERATURES AT THE METEOROLOGICAL STATIONS USED FOR THE MEASUREMENTS IN THIS STUDY. SOURCE SERVEI METEOROLÒGIC DE CATALUNYA.....	76
TABLEAU 4.12 (TABLE 2 OF THE MANUSCRIPT): CHARACTERISTICS AND LIFESTYLE FACTORS OF THE STUDY POPULATION	79

LISTE DES SIGLES ET DES ABBREVIATIONS

ABP	Protéine de liaison des androgènes
Ad	Spermatogonies du type A sombre
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ap	Spermatogonies du type A pâles
ARN	Acide ribonucléique
BCN	Barcelone
BMI ou IMC	Indice de Masse Corporelle
CASA	Computer Aided Sperm Analysis
CAT	Catalogne
CI	Intervalle de confiance
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CIRH	Centre d'infertilité et de reproduction humaine
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ESCAPE	European Study of Cohorts for Air Pollution
ESHRE	Société européenne pour la procréation humaine et l'embryologie
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IQR	Range Interquartile
LH	Hormone lutéinisante
LUR	Land Use Regression

NMU-LIFE	Nanjing Medical University Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO _x	Oxydes d'azote
OMM	Organisation Météorologique Mondial
OMS	Organisation mondiale de la santé
PM	Matières Particulaires
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SCSA	Analyse de la Structure Chromatine de Sperme
SD ou ET	Standard Desviation
SEMAP	Semen Quality and Air Pollution
SES	Socioeconomic Status
SIG	Systèmes d'Information Géographique
SMC	Servei Metereològic de Catalunya
SO ₂	Dioxyde de soufre
TAR	Techniques de procréation assistée
TGF	Transforming growth factor
Th	Lymphocytes T auxiliaries
TLR	Toll like receptors
UE	Union Européenne
XEMA	Xarxa d'Estacions Meteorològiques Automàtiques
ZQA	Zones de qualité de l'air

RÉSUMÉ

Actuellement les problèmes de fertilité touchent jusqu'à 15% de la population en âge de procréer dans les pays occidentaux. Bien que l'âge des femmes reste un facteur principal dans le fait d'obtenir ou pas une grossesse à terme, il ne faut pas négliger le rôle des hommes. Dans les couples ayant des problèmes de fertilité, jusqu'à 50% des hommes présentent des altérations de la qualité séminale. Parallèlement, la qualité spermatique a diminué ces dernières années et une augmentation des anomalies du sperme ainsi que des problèmes d'infertilité masculine a été observée depuis plusieurs décennies, ce qui suggère un rôle important des facteurs environnementaux. Toutefois, l'effet de l'exposition aux facteurs environnementaux susceptibles d'influer sur la spermatogenèse et la qualité spermatique est encore mal compris et peu étudié.

L'objectif principal de cette thèse doctorale est d'évaluer s'il existe une association entre certains facteurs environnementaux et la qualité spermatique. Dans un premier temps nous avons évalué les effets de l'exposition à la pollution de l'air extérieur sur la qualité spermatique dans une cohorte d'hommes issus de couples ayant consulté un centre de Procréation Médicalement Assistée entre 2014 et 2018 à Barcelone. Le volume séminal, la concentration de spermatozoïdes, la motilité progressive, le nombre total de spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN ont été les paramètres spermatiques évalués. Des modèles LUR ont été utilisés pour estimer l'exposition à NO_2 , NO_x , PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$, $\text{PM}_{2.5\text{absorbance}}$ et $\text{PM}_{\text{coarse}}$ aux adresses résidentielles et professionnelles des participants, pour différentes fenêtres d'exposition (0 - 9, 10 - 14, 70 - 90 et 0 - 90 jours avant échantillonnage). Les estimations ont été ajustées en fonction de l'âge, de l'IMC, du tabagisme et de la consommation d'alcool à l'aide de modèles mixtes pour tenir compte des mesures répétées. Deux cent quatre-vingt-neuf participants contribuant avec 947 échantillons (3.23 échantillons en moyenne par participant) ont été inclus. L'âge moyen des participants était de 37 ans. Les résultats de cette analyse ont montré une association entre l'exposition à la pollution de l'air et une diminution de la qualité spermatique, en particulier une diminution de la motilité progressive associée à l'exposition aux PM_{10} , une diminution du volume séminal et une augmentation de la fragmentation de l'ADN associée à l'exposition aux $\text{PM}_{2.5}$. Cependant dans cette analyse nous avons aussi trouvé que l'exposition aux NO_x , aux $\text{PM}_{2.5}$ et à la $\text{PM}_{2.5\text{absorbance}}$ (composé des PM marqueur de combustion) était associée à une augmentation du nombre total de spermatozoïdes.

Dans une deuxième étude, l'objectif consistait à évaluer les effets de la température ambiante sur la qualité spermatique d'individus sains de moins de 30 ans, qui se sont présentés volontairement dans un centre de procréation médicalement assistée comme candidats au don de sperme entre les années 2007 et 2012. Le volume séminal, la concentration de spermatozoïdes et la motilité progressive ont été les paramètres de sperme étudiés dans cette étude. On a évalué l'exposition à la température ambiante en fonction de différentes fenêtres (0 - 9 jours, 10 - 14 jours, 70 - 90 jours et la période entière de 0 - 90 jours précédant l'échantillonnage). Les estimations, obtenues à partir de modèles mixtes, ont été ajustées en fonction de l'âge, de tabagisme et du statut socioéconomique. Un total de 172 potentiels donneurs de sperme a été inclus, contribuant avec 597 échantillons. L'âge moyen était de 25 ans (Ecart type ET : 4.0) et chaque donneur a donné en moyenne 3.4 échantillons (entre 1 et 21 échantillons par donneur). Nos résultats montrent que l'augmentation de la température ambiante était significativement associée à une diminution de la concentration

Les résultats présentés dans cette thèse doctorale, bien qu'à interpréter avec prudence, ajoutent de nouvelles preuves sur les effets délétères de plusieurs facteurs environnementaux sur la qualité séminal. Ces résultats encouragent le développement de stratégies de contrôle des polluants de l'air, de continuer à agir de toute urgence pour lutter contre le changement climatique et l'augmentation de la température moyenne mondiale, et la révision constante des protocoles de référence pour l'évaluation et le contrôle des risques inhérents à l'exposition présents sur le lieu de travail, afin promouvoir une meilleure qualité de la santé reproductive masculine.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité est un problème de santé du système reproducteur masculin ou féminin caractérisé par l'incapacité d'obtenir une grossesse clinique après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers sans protection. Selon les données disponibles, l'infertilité affecte entre 48 millions de couples et 186 millions de personnes en âge de procréer au niveau mondial¹.

Un couple sur six dans le monde souffre d'une forme d'infertilité. Entre 20 et 35 % des cas d'infertilité sont dues à des causes féminines, 20 à 30% à des causes masculines, 20 à 30% à des problèmes dans les deux membres du couple, et le restant à des causes inconnues, selon la fiche d'information de la Société européenne pour la procréation humaine et l'embryologie (ESHRE) sur les techniques de procréation assistée (TAR) publiée en 2014 ².

Dans le cadre de cette thèse, je m'intéresse à deux facteurs environnementaux, la pollution atmosphérique et la température ambiante, qui pourraient altérer la qualité spermatique. Dans cette section de la thèse, je ferai d'abord un résumé de la fonction reproductive masculine, ensuite je parlerai des deux facteurs environnementaux mentionnés ci-dessus, et finalement de l'état des connaissances entre ces facteurs et la qualité spermatique.

1.1 Fonction reproductrice masculine

1.1.1 Spermatozoïde humaine

Le spermatozoïde est le gamète mâle dont la fonction est de fusionner avec le noyau de l'ovule (gamète femelle) pour former le zygote : une cellule unique dotée d'un ensemble complet de chromosomes qui donne finalement lieu à l'embryon.

Les spermatozoïdes matures sont composés de deux composantes morphologiques et fonctionnelles différentes : la tête et le flagelle qui sont entourées d'une même membrane plasmique et sont reliées par une pièce de connexion. La Figure 1.1 illustre la morphologie d'un spermatozoïde.

La tête du spermatozoïde contient le noyau, composé de chromatine hautement condensée, et de l'acrosome, situé entre le noyau et la membrane plasmique apicale.

L'acrosome est un organe sécréteur qui contient des protéases et des enzymes hydrolytiques qui dégradent la zone pellucide des ovocytes, favorisant la pénétration par les spermatozoïdes.

Le flagelle comporte trois régions, dont chacune présente des caractéristiques bien définies qui diffèrent par l'organisation du cytosquelette et de ses éléments de signalisation :

- La pièce intermédiaire : est la plus proche de la tête. Elle est constituée d'un axonème, qui est l'élément moteur du flagelle. L'axonème est entouré par 9 fibres denses externes et recouvert par une gaine de mitochondries disposées en formation hélicoïdale qui fournissent l'énergie nécessaire à la motricité des spermatozoïdes. Autour de la gaine de mitochondries on retrouve la membrane plasmique.
- La pièce principale : C'est la pièce la plus longue. La gaine de mitochondries est remplacée par une gaine fibreuse qui offre protection, support et flexibilité à l'ensemble de la structure.
- La pièce terminale Elle est composée exclusivement de l'axonème et la membrane plasmique qui la recouvre.³

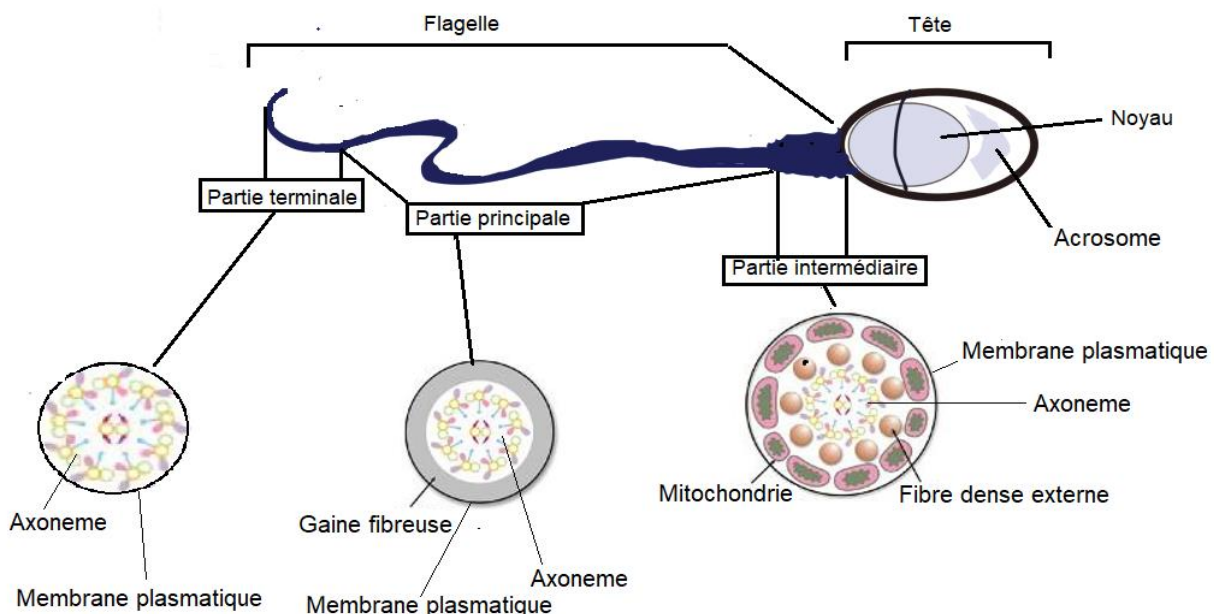


Figure 1.1. Morphologie du spermatozoïde mature.

Adapté de: Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006;19(4):426-436.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-6902006000400008

1.1.2 Spermatogenèse

La spermatogenèse est un procédé hautement spécialisé de différenciation cellulaire qui entraîne la formation de spermatozoïdes fonctionnels en vue d'une reproduction réussie. La spermatogenèse en tant que telle dure au total 90 jours environ, dont 74 jours correspondent au processus de production des spermatozoïdes et le reste à sa maturation et à son transport dans le tractus génital masculin. Il y a trois étapes principales qui, dans l'ordre, consistent en : la prolifération mitotique ; la production des spermatides haploïdes et finalement la cytodifférenciation progressive des spermatides en spermatozoïdes.

1.1.2.1 Phase proliférative ou spermatogonique

La production de spermatozoïdes commence par l'activation des spermatogonies à la puberté et se poursuit pendant toute la vie de l'individu. Les spermatozoïdes sont formés à partir des spermatogonies, des cellules germinales diploïdes non différenciées qui tapissent la membrane basale dans les tubes séminifères du testicule⁴. Le but de cette phase est d'accroître le nombre de spermatogonies pour être en mesure de produire d'énormes quantités de spermatocytes : les cellules précurseurs des spermatozoïdes.

La population de spermatogonies humaines est morphologiquement divisée en trois classes⁵ :

- Spermatogonies du type A : cellules indifférenciées dont 2 types sont décrits :
 - Spermatogonies du type A sombre : (Ad pour leur acronyme en anglais « dark »). Ces cellules agissent comme des cellules souches testiculaires, sans jouer un rôle actif dans la production de spermatozoïdes. Elles maintiennent la réserve de spermatogonies nécessaire à la spermatogenèse. Les spermatogonies de type Ad possèdent un noyau avec une chromatine hautement condensée et une faible activité cellulaire. Elles ne se divisent qu'occasionnellement en réponse à une diminution drastique du nombre de spermatogonies, donnant lieu à de nouvelles spermatogonies du type A pâles (Ap).
 - Spermatogonies de type Ap : cellules avec un noyau ovoïde et chromatine légèrement condensée, avec 1 à 3 nucléotides proéminents et forte activité cellulaire. Ce type de cellules indifférenciées se divisent par mitose donnant lieu à de nouvelles spermatogonies de type Ap et B. Chaque spermatogonie Ap peut donner lieu à 2 spermatogonies du type B⁶.

- Spermatogonies du type B : cellules avec un noyau sphérique et chromatine irrégulière en agrégats périphériques. Au terme de 8 cycles de mitose chaque spermatogonie B produit des cellules filles qui se différencient en 2 spermatocytes primaires. (spermatocytes I)⁶. La phase de production des spermatocytes I issus de la mitose des spermatogonies dure approximativement 27 jours.

1.1.2.2 Phase méiotique ou spermatocytogenèse

Cette phase se tient en deux étapes et vise à diviser par deux le matériel génétique pour produire des cellules haploïdes appelées spermatides. Chacun de ces processus méiotiques inclut une prophase, une métaphase, une anaphase et une télophase. La prophase est divisée en quatre stades : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. Le leptotène se produit dans le compartiment basal du tube séminifère, tandis que les trois autres se produisent dans le compartiment adluminal.

Les spermatogonies B se détache du compartiment de base pour former des spermatocytes I, déclenchant la méiose. Ces spermatocytes I pré-leptotènes sont diploïdes et sont les dernières à réaliser la synthèse d'ADN. Ces cellules migrent vers le compartiment adluminal du tube séminifère, en augmentent la taille et modifient la configuration nucléaire avant de commencer la première division méiotique. Par conséquent, chaque spermatocyte I donne lieu à deux spermatocytes secondaires (spermatocytes II) qui ont 23 chromosomes (22 autosomes et un chromosome sexuel X ou Y). Ce premier cycle méiotique dure environ 23 jours⁷.

Les spermatocytes II démarrent directement la deuxième division méiotique et chacun donne deux spermatides dont chaque chromosome est constitué d'une seule chromatide⁸. Comme il n'y a pas de réplication de l'ADN ni de recombinaison du matériel héréditaire, cette étape progresse rapidement en environ 6 heures⁷.

1.1.2.3 Spermiogenèse

Cette étape ne comporte aucune division cellulaire. Des changements morphologiques conduisant à la transformation du sperme en spermatozoïdes sont observés. Les principales phases de ce processus comprennent :

- Phase de golgi : Au cours de cette phase, la spermatide commence à développer sa polarité et se prépare à acquérir les parties principales d'un spermatozoïde : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. L'appareil de Golgi produit et libère des enzymes lytiques formées dans le réticulum endoplasmique rugueux et qui vont se concentrer à l'intérieur d'un seul gros granule acrosomique qui est en contact étroit avec l'enveloppe nucléaire⁹. À l'autre extrême, la partie intermédiaire est développée, où les mitochondries et le centriole distal se rejoignent pour initier la formation de l'axonème.

Le matériel génétique est d'abord enroulé par des histones, qui sont remplacées par des protéines de transition après désassemblage des nucléosomes. Ensuite les protéines de transition sont remplacées par des protamines pour former un complexe toroïdal avec l'ADN hautement compacté¹⁰. Les protamines sont des protéines nucléaires spécifiques des spermatozoïdes matures, riches en résidus d'arginine, qui permettent un emballage plus dense de l'ADN dans le spermatozoïde que celui des histones¹¹.

- Phase de la casquette : le granule sphérique acrosomique s'élargit et fusionne avec les vésicules supplémentaires de l'appareil de Golgi. A ce point, l'acrosome n'est plus sphérique mais s'aplatit et se propage à la surface du noyau ; il commence à s'allonger et l'acrosome fait suite à cette modification, recouvrant finalement les deux tiers de la surface nucléaire¹².
- Formation du flagelle : Le flagelle se développe à partir de l'élongation des microtubules dans l'un des centrioles de la spermatide. Une paire de microtubules se rejoignent au centre de la structure et sont ensuite entourées de 9 autres microtubules doubles externes formant l'axonème. La cellule germinale en développement est orientée de telle manière que le flagelle en croissance est dirigé vers le centre de la lumière du tube séminifère¹³.
- Phase de maturation : Dans cette phase, l'excès de cytoplasme est phagocyté par les cellules de Sertoli qui entourent le testicule. Ce sont des cellules épithéliales dont le cytoplasme s'étend de la membrane basale à la lumière du tube séminifère. Elles participent dans la formation de la barrière hémato-testiculaire, au maintien du microenvironnement tubulaire pour la prolifération et la différenciation correctes des spermatogonies primitives et pour la production de spermatozoïdes. Les cellules de Sertoli remplissent un certain nombre de fonctions supplémentaires au cours de la spermatogenèse, notamment la sécrétion d'inhibine et d'activine après la puberté,

qui jouent un rôle conjoint dans la régulation de la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante (FSH pour leur acronyme en anglais « Follicle-stimulating hormone ») ; la sécrétion de la protéine de liaison des androgènes (ABP pour leur acronyme en anglais « androgen-binding protein »), qui permet la concentration locale de testostérone au niveau des tubes séminifères et à proximité des gamètes en développement ; entre autres¹⁴.

Lorsque l'excédent de cytoplasme est relâché, des spermatozoïdes individuels, matures mais immobiles sont formés¹⁴. Ces cellules immobiles sont le résultat final de la spermiogenèse, qui a une durée d'environ 24 jours. La phase de maturation se termine par la spermiation, ou la libération de spermatozoïdes dans la lumière du tubule séminifère.

- Spermiation : La libération des cellules de Sertoli de spermatozoïdes matures mais immobiles dans la lumière du tube séminifère est contrôlée par la FSH et la testostérone.

Le testicule sécrète de l'ocytocine et de la vasopressine qui stimulent les contractions péristaltiques dans les cellules de Sertoli et dans les cellules myoïdes des tubes séminifères. Ces contractions permettent le transport des spermatozoïdes immobiles qui sont immergés dans le liquide testiculaire sécrété par les cellules de Sertoli vers l'épididyme¹⁵.

Les spermatozoïdes gagnent motilité et la capacité de fécondation une fois qu'ils atteignent l'épididyme. Cependant, les spermatozoïdes matures sont transportés à travers le reste du système reproducteur masculin via la contraction musculaire plutôt que la motilité des spermatozoïdes nouvellement acquise¹⁶.

Les différentes étapes de la spermatogenèse sont illustrées dans la Figure 1.2

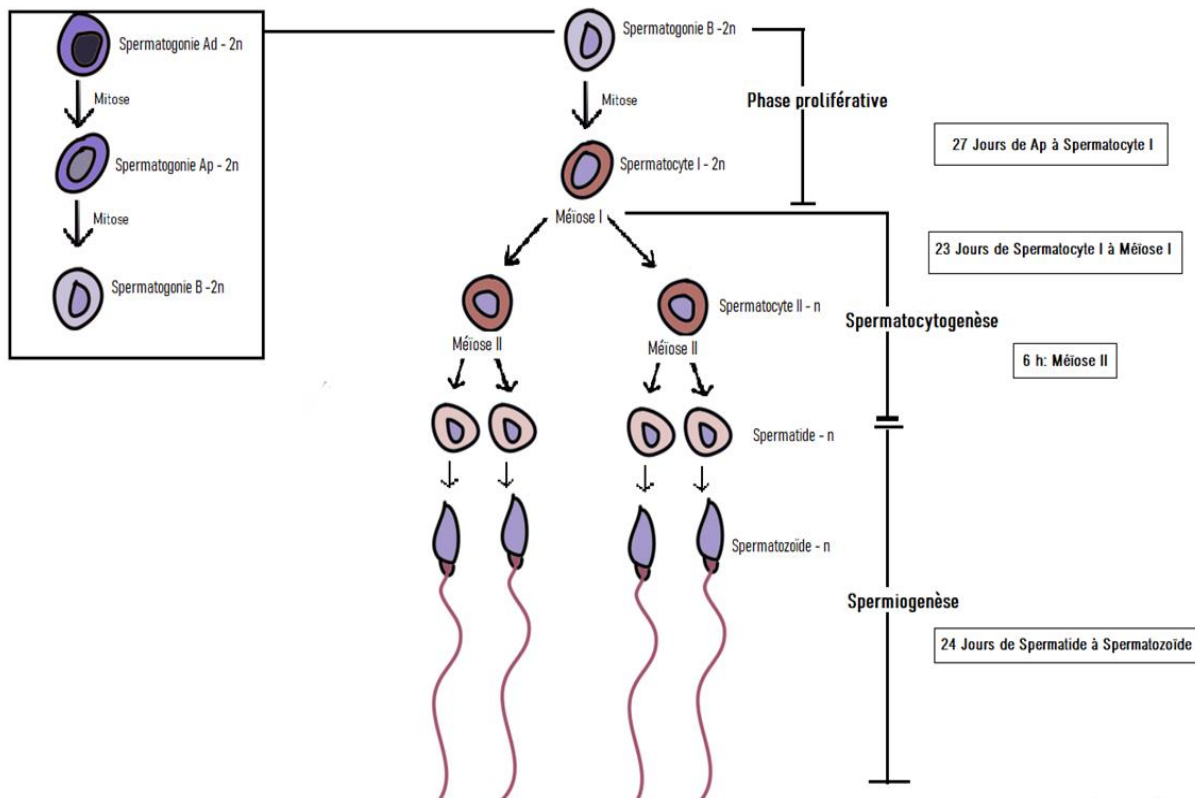


Figure 1.2. Représentation des différentes phases de la spermatogénèse.

1.1.3 Maturation épидидymaire

Les tubes séminifères droits sont vidés dans un réseau de tubules appelé rete testis, qui se trouve dans le médiastin testiculaire. La rete testis transporte les spermatozoïdes des tubules séminifères aux conduits efférents. 95% du fluide contenant des spermatozoïdes est réabsorbé dans les canaux efférents avant d'entrer dans l'épididyme, ce qui contribue à augmenter leur concentration. Les spermatozoïdes doivent passer par deux processus de maturation extra-testiculaire : le premier dans l'appareil reproducteur masculin et est connu sous le nom de maturation épидидymaire, tandis que le deuxième se produit dans l'appareil reproducteur féminin et est appelé capacitation. Les deux sont associés à des changements biochimiques et fonctionnels dans les spermatozoïdes qui entraînent sa fécondité¹⁷.

L'épididyme humain est divisé en trois régions anatomiques, chacun avec une expression génétique différente : le caput (le pôle crânien du testicule), le corpus (la partie médiane) et la cauda (la partie inférieure connectée au canal déférent). L'épithélium épидидymaire sécrète des protéines lumenales qui varient selon la région de l'organe où elles proviennent¹⁸.

En raison des interactions avec les protéines luminales libérées par l'épithélium épидидymaire et les epididymosomes (vésicules extracellulaires), la composition de protéines, lipides et petit ARN dans les spermatozoïdes est considérablement modifiée dans l'épididyme.¹⁹

Les modifications biochimiques observées au cours de la maturation épидидymaire comprennent²⁰ : l'augmentation de la charge négative de la membrane plasmique induite par la composition ionique, les molécules organiques et diverses protéines qui entrent en contact avec les spermatozoïdes lors de leur transit à travers l'épididyme. L'augmentation des ponts disulfure dans les protamines qui conduit au maintien du génome dans un noyau hautement compacté et stable. L'augmentation de la fluidité de la membrane spermatique attribuable à l'incorporation de lipides insaturés, à la diminution du rapport cholestérol-phospholipides et la glycosylation de la membrane plasmique. La phosphorylation des protéines du sperme (en particulier les résidus de tyrosine) qui conduit à l'activation des protéines associées à la motilité du flagelle²¹.

Pour protéger les spermatozoïdes pendant leur transit à travers l'épididyme, l'épithélium épидидymaire produit une variété de protéines antioxydantes qui aident à protéger les spermatozoïdes des dommages oxydatifs, notamment la catalase, les glutathion peroxydases, les glutathion-S-transférases, les peroxirédoxines, les superoxyde dismutases, la thiorédoxine réductase et les thiorédoxines. Alors que d'autres protéines, telles que l'albumine, la transferrine, la clustérine (SGP-2), les métalloprotéines et la proenképhaline, se trouvent également dans la lumière de l'épididyme, elles peuvent être associées à la maturation des spermatozoïdes²².

Le pH acide du liquide luminal, la stabilisation de la membrane spermatique, la liaison de facteurs décapacitantes tels que les mucopolysaccharides et les protéines à la surface du sperme, et la sécrétion caudale d'immobiline (qui empêche les spermatozoïdes de nager dans l'épididyme) préviennent l'activation de la capacitation prémature des spermatozoïdes déjà matures, leur faisant perdre momentanément leur capacité de fusion avec les autres membranes¹⁹.

Cette étape prend entre 10 et 12 jours. Les spermatozoïdes peuvent être stockés dans l'épididyme et y survivre jusqu'à trois semaines environ.

La spermatogenèse est particulièrement sensible aux perturbations par des facteurs externes au cours la différenciation des spermatogonies ; lors des premiers stades de la spermiogenèse et pendant la maturation épидидymaire ^{23, 24}.

1.1.4 Le contrôle hormonal de la spermatogenèse

L'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH pour leur acronyme en anglais «Gonadotropin-releasing hormone») est sécrétée par l'hypothalamus en quantités régulières et pulsatiles (environ toutes les 2 heures) stimulant la sécrétion hypophysaire et également pulsatile de deux gonadotrophines : l'hormone lutéinisante (LH pour leur acronyme en anglais «Luteinizing hormone») et la FSH. La LH se lie aux récepteurs de la membrane cellulaire de Leydig et stimule la production de testostérone dans l'espace interstitiel des tubules séminifères du testicule. La testostérone pénètre dans le compartiment tubulaire où elle se lie à l'ABP pour conditionner le développement de l'épithélium séminal et le bon fonctionnement du tractus génital. Lorsque le taux de testostérone augmente excessivement, elle exerce une rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus qui conduit à une diminution de la sécrétion de GnRH et avec elle une diminution de la sécrétion de LH par l'hypophyse²⁵.

La FSH se lie aux récepteurs de la membrane des cellules de Sertoli pour activer la spermatogenèse en stimulant la formation d'ABP, qui déclenche la spermatogenèse dans les tubules séminifères et la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. La FSH sécrète également l'inhibine une hormone qui exerce un effet de rétroaction négatif sur la sécrétion de FSH, soit dans les neurones hypothalamiques en réduisant la sécrétion de GnRH ou directement dans les cellules gonadotropes hypophysaires avec l'objectif de réduire la sécrétion de FSH²⁵.

1.1.5 Thermorégulation de la spermatogenèse

Afin d'assurer une spermatogenèse optimale, la température testiculaire doit être maintenue entre 2 et 4 °C au-dessous de la température interne du corps²⁶

Les mécanismes impliqués dans la thermorégulation du scrotum et des testicules sont décrits ci-dessous.

Le scrotum joue un rôle thermorégulateur actif. C'est un sac dermique à peau fine avec une vascularisation élevée et une absence de graisse sous-cutanée²⁷. Il possède

certaines caractéristiques anatomiques qui lui permettent de contribuer au maintien de la température nécessaire à la spermatogenèse :

- Muscle crémaster : C'est une fine couche de muscle strié qui entoure le testicule et le cordon spermatique dans le canal inguinal et le scrotum entre les couches externe et interne du fascia spermatique. Lorsque la température augmente, le muscle se relaxe, permettant aux testicules de descendre et de s'éloigner du reste du corps. Quand la température est basse, le crémaster se contracte, rapprochant les testicules du corps, assurant ainsi le maintien d'une température testicule optimal pour la spermatogenèse. Ce muscle peut également se contracter comme mécanisme de défense contre certains stimuli tels que le stress physique, les traumatismes, etc. et rétracter les testicules pour garantir leur protection²⁸.
- Tunique dartos : C'est un muscle lisse qui recouvre le scrotum. Comme le muscle crémaster, la tunique dartos répond aux stimuli thermiques. À basse température, il contracte la peau du scrotum pour en réduire la surface, le flux sanguin et la perte de chaleur et élevant la température testiculaire à des niveaux optimaux. En cas de hausse de température ; il permet à la peau du scrotum de se relaxer ; provoquant une dilatation des vaisseaux sanguins environnants et l'augmentation du flux sanguin dans la région, ce qui donne lieu à une diminution de la température testiculaire²⁸.
- Glandes sudoripares : nombreuses et largement réparties le long de la peau du scrotum. Ils stimulent la transpiration dans la région lorsqu'ils détectent une augmentation de la température corporelle ou scrotale, permettant à la température de baisser en raison de l'évaporation de la sueur²⁸.

Le scrotum agit également comme un dispositif de refroidissement et d'échange de chaleur qui permet à la température testiculaire d'atteindre le même niveau que le tissu sous-cutané, provoquant une perte de chaleur directe du testicule et un refroidissement du sang veineux provenant de cet organe²⁹.

Dans le second mécanisme de régulation thermique, ce sang veineux quitte les testicules dans de petites veines spermatiques qui se combinent pour former un réseau appelé plexus pampiniforme. Ce plexus encercle les branches de l'artère testiculaire, permettant au sang veineux du testicule de refroidir le sang artériel (qui, jusque-là, conservait la température corporelle) en tant qu'échangeur de chaleur à contre-courant³⁰.

1.1.6 Les causes de l'infertilité masculine

Les causes de l'infertilité masculine sont diverses, mais peuvent être classées en différents groupes en fonction de son origine : pré-testiculaire, testiculaire, post-testiculaire et spermatique³¹. Un récapitulatif de chacune de ces origines est présenté dans le Tableau 1.1

Classification de l'infertilité masculine en fonction de son origine	Classification de l'infertilité masculine en fonction de son origine
Déficiency pré-testiculaire	<p>Hyperprolactinémie</p> <p>Troubles thyroïdiens</p> <p>Diabète</p> <p>Troubles des glandes surrénales</p> <p>Hypogonadisme hypergonadotrope</p> <p>Hypogonadisme hypogonadotrope</p> <p>Dysfonction érectile</p> <p>Syndrome d'insensibilité légère aux androgènes</p> <p>Microdélétions du chromosome Y</p> <p>Syndrome de Klinefelter</p> <p>Syndrome de Noonan</p> <p>Syndrome de Kallman</p> <p>Dysgénésie gonadique XY</p> <p>Endocrinopathie génétique</p> <p>Des facteurs génétiques</p> <p>Des anomalies chromosomiques.</p>
Déficiency testiculaire	<p>Cryptorchidie et testicules atrophiques.</p> <p>Varicocèle</p> <p>Orchite</p> <p>Hydrocèle</p> <p>Hypoplasie testiculaire</p> <p>Tumeurs testiculaires,</p> <p>Dysfonctionnement testiculaire primitif</p> <p>Kystes épидидymaires</p>
Déficiency post-testiculaire	<p>Obstruction des voies spermatiques</p> <p>Infertilité immunologique</p> <p>Hypospadias</p> <p>Lésions du tractus séminal, maladies inflammatoires,</p> <p>Absence congénitale du canal déférent</p> <p>Éjaculation précoce</p> <p>Éjaculation rétrograde</p>

Tableau 1.1 Classification de l'infertilité masculine en fonction de son origine

Les catégories d'anomalies spermatiques selon les valeurs-limites de référence de l'OMS proposées dans son cinquième manuel de laboratoire pour l'examen et le traitement du sperme humain³², sont résumées dans le Tableau 1.2, avec leur définition.

Anomalie spermatique	Description
Hypospermie	Volume séminal complet inférieur à 1.5 mL.
Aspermie	Volume séminal nul.
Hyperspermie	Volume séminal supérieur à 6 mL.
Oligozoospermie	Concentration spermatique inférieur à 15 millions/mL.
Polyzoospermie	Concentration spermatique supérieure à 200 millions/mL.
Azoospermie	Absence de spermatozoïdes sur l'éjaculat « frais » centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes, examiné au microscope à fort grossissement (X 400).
Asthénozoospermie	Diminution de motilité de spermatozoïdes.
Akinétospermie	Motilité nulle de tous les spermatozoïdes du recueil.

Tableau 1.2 Anomalies du sperme associées au volume séminal, à la concentration spermatique, au nombre total de spermatozoïdes et à la motilité des spermatozoïdes. Valeurs-limites de référence de l'OMS (2010) pour l'examen et le traitement du sperme humain

Dans le cadre de cette thèse, nous mettrons l'accent sur l'un des facteurs critiques qui influencent la fécondité masculine : la qualité spermatique qui permet d'évaluer le potentiel reproducteur masculin. Certaines études suggèrent qu'une faible qualité spermatique est associée à un délai plus important dans l'obtention d'une grossesse^{33, 34, 35}. L'un des outils les plus utilisés pour l'évaluation de la qualité spermatique et qui permet un diagnostic initial des problèmes de santé reproductive chez les hommes est le spermogramme. Il donne une description générale du volume, de la concentration spermatique, du nombre, de la motilité et de la morphologie des spermatozoïdes.

Certaines études épidémiologiques suggèrent une tendance mondiale à la baisse de la qualité spermatique. Dès 1974, des chercheurs ont fait état d'une diminution significative des paramètres spermatiques analysés³⁶ par rapport à ceux réalisés dans les études de MacLeod et Gold en 1951 et 1956^{37, 38}. De même façon, dans une revue des études menées entre 1938 et 1991 sur la qualité spermatique chez des hommes sans antécédent

d'infertilité et publiée par Carlsen *et al* en 1992, une diminution globale de la qualité spermatique a été observée³⁹. En 1995, une étude portant sur 1351 hommes en bonne santé et fertiles de 1973 à 1992 a révélé une diminution de 2.6 % par an de la concentration moyenne de spermatozoïdes ; de 0.3 % par an du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de 0.7 % par an du pourcentage de spermatozoïdes normaux⁴⁰. Plus récemment, en 2017, Levine *et al* ⁴¹. ont passé en revue 2510 articles et 7518 résumés présentant des données avec des estimations de la concentration spermatique et du nombre total de spermatozoïdes, extrayant un total de 244 estimations chez 42935 hommes entre 1973 et 2011, constatant une diminution significative au cours de cette période de ces deux paramètres spermatiques. D'ailleurs, notant que les échantillons prélevés pour les analyses de la qualité spermatique se situaient dans une fourchette plus basse que celle définie dans sa quatrième édition publiée en 1999, et d'après les hommes dont ces conjointes ont eu une grossesse avant l'étude, l'OMS a réagi à ceci et à d'autres éléments en réduisant dans les cinquième et sixième éditions de son Manuel de laboratoire pour l'analyse et la préparation du sperme humain, publiée en 2010 et 2021, respectivement, les seuils de normalité inférieurs des paramètres spermatiques^{42, 43, 32, 44}.

Néanmoins, la diminution apparente de la qualité spermatique continue de faire l'objet de débats, car il y a aussi de nombreuses études qui contredisent les observations formulées par les auteurs susmentionnés. Par exemple, une étude publiée en 1996 n'a constaté aucune modification significative dans le volume séminal ou la motilité dans les analyses du sperme de 1283 hommes, qui avaient conservé du sperme avant leur vasectomie aux Etats-Unis entre 1970 et 1994⁴⁵. Aussi, d'autres auteurs postulent que les progrès technologiques, l'amélioration des contrôles de la qualité, la standardisation et les changements méthodologiques dans les laboratoires d'andrologie au cours des trois dernières décennies sont responsables des changements détectés dans les analyses du sperme ; notamment en ce qui concerne le comptage du nombre de spermatozoïdes⁴⁶.

L'absence de consensus sur la qualité spermatique oblige à réaliser des études dans des cohortes bien définies composées d'hommes représentant différentes catégories de population. Il existe l'hypothèse que les différences observées entre les analyses de qualité spermatique, et notamment le nombre de spermatozoïdes, sont liées à la variation géographique des individus qui composent les cohortes des études de fertilité masculine. Bien qu'en 1977, Smith et Steinberg avaient déjà suggéré la possibilité que les différences

géographiques pourraient être l'une des causes des différences observées dans le nombre de spermatozoïdes entre les couples de quatre états différents des États-Unis⁴⁷ ce n'est qu'à partir de la publication de Fish et Goluboff⁴⁸ que l'on a évalué si les variations géographiques pouvaient être un facteur de confusion dans les études sur la qualité spermatique. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs études ont été publiées sur la variabilité géographique de la qualité spermatique^{49, 50, 51, 52}; incluant une publication de 2022 où les données de 11 études portant sur 3484 participants provenant de cinq régions géographiques différentes ont été analysées, et ont conclu qu'il existe des différences significatives dans les paramètres spermatiques influencés par les différences géographiques⁵³. Finalement, cette variabilité pourrait, à son tour, être médiée par des facteurs environnementaux.

1.2 Facteurs environnementaux et qualité spermatique

1.2.1 Définition

Selon le Dictionnaire de l'environnement et du développement durable, un facteur environnemental est tout élément abiotique ou biotique, susceptible d'agir directement sur tous les êtres vivants au moins pendant une phase de leur développement⁵⁴.

Bien qu'il existe des plus en plus d'études mettent en évidence une association entre les expositions environnementales et la qualité spermatique^{55, 56, 57, 58}, les résultats ne sont pas toujours consistants et cohérents, et différent selon l'exposition et le paramètre étudié, notamment en ce qui concerne les deux facteurs environnementaux que j'étudie dans cette thèse : la pollution de l'air extérieur et la température ambiante.

1.2.2 Pollution de l'air extérieur

La pollution de l'air extérieur ou pollution atmosphérique est définie par la présence dans l'air de substances susceptibles d'avoir des effets nocifs sur la santé animale (incluant l'humaine), la santé végétale ou l'environnement. La pollution atmosphérique a des sources d'origine naturelles (par exemple : brumes désertiques ou embruns marins) et d'origine anthropiques c'est-à-dire générées par l'activité humaine. Actuellement dans les pays à haut revenus les sources principales en milieu urbain sont le trafic routier et le chauffage domestique⁵⁹. La pollution peut avoir des effets néfastes sur la santé à court terme, c'est-à-dire causant des événements de santé aigus quelques heures à jour après

des expositions à des concentrations élevée, des pics de pollution, ou à long terme, c'est-à-dire causant des événements de santé chroniques des mois ou années après des expositions de longue durée même à des concentrations relativement basses.⁶⁰

La pollution atmosphérique se compose des deux grands groupes, les gazes, et les particules, c'est-à-dire les éléments solides ou liquides suspendus dans l'atmosphère qui sont divisées par leur taille. Les polluants de l'air d'intérêt pour cette thèse sont les oxydes d'azote (NO_x, NO₂) et les particules (PM pour leur acronyme en anglais «Particulate matter »), et je m'intéresse à leurs effets de l'exposition à long terme.

Fin octobre 2022, la Commission européenne a proposé des lignes directrices plus strictes pour la qualité de l'air extérieur que celles en vigueur actuellement qui datent de 2010. Le but est d'atteindre l'objectif zéro pollution de l'air d'ici 2050. Ces modifications, une fois ratifiées, fixeront des critères de qualité de l'air « provisoires » d'ici 2030, plus conformes aux directives actuelles de l'OMS.

Le Tableau 1.3 résume les valeurs limites de qualité de l'air pour ces polluants selon la législation de l'Union Européenne (UE)⁶¹ y compris les nouvelles valeurs intermédiaires proposées⁶², et les nouvelles lignes directrices de l'OMS publiées en 2021⁶³.

Polluant	Valeurs limites actuelles UE	Valeurs «provisoire » 2030	Valeurs guide de l'OMS
Dioxyde d'azote (NO ₂)	40 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	20 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	10 µg/m ³ de moyenne sur 1 an
PM _{2.5}	25 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	10 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	5 µg/m ³ de moyenne sur 1 an
PM ₁₀	40 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	20 µg/m ³ de moyenne sur 1 an	15 µg/m ³ de moyenne sur 1 an

Tableau 1.3 Valeurs limites de la qualité de l'air selon L'Union Européenne et l'OMS

Il a été démontré que même à des niveaux en dessous des valeurs limites actuellement recommandées, l'exposition à long terme à la pollution de l'air est associée à une incidence accrue de mortalité prématurée, d'accidents cérébrovasculaires, de maladies coronariennes et d'autres affections⁶⁴.

1.2.2.1 Oxydes d'azote

Les oxydes d'azote (NO_x) sont un groupe de gaz composés d'oxyde nitrique (NO) et de dioxyde d'azote (NO₂). Ils résultent de l'utilisation de combustibles fossiles à haute température et leurs sources d'émissions sont le trafic routier, les installations industrielles

et les centrales électriques. La plus grande partie du NO libérée dans l'atmosphère est rapidement oxydée en NO₂. En présence d'hydrocarbures et de rayons ultraviolets, le NO₂ est le principal producteur d'ozone troposphérique et d'aérosols de nitrate, qui contribuent aussi à la masse totale des PM_{2,5} dans l'air ambiant⁶⁵.

1.2.2.2 Matières particulaires (PM)

Les PM constituent un important facteur de risque pour la santé humaine et sont un indicateur global de la qualité de l'air ambiant. Elles sont composées de divers éléments qui varient dans le temps et l'espace en fonction de leurs sources et réactions dans l'atmosphère. Entre les éléments le plus fréquents on retrouve des métaux, des composés organiques et inorganiques, du carbone élémentaire, des ions et des endotoxines⁶⁶. Les PM sont divisées selon leur diamètre de coupure en micromètres. Une brève description des PM est faite dans le Tableau 1.4

Type PM	Description	Sources	Niveau de pénétration
PM _{0.1}	Particules ultrafines. Taille de 0.1 micromètres.	Combustion à partir de sources naturelles ou humaines.	Ils pénètrent directement dans le tissu pulmonaire, et passer dans la circulation sanguine
PM _{2.5}	Particules fines. Diamètre aérodynamique de coupure autour de 2.5 micromètres	Les gaz d'échappement des automobiles, les opérations impliquant la combustion de combustibles et de sources naturelles comme les incendies de forêt et de gazon.	Ils pénètrent dans les bronchioles et peuvent descendre jusqu'aux alvéoles.
PM ₁₀	Particules grossières. Diamètre aérodynamique de coupure autour de 10 micromètres	Poussières en suspension provenant de l'industrie, de la construction, du commerce, etc.	Parties supérieures du système respiratoire (trachée et bronches)

Tableau 1.4 Classification et description des différentes Matières particulaires en épidémiologie environnementale.

La différence entre le PM₁₀ et le PM_{2.5} constitue le PM_{coarse}, et les PM_{2.5absorbance} sont obtenus à partir de la mesure de la réflectance des filtres PM_{2.5} et sa transformation ultérieure en absorbance. Les PM_{2.5absorbance} sont un marqueur de carbone suie⁶⁷.

1.2.2.3 Estimations de l'exposition à la pollution de l'air en épidémiologie

Les polluants sont mesurés depuis de nombreuses années par des stations de mesure fixes, qui sont gérées en France par les Agences Agréées de la Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQUA). Bien que les mesures obtenues soient indicatives de la qualité globale de l'air extérieur d'une ville ou d'une région géographique définies, elles ne capturent pas

à fine échelle la variabilité spatiale des polluants nécessaire pour estimer les effets des expositions sur le long terme. Il existe actuellement diverses méthodes de modélisations utilisées en épidémiologie environnementale pour évaluer l'exposition aux polluants de l'air dans le cadre de l'évaluation des effets à long terme de ces expositions sur la santé humaine. Parmi ceux-ci figurent :

- Les modèles de dispersion : qui utilisent des données sur les sources d'émission de polluants et les conditions météorologiques et topographiques associées, ainsi que toutes les informations sur les caractéristiques physico-chimiques du polluant pour évaluer l'exposition spatiale à la pollution de l'air, compte tenu de leur dispersion dans l'atmosphère et de leurs transformations chimiques potentielles tels qu'ils sont émis par la source à mesure qu'elles sont émises par la source⁶⁸.
- La modélisation par interpolation spatiale : qui permet d'estimer ou prédire les valeurs de concentration des polluants de l'air dans les zones ne disposant pas de stations de mesure, en utilisant les données de stations de surveillance dans d'autres secteurs⁶⁹.
- Les modèles Land Use Regression (LUR) : sont une technique qui se sert de régressions et, sur la base de l'utilisation de systèmes d'information géographique (SIG), prévoit les concentrations d'un polluant donné dans une région donnée, tenant compte des caractéristiques d'utilisation des sols, de la densité de population, des conditions physiques et géographiques des terrains et des conditions de circulation autour des sites de surveillance⁷⁰. Les modèles LUR sont largement utilisés dans les zones densément peuplées pour analyser les concentrations de pollution de l'air à des échelles spatiales fines⁷¹. Étant donné qu'il s'agit de la méthode choisie pour estimer l'exposition à la pollution de l'air dans cette thèse, elle sera décrite plus en détail au Chapitre 3 : Méthodologie.

1.2.2.4 Pollution de l'air et santé

Les effets sur la santé de la pollution de l'air comprennent : des problèmes respiratoires, des troubles neurodégénératifs⁷², le cancer du poumon, des accidents cérébrovasculaires, l'asthme, des maladies cardiovasculaires, la naissance prématurée, des troubles du développement⁷³ et des décès prématurés⁷⁴, entre autres. Les propriétés mutagènes des PM ont également été décrites, en particulier pour les PM_{2.5}⁷⁵. Le Centre International de

Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les PM comme cancérigènes du groupe 1 en 2013⁷⁶.

Les principaux mécanismes biologiques par lesquels la pollution aurait un effet sur la santé sont :

- Activation des réponses immunologiques médiées par les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) et les lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17) ⁷⁷: Les Th2 produisent des interleukines-4 (IL-4) ; IL-5; IL-10 et IL-13, qui activent les lymphocytes B et les éosinophiles et peuvent déclencher des affections telles que l'asthme, la rhinite, la dermatite et l'anaphylaxie⁷⁸. Les Th17 produisent IL-17, IL-21 et IL-22, qui agissent comme recruteurs de neutrophiles. La réponse immunitaire induite par Th17 est pro-inflammatoire et est associée à des maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la sclérose en plaques, etc⁷⁹. L'expression des cytokines et des lymphocytes T régulatrices peut aussi être modifiée par la méthylation de l'ADN dans la région promotrice des gènes immunorégulateurs⁸⁰.
- Activation des récepteurs cellulaires du type Toll (TLR pour son acronyme en anglais «Toll like receptors»): favorisant la production de cytokines pro inflammatoire tels qu'IL-1, IL-6 et IL-8.⁸¹
- Surproduction d'espèces réactives d'oxygène (ROS pour son acronyme en anglais "réactive oxygen species"): Cela génère un déséquilibre redox et par conséquent un stress oxydatif. Le stress oxydatif perturbe la signalisation cellulaire et déclenche une variété de réponses inflammatoires qui peuvent avoir des effets nocifs sur la santé. tels que la maladie d'Alzheimer, l'asthme, le cancer, les maladies cardiovasculaires, métaboliques et respiratoires, etc⁸¹.
- Augmentation des erreurs de réplication et inhibition de la réparation de l'ADN. : Cela peut induire l'apparition de mutations et, éventuellement, au développement d'un cancer⁸².

Au cours des dernières années, l'exposition à la pollution de l'air a été associée à une diminution de la qualité spermatique chez les hommes⁸³. En effet, Selevan *et al*/ ont décrit en 2000 une association significative entre les périodes de forte pollution de l'air, la diminution de la motilité des spermatozoïdes et l'augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant une chromatine ou une morphologie anormale⁸⁴. Tandis que

en 2005 les travaux publiés par Rubes *et al* en 2005 associaient lesdites expositions à une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes⁸⁵.

Bosco et son équipe ont publié des résultats en 2018 suggérant que les patients résidant dans des zones à fortes concentrations de polluants de l'air ont une proportion moyenne de fragmentation de l'ADN supérieure à 30 %⁸⁶. Également, dans une étude réalisée auprès de 1852 personnes dans la ville de Wuhan - Chine entre 2013 à 2015, et publiée en 2020, Wang *et al* ont indiqué un fort effet négatif du SO₂ et du NO₂ sur les résultats de la qualité spermatique pendant le développement du sperme⁸⁷. Plus précisément avec la diminution de la concentration spermatique, le nombre total de spermatozoïdes et la motilité progressive. Plus récemment, dans la publication de Wu *et al* en 2022, une association significative a été rapportée entre l'exposition aux PM_{2,5} et une diminution de la motilité des spermatozoïdes chez les hommes fertiles⁸⁸.

Des études menées auprès d'espèces animales sentinelles et d'humains ont suggéré que les polluants d'air ont un effet génotoxique sur les cellules germinales mâles⁸⁹, et sont capables d'induire du stress oxydatif, des changements épigénétiques, des dommages directs aux spermatozoïdes et l'apoptose des cellules germinales⁹⁰.

Bien que plusieurs études aient suggéré que la pollution de l'air pouvait avoir un effet délétère sur la qualité spermatique, la plupart évaluent l'exposition à niveau écologique plutôt qu'à niveau individuel ; tel qu'elle est estimée dans la présente thèse. De plus, peu d'études ont pris en compte de l'exposition aux polluants atmosphériques sur différentes périodes pour évaluer leur effet pendant les périodes clés de la spermatogenèse. Des recherches supplémentaires sont nécessaires, en utilisant des échantillons répétés et une estimation précise de l'exposition à la pollution atmosphérique ; en vue de fournir plus de critères permettant de déterminer si l'exposition à la pollution atmosphérique altère la qualité spermatique.

1.2.3 Température ambiante

Selon un récent rapport sur le climat de l'Organisation météorologique mondiale (OMM), en mai 2022 : « il est probable à 40 % que la température mondiale annuelle moyenne soit temporairement supérieure de 15°C aux valeurs préindustrielles pendant au moins l'une des cinq prochaines années et cette probabilité augmente avec le temps »⁹¹.

L'exposition aux températures ambiantes extrêmes a d'importants effets physiologiques sur les humains. Les changements de température ambiante sont associés à des variations des taux de morbidité et de mortalité⁹². Une étude réalisée à Hong Kong qui a collecté des données sur les admissions hospitalières du 1er janvier 1998 au 31 décembre 2009 a signalé une augmentation des admissions de 4.5 % pour chaque augmentation de 1°C au-dessus de 29°C pendant les mois chauds, tandis que pendant la saison froide les admissions augmentent de 1.4 % pour chaque diminution de 1°C dans la fourchette de 8.2 à 26.9 °C⁹².

L'augmentation de la température ambiante induite par le changement climatique pourrait également constituer une menace pour la fertilité masculine. Le processus de spermatogenèse est extrêmement sensible aux changements de température. La température du scrotum est entre 2°C et 4°C inférieure à celle du reste du corps⁹³. Une température testiculaire supérieure à 35°C peut produire des altérations de la spermatogenèse, entraînant une diminution du nombre total de spermatozoïdes et des altérations de la motilité, de la morphologie et une fragmentation accrue de l'Acide désoxyribonucléique (ADN)⁹⁴.

L'impact de la température sur la fertilité humaine a fait l'objet de nombreuses discussions au cours des dernières années. Une étude publiée en 2003 et qui a recueilli et analysé les données sur la température globale de l'air dans 19 pays industrialisés entre 1900 et 1994 a mis en évidence une association négative entre les variations de température et les taux de natalité annuels de ces pays⁹⁵.

Bien que peu d'études épidémiologiques sur l'effet de la température ambiante sur la qualité spermatique aient été menées, la littérature dispose d'un ensemble substantiel de données sur la relation entre les fluctuations saisonnières et leurs effets sur les paramètres spermatiques. Les résultats d'une étude menée par Levine *et al*, dans laquelle ils ont comparé la qualité spermatique de 131 travailleurs extérieurs pendant l'été et l'hiver, publiés en 1990, montrent des diminutions significatives de la concentration spermatique, du nombre total de spermatozoïdes et de la concentration de spermatozoïdes mobiles pendant l'été⁹⁶. Gyllenborg *et al* . ont rapporté en 1999 qu'il y avait une association entre les altérations de la qualité spermatique et les variations saisonnières, en particulier dans la concentration spermatique et le nombre total de spermatozoïdes. De plus, la même tendance saisonnière a été observée à des intervalles de cinq années consécutives⁹⁷. Une recherche portant sur 1082 hommes fertiles de quatre

viles européennes (Copenhague, Danemark ; Paris, France ; Édimbourg, Écosse ; et Turku, Finlande) a reporté que le nombre total de spermatozoïdes et la concentration spermatique étaient plus élevés pendant la saison d'hiver par rapport aux mois d'été⁹⁸ ; Plus récemment, De Giorgi *et al* (2015)⁹⁹ et Tang *et al* (2022)¹⁰⁰ ont également signalé des modifications des paramètres spermatiques dues aux variations saisonnières, au cours desquelles une meilleure qualité spermatique a été observée pendant la saison hivernale par rapport à la saison estivale.

Il existe des preuves sur les effets des variations saisonnières de température sur la qualité spermatique, mais les études épidémiologiques sur les effets de la température ambiante sur les paramètres spermatiques sont toujours limitées, et la plupart ont été réalisés sans échantillonnage de sperme à répétition, et sans avoir l'information précise et individualisée sur les températures ambiantes auxquelles les participants des études étaient exposés. Les résultats de ces études indiquent que des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il existe ou non un lien entre la qualité spermatique et l'exposition à la température ambiante, et plus précisément son impact sur les paramètres spermatiques.

CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

2.1 Objectif principal et objectifs spécifiques

2.1.1 Objectif principal

L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer s'il existe une association entre l'exposition à des facteurs environnementaux et la qualité spermatique.

Les facteurs environnementaux évalués sont :

- La pollution atmosphérique
- La température ambiante

2.1.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont de :

- Évaluer les effets de l'exposition sur différentes fenêtres d'exposition à la pollution de l'air sur certains paramètres de la qualité spermatique (volume séminal, concentration spermatique, motilité progressive, nombre total de spermatozoïdes et fragmentation de l'ADN) dans une population sensible.
- Évaluer les effets de la température ambiante sur différentes fenêtres d'exposition sur certains paramètres de la qualité spermatique (volume séminal, concentration spermatique, motilité progressive), dans une population des individus normozoospermiques.

2.2 Hypothèses

Les hypothèses suivantes ont été développées sur la base de la littérature précédemment citée dans le chapitre 1 de cette thèse.

- L'exposition à la pollution de l'air est associée à une diminution de la qualité spermatique et à une fragmentation accrue de l'ADN, ce qui pourrait être associé à une diminution de la santé reproductive masculine.
- Les effets de la pollution de l'air diffèrent selon la période de spermatogenèse à laquelle le sujet est exposé.
- L'exposition à des températures ambiantes élevées est associée à une diminution de la qualité spermatique et à une augmentation de la fragmentation de l'ADN.

CHAPITRE 3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Populations

Les données de deux populations d'études différentes ont été utilisées dans le cadre de cette thèse, et sont présentées ci-dessous

3.1.1 La cohorte SEMAP (pour l'étude des effets de l'exposition aux polluants de l'air sur qualité spermatique)

L'étude des effets de l'exposition aux polluants de l'air sur les paramètres de qualité spermatique a été menée dans la cohorte SEMAP : Qualité SEMinale et Pollution de l'Air, composé d'hommes issus de couples ayant fréquenté le Centre d'infertilité et de reproduction humaine (CIRH) de la ville de Barcelone (Espagne), entre 2014 et 2018. Afin d'acquérir un large spectre de variabilité des paramètres spermatiques, les participants ont été sélectionnés indépendamment de la cause d'infertilité pour laquelle ils ont consulté (masculine, féminine ou inconnue). Ceux qui ont accepté de faire partie de l'étude et qui résidaient en Catalogne ont été inclus. Les sujets ayant subi une vasectomie ou ne résidant pas en Catalogne ont été exclus. Par ailleurs, les participants qui avaient une azoospermie obstructive ou de varicocèle (grade 2, 3 ou bilatérale), qui sont toutes deux des altérations liées à l'appareil reproducteur qui entraînent une réduction de la qualité spermatique ont été exclus. Finalement, les sujets atteints d'asthénotératozoospermie sévère ont été exclus car il est peu probable que les facteurs environnementaux soient la cause principale compte tenu de la sévérité de cette affection.^{101, 102}

Pendant le recrutement, un document d'information sur le projet a été remis (Annexe 1), ainsi que le consentement du patient à être signé (Annexe 2) et un questionnaire détaillé sur l'exposition environnementale (Annexe 3) qui recueille des renseignements sur les facteurs suivants: expositions environnementales et professionnelles, consommation de tabac, d'alcool et de drogues, exposition à des produits chimiques, utilisation du téléphone portable, activité physique et habitudes alimentaires ; ainsi que leurs adresses de résidence et de travail et d'autres données socio-économiques. Les participants qui ne sont pas revenus, ou qui n'ont pas rempli le consentement ou le questionnaire, n'ont pas été inclus dans l'étude.

Pour évaluer l'effet de la pollution de l'air sur la qualité spermatique, 289 personnes ont été sélectionnées parmi celles qui étaient initialement éligibles, après exclusion des participants qui n'ont pas indiqué leur adresse résidentielle.

Plusieurs spermogrammes ont été prélevés pour chaque patient, à des périodes différentes, donnant un total de 1114 échantillons parmi tous les sujets. Dont 947 ont été inclus dans l'étude sur la pollution de l'air.

3.1.2 La cohorte de potentiels donneurs de sperme (pour l'étude des effets de l'exposition à la température ambiante sur qualité spermatique)

Afin d'évaluer l'effet de la température ambiante sur les paramètres de qualité spermatique chez les individus normozoospermiques, une cohorte composée de 172 hommes sains, résidant en Catalogne, ayant fréquenté le CIRH en tant que donneurs potentiels de sperme entre 2007 et 2012, a été constituée. Chaque participant a fait l'objet d'une entrevue individuelle, et son dossier médical a été inclus. Les données recueillies comprennent les caractéristiques sociodémographiques, l'utilisation des médicaments, les allergies, le style de vie (consommation du tabac, alcool ou drogues), les antécédents médicaux familiaux, l'adresse résidentielle, etc. Au total, 597 spermogrammes ont été recueillis auprès de ces participants.

3.2. Paramètres classiques d'un séminogramme

3.2.1 Paramètres spermatiques classiques

Des échantillons de sperme ont été prélevés sur place par masturbation dans des contenants stériles après une période d'abstinence (deux à cinq jours ont été requis). Les échantillons ont ensuite été liquéfiés à 37 °C pendant 20 minutes, puis traités dans les 45 minutes qui ont suivi l'échantillonnage. Les prélèvements ont été mesurés dans un tube centrifuge gradué de 15 mL afin de déterminer le volume séminal (mL). Une aliquote de l'échantillon a été utilisée pour déterminer la concentration de spermatozoïdes (mill /mL) et la motilité progressive (%) à l'aide d'une analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA), d'une caméra de comptage Leja (Leja Products BV, Pays-Bas) et d'un microscope platine chauffée à 37°C.

Le nombre total des spermatozoïdes (10^6) a été calculé à partir du produit du volume séminal et de la concentration de spermatozoïdes.

3.2.2 Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN n'a été mesurée que par les participants de la cohorte SEMAP. Celle-ci a été détectée en utilisant la technique de l'analyse de la structure chromatine du sperme (SCSA pour ses acronymes en français)¹⁰³ à l'aide d'un cytomètre en flux MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Chaque échantillon de sperme a été dilué avec le tampon TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Éthylènediaminetétraacétique (EDTA), pH 7.5) jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 2×10^6 spermatozoïdes/mL dans un volume final de 200 μ L. Ensuite, l'échantillon est traité avec la solution acide (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2N HCl, pH 1.2) et après 30 secondes la coloration à l'acridine orange (6 μ g/mL) est réalisée pendant 3 minutes. Au bout de ce temps, l'acquisition peut être réalisée avec le cytomètre en flux, en comptant 5 000 spermatozoïdes. Finalement, on a signalé le pourcentage de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté.

Selon la sixième édition du Manuel de laboratoire de l'OMS pour l'analyse et la préparation du sperme humain, la fragmentation de l'ADN constitue un test qui, sans être routinier, pourrait être utile à des fins de diagnostic ou de recherche⁴⁴.

La technique du SCSA est très reproductible¹⁰⁴. De nombreuses publications ont mis en évidence son relevance dans l'évaluation de la fertilité masculine. Une étude menée auprès de 215 couples danois qui prévoient une première grossesse et qui n'étaient pas au courant de leur potentiel de fertilité a souligné le SCSA comme un outil qui contribue à l'identification des échantillons de sperme de faible qualité, qui auraient pu ne pas être détectés au cours de l'analyse de routine¹⁰⁵. Selon deux études distinctes, Bungum *et al*¹⁰⁵ and Giwercman *et al*¹⁰⁶ ont affirmé que la fragmentation de l'ADN détectée par le SCSA est un prédicteur indépendant de la fertilité masculine *in vivo*. Bungum recommande également que tous les hommes qui subissent des analyses ou des traitements de fertilités devraient être soumis à un test SCSA en complément des analyses de sperme de routine. Lu *et al* suggèrent d'utiliser le SCSA pour évaluer la qualité spermatique chez les hommes âgés¹⁰⁷, et Zang *et al* recommandent son utilisation comme test supplémentaire chez les hommes âgés présentant une motilité progressive réduite¹⁰⁸.

Dans cette thèse, les valeurs-limites de référence de l'OMS proposées dans son cinquième manuel de laboratoire pour l'examen et le traitement du sperme humain ont été utilisées³², à savoir : $\geq 1,5$ mL pour le volume séminal, $\geq 15 \times 10^6$ /mL pour la concentration de spermatozoïdes, ≥ 32 % pour la motilité progressive et 39 millions par éjaculat pour le nombre total de spermatozoïdes. Dans le cas de la fragmentation de l'ADN, on a utilisé les valeurs- limites de référence du test SCSA (< 25 %).

3.3. Variables d'exposition

3.3.1. Pollution de l'air extérieur

L'évaluation de l'exposition à la pollution de l'air a été estimée pour différents intervalles de temps (fenêtre d'exposition) avant l'échantillonnage de sperme, afin de prendre en considération toute la période de spermatogenèse (90 jours) et les périodes clés de développement du sperme: 9 jours avant le prélèvement, ce qui correspond à la phase de stockage épидidymaire; 10 - 14 jours, ce qui correspond à l'évolution de la motilité du sperme; 70 - 90 jours, soit la durée totale de la spermatogenèse¹⁰⁹.

Les adresses résidentielles, pour les participants des deux cohortes, et professionnelle pour les participants de la cohorte SEMAP, à l'inclusion ont été géocodées. Les concentrations de NO₂, NO_x^{110, 111} et PM¹¹² ont été estimées pour chaque adresse à l'aide des modèles LUR développés dans le cadre du projet européen ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects; www.escapeproject.eu). Ce projet avait pour objectif d'étudier les effets sur la santé d'une exposition à long terme à la pollution atmosphérique dans 36 sites d'étude européens, dont Barcelone et la Catalogne. Les modèles LUR, utilisent des variables urbaines à micro-échelle telles que l'intensité du trafic et la densité de population, en utilisant des SIG et des régressions logistiques, pour prédire des concentrations extérieures de polluants atmosphérique pour une adresse donnée.

La Figure 3.1 présente les distributions des niveaux des différents polluant de l'air à Barcelone modélisée à partir des modèles LUR.

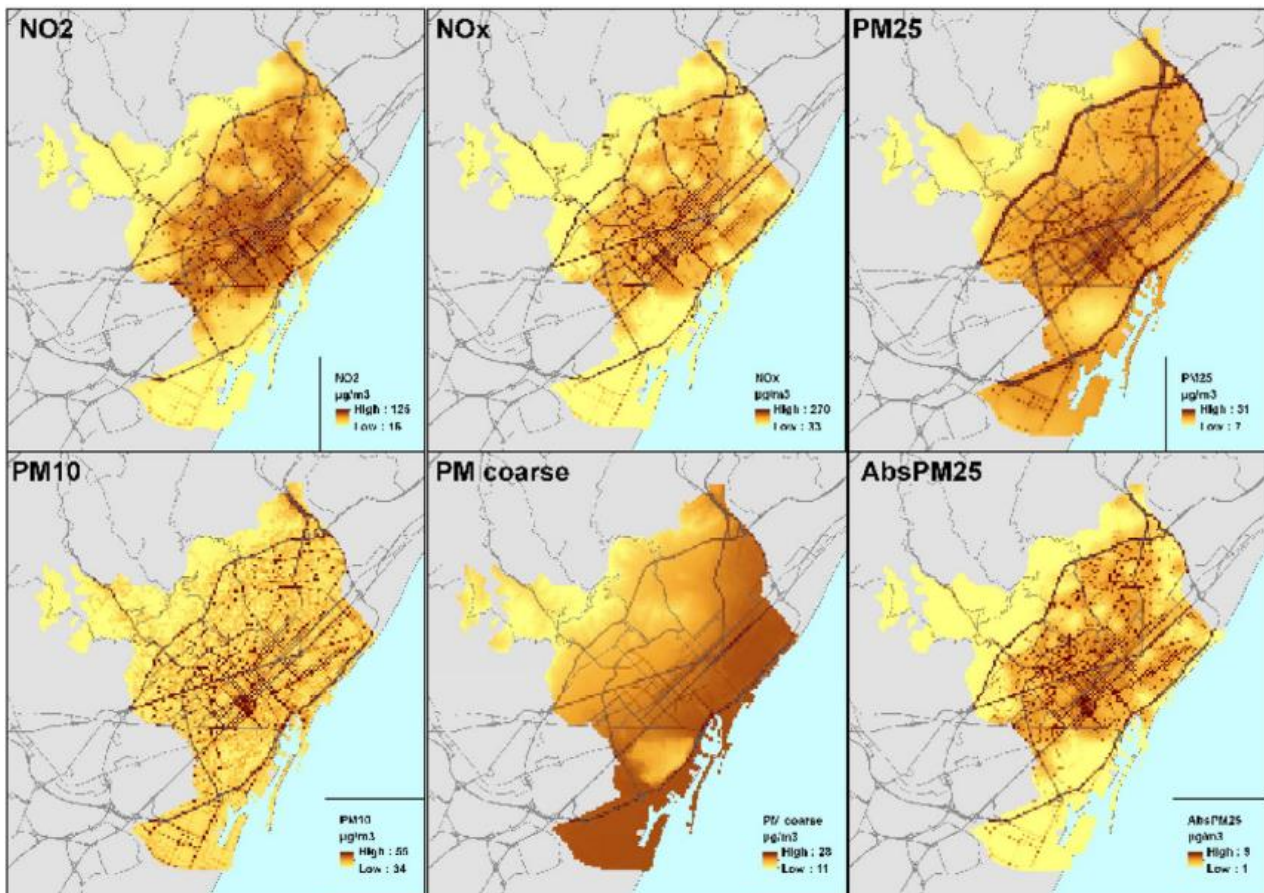


Figure 3.1. Distributions des niveaux de pollution de l'air à Barcelone modélisée à partir des modèles LUR. Extrait de : Nieuwenhuijsen MJ, Basagaña X, Dadvand P, *et al.* Air pollution and human fertility rates. *Environment International*. 2014;70:9-14. doi:10.1016/j.envint.2014.05.005

Pour les participants de la cohorte SEMAP, nous avons utilisé les adresses résidentielles des participants pour évaluer leur exposition à chacun des polluants dans le temps, en utilisant les fenêtres d'exposition décrites précédemment.

Tout changement d'adresse reportée par le participant dans leur dossier médical, a été pris en compte pour les calculs d'exposition.

3.3.2. Température ambiante

On a calculé les températures maximales, moyennes et minimales auxquelles les participants de la cohorte de potentiels donneurs de sperme étaient exposés, en considérant les mêmes fenêtres d'exposition que pour la pollution atmosphérique, c'est-à-dire entre 0 – 9; 10 -14 ; 70 - 90 et 0 - 90 jours avant l'échantillonnage.

La température moyenne quotidienne a été calculée en extrayant les données des stations météorologiques disponibles situées dans les zones de qualité de l'air (ZQA) les plus

proches de la zone de résidence des participants. Les ZQA sont les secteurs dans lesquels des stations de surveillance de la pollution de l'air sont situées. Les concentrations des polluants mesurés dans une ZQA sont représentatifs des niveaux de fond de l'ensemble du secteur qui la comprend, et la surface de chaque ZQA est homogène en ce qui concerne l'orographie, les conditions météorologiques, la densité de population et le volume des émissions industrielles et du trafic. Cela signifie qu'en Catalogne il n'est pas nécessaire de mesurer la qualité de l'air sur l'ensemble du territoire, mais il suffit de disposer de données pour chaque type de secteur dans une ZQA, car deux secteurs du même type et dans la même zone auront des niveaux d'émission équivalents. Les niveaux d'émission sont caractérisés en fonction de l'occupation des sols (niveau 1 : zones urbaines, suburbaines ou rurales) et du type de sources d'émission qui affectent le territoire à évaluer (niveau 2 : zones de circulation automobile, zone industrielle ou de fond)¹¹³.

3.3.3. Autres variables d'intérêt

Les variables suivantes ont été considérées en tant que facteurs de confusion potentiels en fonction de leur association avec les paramètres de qualité spermatique et de leur inclusion dans des recherches antérieures^{114, 115, 116, 117, 118} : l'âge des participants (35 ans ou moins - plus de 35 ans); l'indice de masse corporelle (IMC) (Sain, surpoids, obèse); le tabagisme (fumeur - non-fumeur); la consommation d'alcool (oui - non) et, pour l'analyse de la température ambiante, le statut socio-économique (SES pour leur acronyme en anglais « Socioeconomic Status »).

3.3.4. Analyses statistiques

Des modèles mixtes multivariés avec interception aléatoire ont été utilisés pour évaluer les associations de polluants de l'air ou la température avec les paramètres de qualité spermatique, en considérant la distribution de chaque paramètre. Pour la concentration de spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes, la régression binomiale négative a été utilisée car il s'agit d'un modèle qui permet de modéliser des variables de comptage dont le résultat est généralement sur dispersé. Pour le volume séminal, une régression linéaire transformée de manière logarithmique a été effectuée afin de s'assurer que les données étaient normalement distribuées ; et pour la motilité progressive et la fragmentation de l'ADN, une régression Tobit a été utilisée car les données observées dans ces variables dépendantes, qui sont rapportées en pourcentages, sont censurées.

CHAPITRE 4. RESULTATS

Cette section inclut deux articles scientifiques, le premier, soumis, est ici retranscrit tel que dans la soumission, juste en traduisant le résumé et adaptant la mise en forme pour faciliter la lecture, le deuxième sera soumis dans les prochaines semaines.

4.1 Associations entre la pollution de l'air extérieur et paramètres spermatiques : Évidences recueillies auprès d'hommes de couples ayant fréquenté une clinique de fertilité à Barcelone, en Espagne.»

4.1.1 Résumé en français

Contexte : La qualité spermatique est un facteur contribuant à la fertilité des couples et peut être influencée par divers facteurs environnementaux, notamment l'exposition à la pollution de l'air.

Objectif : Évaluer les effets de l'exposition à la pollution de l'air sur la qualité spermatique chez les hommes issus de couples ayant des problèmes de fertilité, pour plusieurs polluants et fenêtres d'exposition.

Méthodes : Des hommes ont été recrutés parmi des couples fréquentant une clinique de procréation assistée à Barcelone entre 2014 et 2018. Leur mode de vie, leurs données démographiques et leurs adresses de domicile et de lieu de travail ont été recueillis au moyen d'un questionnaire. Les paramètres spermatiques analysés étaient le volume séminal, la concentration spermatique, la motilité progressive, le nombre total des spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN. L'exposition au NO₂, NO_x, PM₁₀, PM_{2.5}, PM_{2.5}absorbance et PM_{coarse} a été estimée à l'aide de modèles LUR, à l'adresse résidentielle et professionnelle, pour différentes fenêtres d'exposition (0 - 9, 10 - 14, 70 - 90 et 0 - 90 jours avant l'échantillonnage). Les estimations, dérivées de modèles multiniveaux pour tenir compte des mesures répétées, ont été ajustées en fonction de l'âge, de l'IMC, du tabagisme et de la consommation d'alcool. Des analyses stratifiées ont été réalisées par groupe d'âge, statut tabagique, statut IMC et zone géographique d'exposition.

Résultats : 289 participants correspondant à 947 échantillons (3.23 échantillons par participant) ont été inclus. L'âge moyen des participants était de 37 ans. Une diminution de la motilité progressive associée aux PM₁₀ a été observée pour la fenêtre d'exposition de 0 à 90 jours (β : -1.80 ; IC : -3.28 ; -0.31). Une diminution du volume séminal associée aux

PM_{2.5} (β : -0.038 ; IC : -0.076 ; -0.001) pour la fenêtre d'exposition 0 - 9 jours ; et une augmentation de la fragmentation de l'ADN (β : 1.56 ; IC : 0.09 ; 3.02) pour la fenêtre d'exposition de 0 à 90 jours a été observée. Enfin, une augmentation du nombre total de spermatozoïdes associée aux NO_x (β : 0.114 ; IC : 0.012 ; 0.284), PM_{2.5} (β : 0.09 ; IC : 0.04 ; 0.19) et PM_{2.5abs} (β : 0.10 ; IC : 0.008 ; 0.202) ont été trouvés dans la fenêtre d'exposition de 70 à 90 jours. Aucune autre association statistiquement significative n'a été trouvée.

Conclusion : Nos résultats suggèrent que les polluants atmosphériques peuvent avoir un impact délétère sur les paramètres spermatiques, et ces résultats dépendent du paramètre du sperme, du polluant et de la fenêtre d'exposition évaluée.

4.1.2 Introduction

Infertility is defined as the inability to conceive after a period of 12 months or more of unprotected sexual intercourse¹. According to World Health Organization (WHO) estimates, infertility affects an estimated 48 million couples worldwide². Male factors may contribute for to be primarily responsible for 20-30% of infertility cases³. The decrease in seminal quality is one of the causes that could be associated with the increase in infertility and is widely documented by several studies^(4,5), including the one conducted by Carlsen *et al* in 1992, which evidenced a drastic decrease in seminal quality in the last fifty years⁶. However, other authors did not observe any decrease in semen quality over time^(7, 8, 9). It is these inconsistencies that highlight the need to continue conducting studies on the subject.

An increasing body of evidence indicates that environmental factors have an important role in semen quality. One of these factors is air pollution. Air pollution is associated with a range of adverse health effects¹⁰, and there are already studies suggesting that air pollution exposure is associated with lower seminal quality. In 1997, Mehta and Kumar described an association between suspended particulate matter exposure and significant decreases in both semen volume and sperm concentration in Indian men¹¹. Wu *et al*¹² reported a negative association between PM_{2.5} exposure and total sperm number among men partners of women who underwent assisted reproductive technology procedures in samples collected between 2013 and 2015 in Wuhan, China.

More recently, a significant decrease in progressive motility, total sperm number, and total motility, was reported by Lieu *et al.* in a study conducted between 2009 and 2019 in 23936

sperm donor candidates in Henan Province, China.¹³ However, the results obtained in those studies are not always consistent and those differences could be due to the use of a single sample per patient for analyzes of sperm quality or by the absence of individual measuring data on the levels of air pollution to which each participant is exposed, among others.

This study proposes to assess the effects of exposure to air pollution on some sperm quality parameters (seminal volume, sperm concentration, progressive motility, total sperm number and DNA fragmentation); in a population of men from couples with fertility problems who attended an Assisted Reproduction center, using precise data on contamination at the individual level.

4.1.3 Material and Methods

4.1.3.1 Study design and subject recruitment

We included men from couples who attended the Infertility and Human Reproduction Center (CIRH) in Barcelona (Spain), between 2014 and 2018, regardless of the reason for consultation (male, female, or unknown infertility). Those who agreed to be a part of the study and who resided in Catalonia were included. Subjects who had undergone a vasectomy or who did not reside in Catalonia were excluded, Participants with obstructive azoospermia or varicocele (grade 2, 3 or bilateral) were also excluded, as these two conditions are associated with alterations in the male reproductive system and could lead to a decrease in seminal quality. Finally, subjects with severe asthenoteratozoospermia were excluded since environmental factors are unlikely to be the main cause given the magnitude of this condition.^{14, 15}.

Each participant received at the time of recruitment, a document with the information about the project as well as an informed consent form to sign.

All individuals completed an extended questionnaire to collect information related to the following factors: environmental and occupational exposures, tobacco, alcohol and drug consumption, exposure to chemical products, mobile phone use, physical activity, and dietary habits; as well as their residence and workplace addresses and other socio-economic data. Participants who did not return, or who did not fill out the consent or questionnaire, were not included in the study.

Multiple spermograms were collected for each participant: the one at the time of recruitment and the retrospective and prospective ones from medical histories. In total, 1114 spermograms were obtained, of which 947 were included in the final analysis. This study was approved by the Ethics Committee of the Parc de Salut Mar.

4.1.3.2 Semen collection and analyses

Classic sperm parameters.

Semen samples were gathered on-site by masturbation into sterile containers after an abstinence interval (2 – 5 days were requested). The samples were then liquefied at a temperature of 37°C for 20 minutes and processed within the first 45 minutes after collection. Samples were measured in a 15 mL graduated centrifuge tube to determine the seminal volume (mL). An aliquot of the sample was used to determine the sperm concentration (mill / mL) and the progressive motility (%) using a computer-aided sperm analysis (CASA), a Leja counting camera (Leja Products BV, The Netherlands) and a microscope heated stage to 37°C.

The total sperm number (10^6) was calculated from the product of the seminal volume and the sperm concentration.

DNA Fragmentation.

DNA fragmentation was detected using the Sperm chromatin structure assay (SCSA) technique⁶. For this, a MACSQuant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotec) was used. Briefly, each semen sample was diluted with the TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) until obtaining a final concentration of 2×10^6 sperm / mL in a final volume of 200 μ L. Then, the sample is treated with the acid solution (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2N HCl, pH 1.2) and after 30 seconds the staining with acridine orange (6 μ g / mL) is carried out for 3 minutes. After this time, the acquisition can be carried out with the flow cytometer, counting 5,000 sperm. Finally, the percentage of sperm with fragmented DNA was reported.

4.1.3.3 Air pollution data and exposure assessment

The levels air pollution was estimated using exposure models developed within the framework of the ESCAPE project (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects;

www.escapeproject.eu) which aimed to study the health effects of long-term exposure to air pollution in 36 European study locations.

The spatial exposure assessment approach was developed using LUR (Land Use Regression) models.¹⁶ This method uses logistic regression equations to predict outdoor concentrations at any point in the modeling area, based on micro-scale urban features such as traffic intensity and population density. A GIS (Geographic Information System) was used to store and map information on locations, road networks, traffic density and composition, population density, altitude, and meteorological variables. There are LUR models developed within the ESCAPE project specific for the main air pollutants: NO₂ and NO_x^{17, 18} and for PM (Particulate Matter)¹⁹.

A three measurement campaigns were conducted in different regions of Barcelona 3 times for 15 days throughout a year. For PM's, 20 measurement stations were established, with 40 measurement points for NO₂ and NO_x.

The temporal exposure assessment to air pollution was estimated for different time intervals prior to collection of the semen sample in order to consider the different exposure windows corresponding to the spermatogenesis period (i.e. 90 days) as well as the key periods of sperm development: 9 days before the sampling, which corresponding to the epididymal storage phase; between 10 -14 days corresponding to the development of sperm motility and between 70 - 90 days which corresponds to the initial stage of spermatogenesis²⁰.

A weighted average of the concentrations of each air pollutant was calculated from each participant's personal addresses. Any change in the participant's residence had to be reported and was integrated into the exposure calculation.

4.1.3.4 Statistical analysis

To assess possible selection bias, the sociodemographic and lifestyle characteristics of study participants and excluded people were compared using the Student's t-test for the variables age and BMI, and the X₂ test to determine whether there was a difference in BMI categorization, education level and consumption habits between the two populations.

In addition, we used the ANOVA analysis of variance for the age and BMI variables, and the X₂ test for the BMI classification, education level and consumption habits (smoking habits and alcohol consumption), in order to compare if there were any significant differences between participants who had provided three or more samples, only two samples, or a single sperm sample.

We used multivariate mixed models with random intercept to evaluate the associations of the air pollutants with sperm quality, considering the distribution of each parameter. For the sperm concentration and total sperm number we use a negative binomial regression, for the seminal volume a log transformed linear regression was performed to ensure that the data were normally distributed. While for the progressive motility and DNA fragmentation a censored Tobit regression was used without any transformation, given their distribution.

Air pollution concentration were scaled by interquartile range (IQR). To estimate the association between long term exposure to air pollutants and sperm quality, a crude and an adjusted model of mixed effects were constructed. The main statistical model included the sperm parameter to be analyzed, as an outcome variable, and the concentrations of each of the air pollutants associated with the residence address of the participants, during different exposure windows (0 to 9 days, 10 to 14 days, 70 to 90 days, and 0 to 90 days before the sample collection). Estimates were adjusted for age, BMI, smoking status, and alcohol consumption. These variables were selected *a priori* bases on their association with semen quality parameters and their inclusion in previous research^{21, 22, 23, 24, 25}.

We also conducted subgroup stratified analyses on:

- Age group: There are studies suggesting that higher age is related with a reduction in sperm parameters. Ageing is associated with a decrease in serum testosterone levels and decreased spermatogenic function²⁶. We therefore performed a stratification analysis for those aged 35 or younger and those over 35 years as of the sampling date.
- Smoking status: The study participants were divided into 2 groups: smokers and non-smokers. Tobacco's adverse effects on male fertility are extensively reported in the literature. Sharma *et al* described a link between moderate or heavy smoking and lower sperm number and motility in a meta-analysis of 5,868 participants²⁷.
- BMI status: (healthy, no healthy). An increase in the prevalence of male obesity has been observed around the world in recent decades, coinciding with an increase in male fertility issues.²⁸ A high BMI could predict a detrimental impact on sperm quality. Obesity has been linked to decreased sperm quality in certain studies^{29, 30}.
- Geographic area of exposure: (Barcelona-Rest of Catalonia): Two LUR models were developed to estimate air pollutant exposures, with the model for Barcelona

being more precise than the one for the rest of Catalonia. The categories were developed based on the participants' residence addresses.

As not all participants submitted information about their workplace address, full data of individual subject contamination at their workplace was not available. Therefore, the main statistical analysis was conducted using only the information on the individual measurements of air pollution at each participant's residential address. However, sensitivity analyzes were developed to determine the robustness of our initial statistical model.

The first one was conducted by considering the concentrations of each air pollutant in the different exposure windows, which were estimated at each participant's residential and workplace addresses and based on the hours per day spent at each location (the legal working period in Spain is of 40 hours per week as stipulated by the Workers' Statute).

Some participants did not specify information about their workplace address, but they provided information related with their professional activity, which allowed to impute the exposure to air pollutants based on the measurements collected from their residence address, in those individuals that could perform a professional activity from home. This is the main reason why an additional statistical model, although identical to the one described above is also performed, in which are excluded the participants that had imputed data of their exposure to air pollutants.

We also tested the effects of air pollution exposure using the dichotomized classification and performing logistic regression adjusting for age, BMI, smoking status, and alcohol consumption.

This study includes a number of statistical analyses that consider different sperm parameters as well as various air pollutants. In order to calculate statistical power, the outcome with the greatest variability and least repeatability was chosen as a conservative option: sperm motility.

The calculations consider the categorization of the exposure variable into two groups (highly exposed, with concentrations above the third quartile, vs. the rest of the population). This classification was also done conservatively, since the final analysis using the continuous exposure to air pollutants could have more statistical power.

Based on these assumptions, a sample of 250 people has 80% power to detect a 5% difference in sperm motility.

The following values, obtained from our own data and the literature, were used to calculate statistical power:

- Lost to follow-up:10%
- Sperm motility variance: 410
- Final model R^2 : 15%
- Number of repeated measurements: 4
- Intra-class correlation of repeated measurements of sperm motility: 0.6
- Type I Error: 0.05

All the parameters were also dichotomized into normal/abnormal categories using the WHO (2010) lower reference limit values for sperm quality, which are ≥ 1.5 mL for seminal volume, $\geq 15 \times 10^6$ /mL for sperm concentration, $\geq 32\%$ for progressive motility and 39 million per ejaculate for total sperm number. For DNA fragmentation, the sperm chromatin structure assay lower reference values (SCSA) were used ($< 25\%$).

4.1.4 Results

4.1.4.1 Study population

A total 379 participants were recruited in this study, of which 289 were finally included in the analysis (Figure 1).

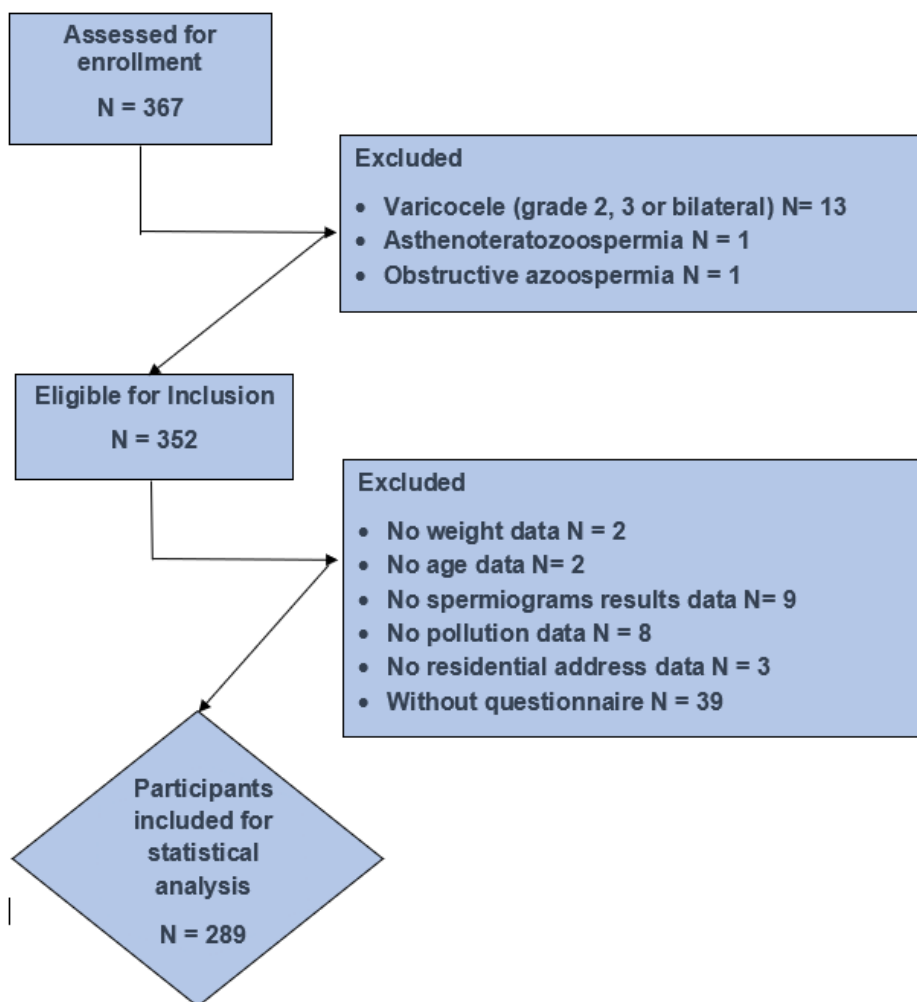


Figure 4.1. (Fig. 1 of the manuscript). Flow chart of the exclusion criteria for the study participants.

Table 1 shows the descriptive analysis of socio-demographic characteristics of 289 participants included in the final analysis. The mean age of the participants was 37 years (Standard deviation SD: 5.3) and each one contributes to average with 3.27 samples (SD: 1.88). 41.1% of the participants were overweight and approximately 15% were obese; while 66.8% were current-smokers, and approximately 89% was alcohol consumers.

Characteristics of the population	Total (N=289)
Age	
Mean (SD)	37.0 (5.3)
BMI (Kg/m²)	
Mean (SD)	26.2 (3.8)
BMI classification	N (%)
Healthy (between 18.5 and 24.9)	127 (43.9 %)

Characteristics of the population	Total (N=289)
Overweight (between 25.0 and 29.9)	119 (41.2 %)
Obese (≥ 30)	43 (14.9 %)
Consumption habits	N (%)
Smokers	193 (66.8 %)
Alcohol consumers	257 (88.9 %)
Education level	N (%)
Primary	29 (10.0 %)
Secondary	105 (36.3 %)
Graduate	155 (53.6 %)

Tableau 4.1 (Table 1 of the manuscript): Characteristics and lifestyle factors of the study population.

When comparing the sociodemographic and lifestyle characteristics of the study participants to those who were excluded, we found that there are no statistically significant differences between the two populations, except for age (p-value = 0.01), which is marginally lower in study participants. Smoking and alcohol consumption and smoking, which are higher in the included participants. The results of this analysis are presented in Supplementary Table S1.

Characteristics of the population	Included participants (N=289)	Excluded participants (N=78)	Statistical test	p-value
Age				
Mean (SD)	37.0 (5.3)	38.9 (3.96)	T de Student	0.015
BMI (Kg/m²)				
Mean (SD)	26.2 (3.8)	25.5 (3.51)	T de Student	0.27
BMI classification	N (%)	N* (%)		
Healthy (between 18.5 and 24.9)	127 (43.9 %)	16 (48.4 %)	χ^2 test	0.65
Overweight (between 25.0 and 29.9)	119 (41.2 %)	13 (39.4 %)		
Obese (≥ 30)	43 (14.9 %)	4 (12.1 %)		
Consumption habits	N (%)	N* (%)		
Smokers	193 (66.8 %)	16 (20.5 %)	χ^2 test	0.01
Alcohol consumers	257 (88.9 %)	28 (35.9 %)		5.46 E⁻⁷
Education level	N (%)	N* (%)		
Primary	29 (10.0 %)	2 (6.45 %)	χ^2 test	0.24
Secondary	105 (36.3 %)	16 (51.6 %)		
Graduate	155 (53.6 %)	13 (41.9 %)		

Tableau 4.2 (Table S1 of the manuscript): Socio-demographic characteristics and lifestyle factors of study participants compared to excluded individuals. *: For some patients, this information is missing. The percentage is relative with respect to the validated information for these demographic variables.

There are no significant differences in sociodemographic and lifestyle factors among participants who provided three or more samples, only two samples or only one sample, apart from the distribution of participants by educational level, which is higher in the group who provided only one sample (p-value= 0.01). Supplementary Table S2 contains the complete set of these results.

Characteristics of the population	Participants with only one sample (N=42)	Participants with two samples (N=73)	Participants with 3 or more samples (N=174)	Statistical test	p-value
Age					
Mean (SD)	36.0 (4.34)	36.8 (5.88)	37.3 (5.33)	ANOVA	0.31
BMI (Kg/m²)					
Mean (SD)	26.0 (3.96)	26.5 (4.31)	26.2 (3.53)	ANOVA	0.77
BMI classification	N (%)	N (%)	N (%)		
Healthy (between 18.5 and 24.9)	18 (42.9 %)	34 (46.6 %)	75 (43.1 %)	χ ² test	0.45
Overweight (between 25.0 and 29.9)	21 (50.0 %)	26 (35.6 %)	72 (41.4 %)		
Obese (≥ 30)	3 (7.1 %)	13 (17.8 %)	27 (15.5 %)		
Consumption habits	N (%)	N (%)	N (%)		
Smokers	30 (71.4 %)	45 (61.6 %)	118 (67.8 %)	χ ² test	0.51
Alcohol consumers	39 (92.9 %)	65 (89.0 %)	153 (87.9 %)		0.66
Education level	N (%)	N (%)	N (%)		
Primary	5 (11.9 %)	2 (2.7 %)	22 (12.6 %)	χ ² test	0.01
Secondary	8 (19.0 %)	28 (38.4 %)	69 (39.7 %)		
Graduate	29 (69.0 %)	43 (58.9 %)	83 (47.7 %)		

Tableau 4.3 (Table S2 of the manuscript): Sociodemographic and lifestyle characteristics of study participants based on the number of samples supplied.

60.2 % of participants contributed three or more samples, 25.3 % provided two samples, and 14.5 % supplied a single sample.

Table 2 shows the descriptive analysis of the sperm parameters of the total population. A total of 947 semen samples were analyzed. The mean seminal volume was 3.08 mL (SD: 1.49); mean semen concentration was 80.1 million/mL (SD: 83.6); the mean progressive motility was 40.3% (SD: 20.3), mean DNA fragmentation was 21.3% (SD: 10.5) and mean total sperm number was 235.64 million (SD: 270).

According to WHO 2010 guidelines, 10.14% of participants had low seminal volume, 0.84% low sperm concentration, 36.85% low progressive motility, 17.32 % low total sperm number and, according to Sperm chromatin structure assay (SCSA), 2.32% of participants had high DNA fragmentation.

Sperm parameter	Total (N=947)	WHO (2010) Lower reference limit values	Total Anormal parameter
Progressive motility (%)			
Mean (SD)	40.3 (20.3)	≥ 32%	n = 349 (36.85%)
(P25, P75)	(24.40, 55.10)		
Seminal volume (mL)			
Mean (SD)	3.08 (1.49)	≥ 1.5 mL	n = 96 (10.14%)
(P25, P75)	(2.00, 4.00)		
Total sperm number (millions per ejaculate)			
Mean (SD)	235.64 (270.27)	39 million per ejaculate	n = 164 (17.32 %)
(P25, P75)	(62.85, 296.55)		
Semen concentration (millions/mL)			
Mean (SD)	80.1 (83.60)	≥ 15x10 ⁶ /mL	n = 8 (0.84%)
(P25, P75)	(23.50, 108.75)		
DNA Fragmentation (%)			
Mean (SD)	21.3 (10.50)	< 25%*	n = 22 (2.32%)
(P25, P75)	(14.20, 27.15)		
Missing	552 (58.30%)		

Tableau 4.4 (Table 2 of the manuscript): Descriptive analysis of the sperm parameters of the total population included in the study and who attend an Assisted Reproduction center. *Sperm chromatin structure assay (SCSA): reference values.

Table 3 shows the descriptive analysis of the air pollutants modeled to the address of residence the participants.

Air pollutants - Residence address (N=947)	Mean (SD)	Median (Min, Max)	IQR
NO₂ (µg/m³)			
0- 90 days	35.40 (14.60)	35.10 (1.42 ; 97.30)	19.61
NO_x (µg/m³)			
0- 90 days	60.80 (30.10)	57.30 (1.05 ; 230)	39.26
PM_{2.5} (µg/m³)			
0- 90 days	10.70 (2.40)	10.40 (5.47; 18.20)	3.20
PM₁₀ (µg/m³)			
0- 90 days	22.30 (4.31)	21.90 (12.8 ; 48.90)	5.12
PM_{2.5} abs (10⁻⁵ m⁻¹)			
0- 90 days	1.91 (0.70)	1.81 (0.501 ; 4.59)	0.98
PM_{coarse} (µg/m³)			
0- 90 days	12.60 (3.05)	12.50 (5.90 ; 30.20)	4.66

Tableau 4.5 (Table 3 of the manuscript): Description of the air pollutants modeled to the address of residence for exposure window between 0 - 90 days before sampling. Mean (SD) in µg / m³ except for PM_{2.5}absorbance 10⁻⁵ m⁻¹

4.1.4.2 Estimation of the effects of long-term exposure to air pollutants in the sperm parameters

Progressive motility.

A statistically significant decrease associated with long-term exposure to PM₁₀ was observed for the exposure window between 0 - 90 days before sampling, both in crude (β: -1.82; 95% CI: - 3.28; - 0.36; p-value 0.01) and adjusted model (β: -1.80; 95%, CI: -3.28; - 0.31; p-value 0.02).

For the other air pollutants, no other statistically significant association was observed for this parameter. Figure 2 shows the set of estimation results in the adjusted model.

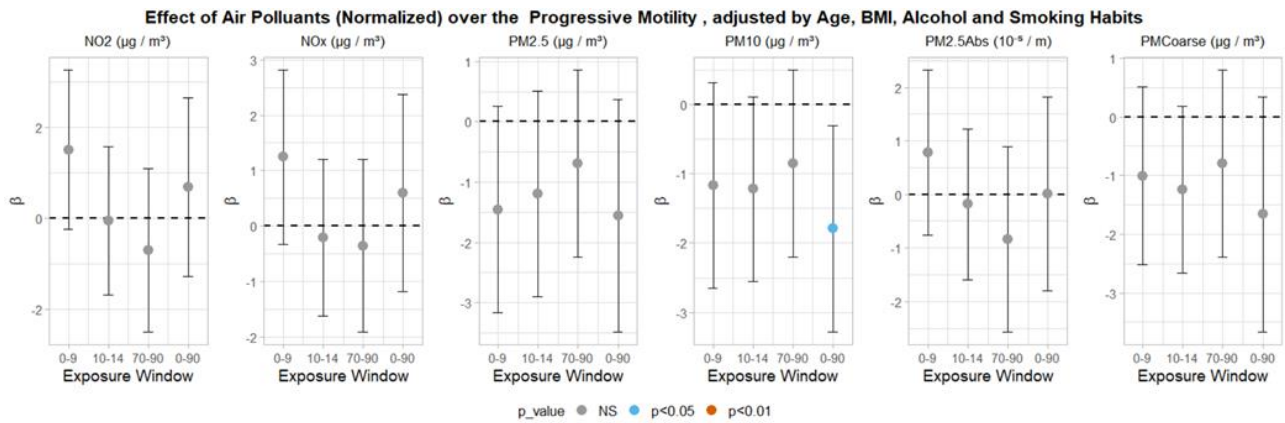


Figure 4.2 (Fig. 2 of the manuscript): Effect of air pollutants on **progressive motility** by exposure window, adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

Statistically significant associations (p-value < 0.05) are indicated in bold. Air pollutant concentrations are scaled by interquartile range (IQR).

Seminal volume

A statistically significant association between decreased seminal volume and long-term exposure to PM_{2.5} was observed for the exposure window between 0 - 9 days before sampling in the crude (β : -0.04; 95% CI: -0.077; -0.002; p-value 0.04) and adjusted model (β : -0.038; 95% CI: -0.076; -0.001; p-value 0.04).

No statistically significant association between PM₁₀, PM coarse, NO₂ or NO_x and seminal volume was observed. The set of estimation results in the adjusted models is shown in Figure 3.

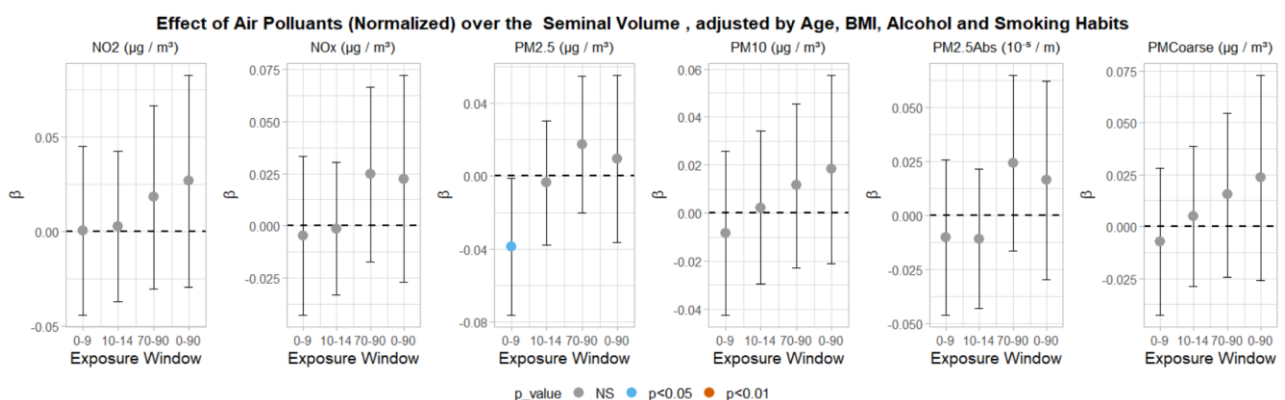


Figure 4.3 (Fig. 3 of the manuscript): Effect of air pollutants on **seminal volume** by exposure window, adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking.

Statistically significant associations (p-value < 0.05) are indicated in bold. Air pollutant concentrations are scaled by interquartile range (IQR).

Total sperm number.

In this parameter, a statistically significant increase in total sperm number, associated to long-term exposure to NO_x (Crude: β : 0.1141; 95% CI: 0.0117; 0.2165; p-value 0.03; Adjusted: β : 0.114; 95% CI: 0.012; 0.284; p-value 0.03); PM_{2.5} (Crude: β : 0.09 95% CI: 0.003; 0.19; p-value 0.04; Adjusted: β : 0.09; 95% CI: 0.04; 0.19; p-value 0.04); and PM_{2.5abs} (Crude: β : 0.10 95% CI: 0.006; 0.20; p-value 0.04; Adjusted: β : 0.10; 95% CI: 0.008; 0.202; p-value 0.03), always in the exposure window between 70 and 90 days before sampling.

For the other air pollutants, no other statistically significant association with total sperm number was observed. Figure 4 shows the set of the estimation results in the adjusted model.

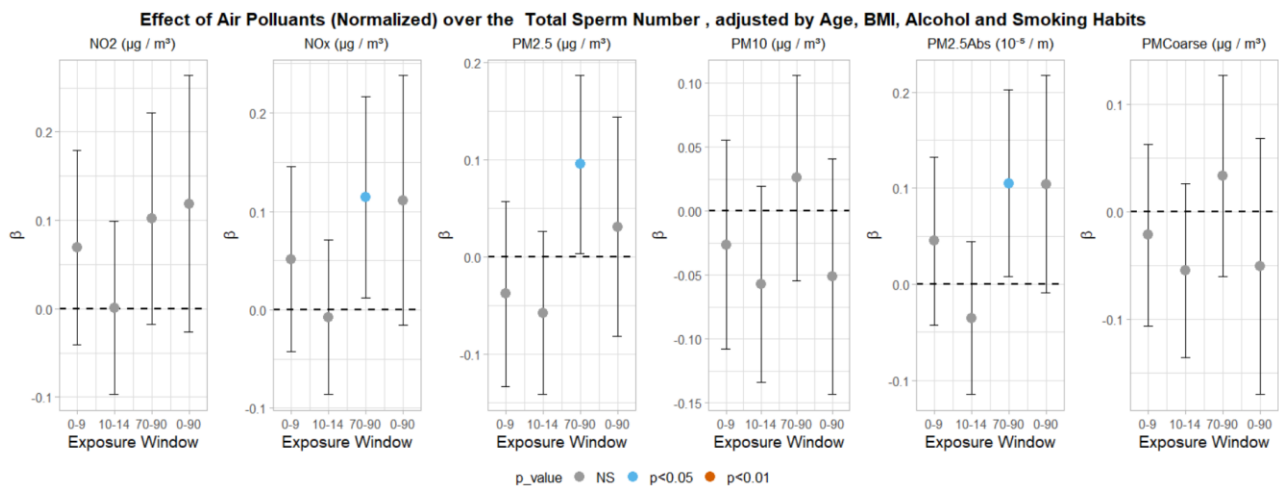


Figure 4.4 (Fig. 4 of the manuscript): Effect of air pollutants on **total sperm number** by exposure window, adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

Statistically significant associations (p-value < 0.05) are indicated in bold. Air pollutant concentrations are scaled by interquartile range (IQR).

Sperm concentration

In both crude and adjusted models, no association was observed between long-term exposure to air pollutants and sperm concentration. Figure 5 presents the set of estimation results in the adjusted models. Figure 5 presents the set of estimation results in the adjusted models.

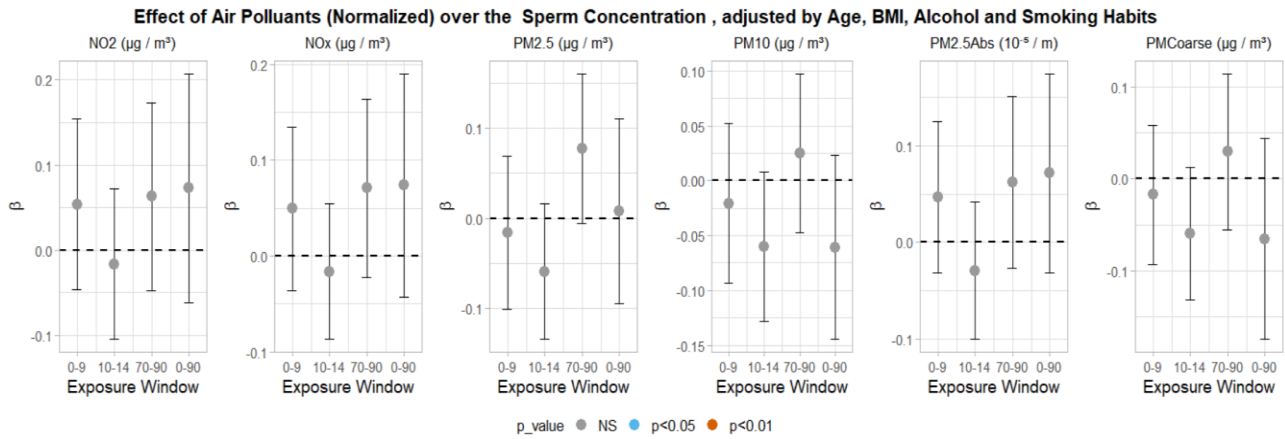


Figure 4.5 (Fig. 5 of the manuscript): Effect of air pollutants on **sperm concentration** by exposure window. adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

Statistically significant associations (p-value < 0.05) are indicated in bold. Air pollutant concentrations are scaled by interquartile range (IQR).

DNA Fragmentation.

For the exposure window between 0 - 90 days before sampling, a statistically significant association between increased DNA fragmentation and long-term exposure to PM_{2.5} was observed in both crude (β : 1.5; 95% CI: 0.08; 2.90; p-value 0.04) and adjusted model (β : 1.56; 95% CI: 0.09; 3.02; p-value 0.04). Figure 6 condenses the set of estimation results in the adjusted models.

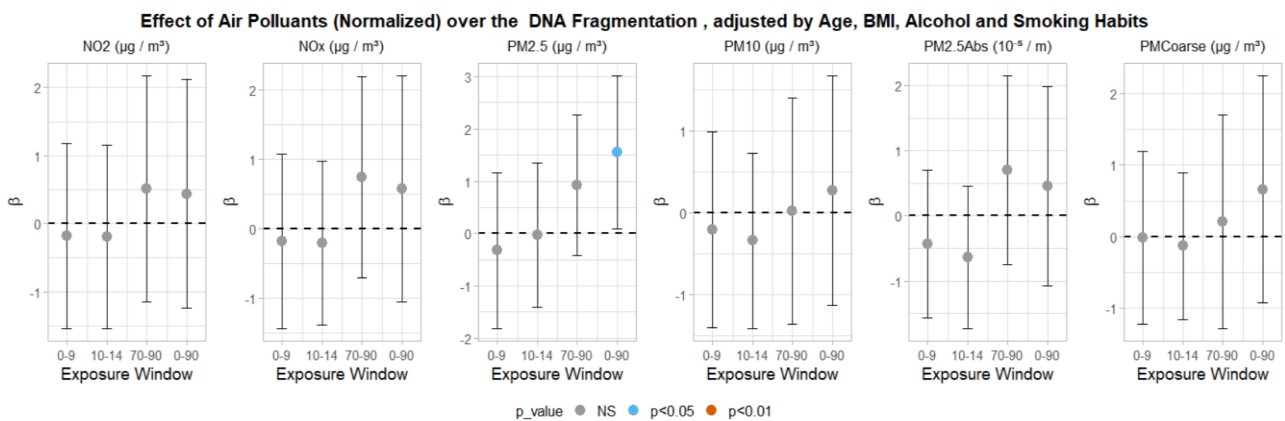


Figure 4.6 (Fig. 6 of the manuscript): Effect of air pollutants on **DNA fragmentation** by exposure window. adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

Statistically significant associations (p-value < 0.05) are indicated in bold. Air pollutant concentrations are scaled by interquartile range (IQR).

4.1.4.3 Stratified analyses

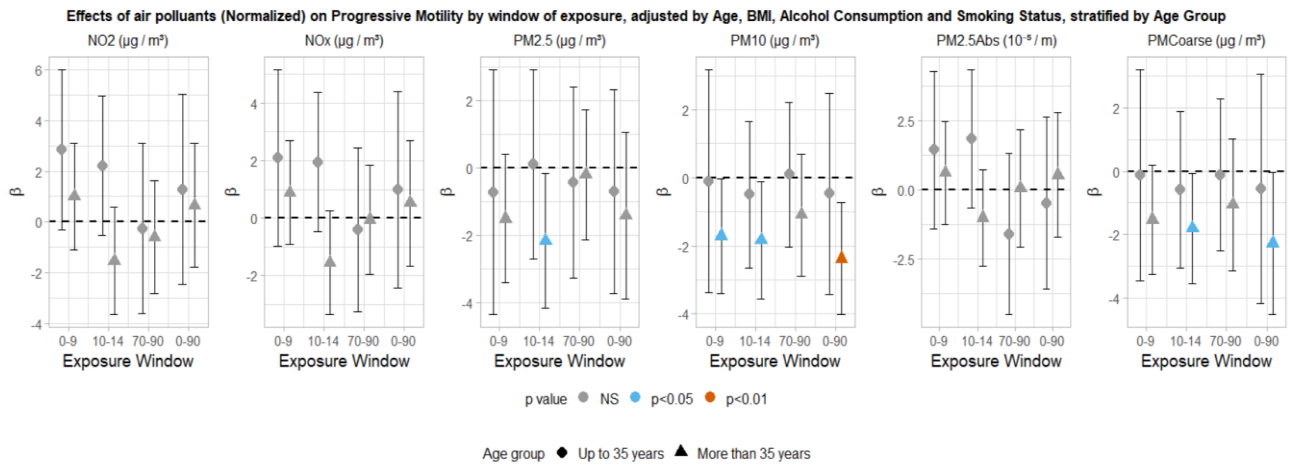
A statistically significant increase in seminal volume, associated to long-term exposure to $PM_{2.5abs}$ in the adjusted model was found in those up to 35 years old (β : 0.06; 95% CI: 0.002; 0.12; p-value 0.04), compared to those under 35 years old (β : -0.04 95% CI: -0.078; 0.0003; p-value 0.051), in the exposure window between 10 and 14 days before sampling.

For long term PM_{coarse} exposure, stratified according to geographic area of exposure, a statistically significant increase in DNA fragmentation in those who lives in Catalonia (β : 2.63; 95% CI: 0.9; 4.35; p-value 0.002) compared to those who lives in Barcelona (β : -2.70; 95% CI: -6.05; 0.67; p-value 0.12) was observed, in the exposure window between 0 – 90 days.

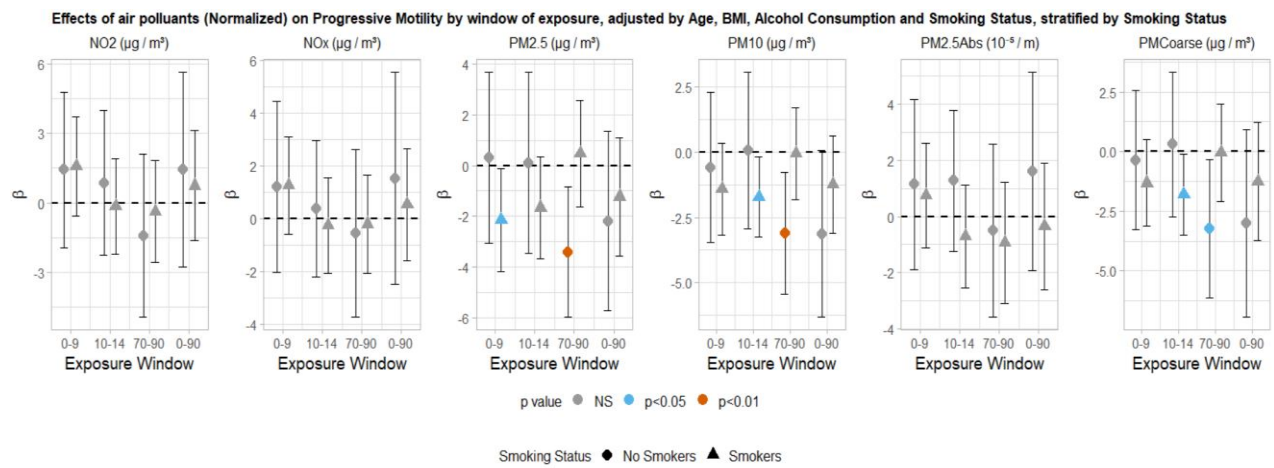
There were no significant differences between the different categories in the models stratified by BMI status and smoking status.

Supplementary Figures S1 to S5, condense the display of the results obtained in the stratified analyses.

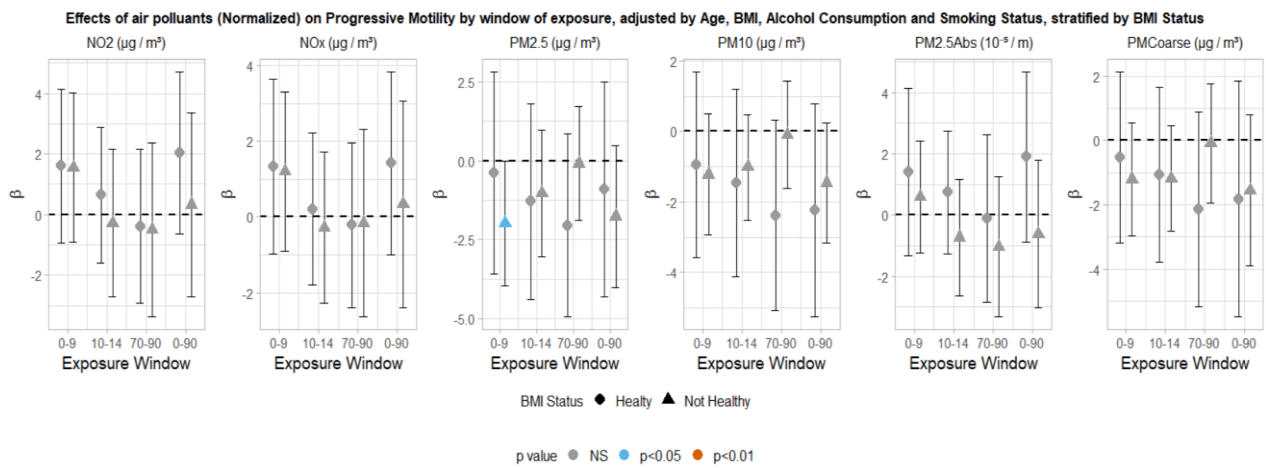
Figure 4.7 (Fig. S1 of the manuscript): Stratified effects of air pollutants on **progressive motility** by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.



a. Stratified by Age group.

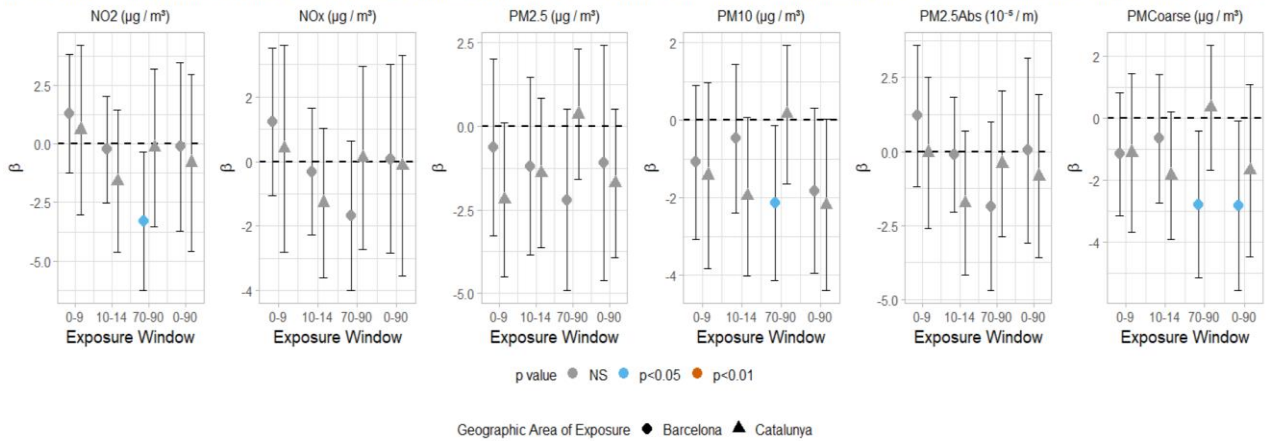


b. Stratified by Smoking status.



c. Stratified by BMI status.

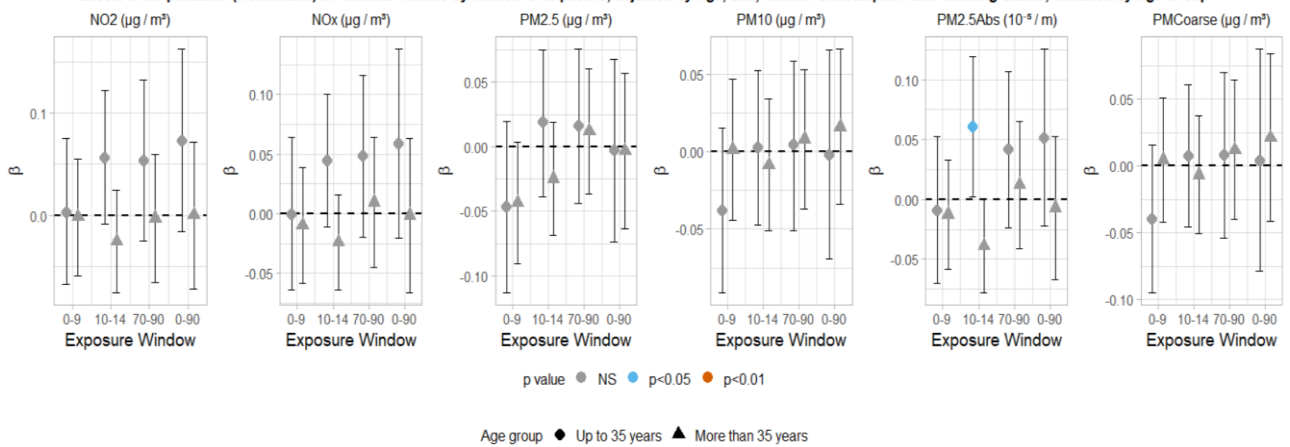
Effects of air pollutants (Normalized) on Progressive Motility by window of exposure, adjusted by Age, BMI, Alcohol Consumption and Smoking Status, stratified by Geographic Area of Exposure



d. Stratified by Geographic area of exposure.

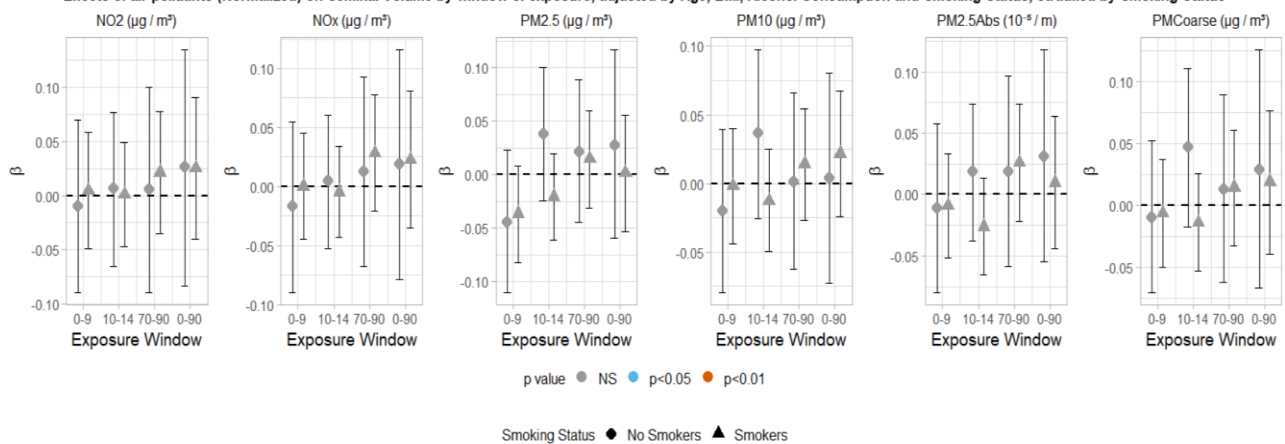
Figure 4.8 (Fig. S2 of the manuscript): Stratified effects of air pollutants on **seminal volume** by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

Effects of air pollutants (Normalized) on Seminal Volume by window of exposure, adjusted by Age, BMI, Alcohol Consumption and Smoking Status, stratified by Age Group

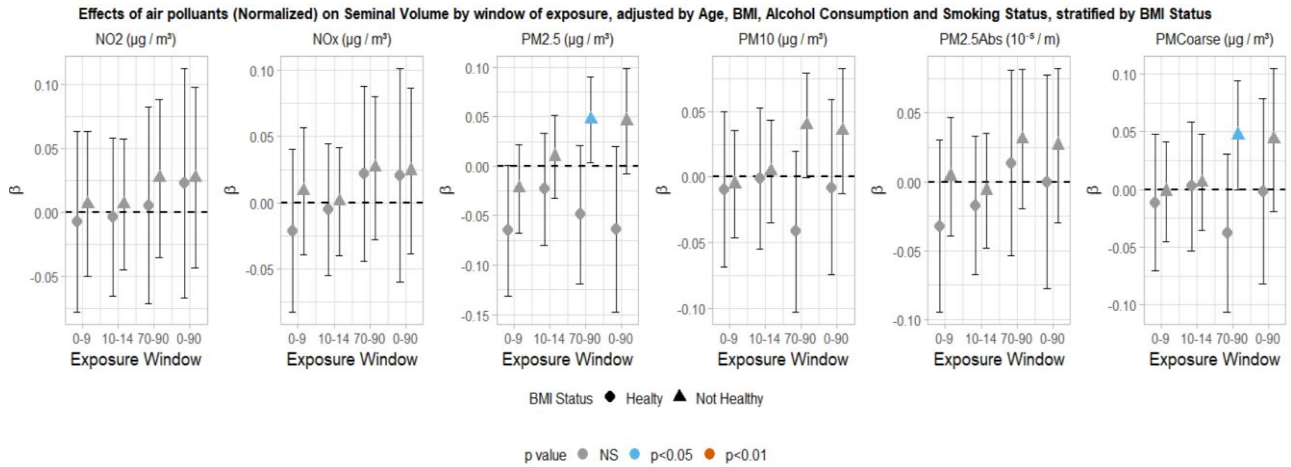


a. Stratified by Age group.

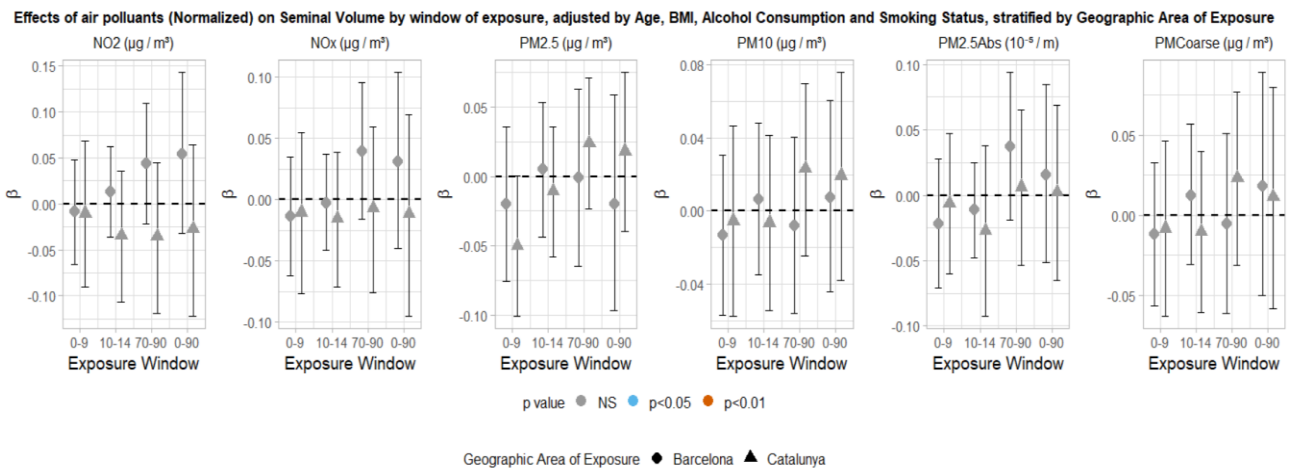
Effects of air pollutants (Normalized) on Seminal Volume by window of exposure, adjusted by Age, BMI, Alcohol Consumption and Smoking Status, stratified by Smoking Status



b. Stratified by Smoking status.

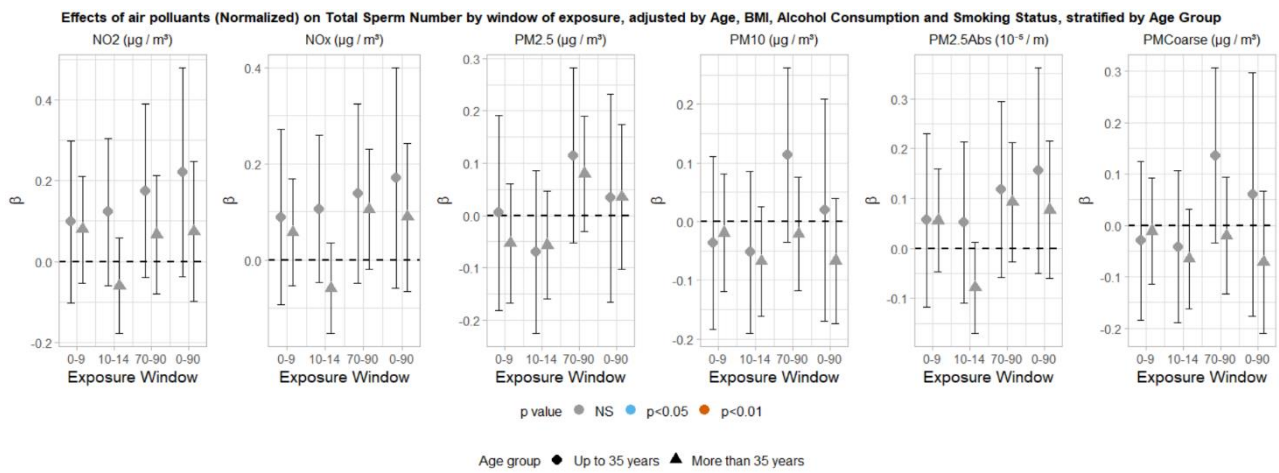


c. Stratified by BMI status.

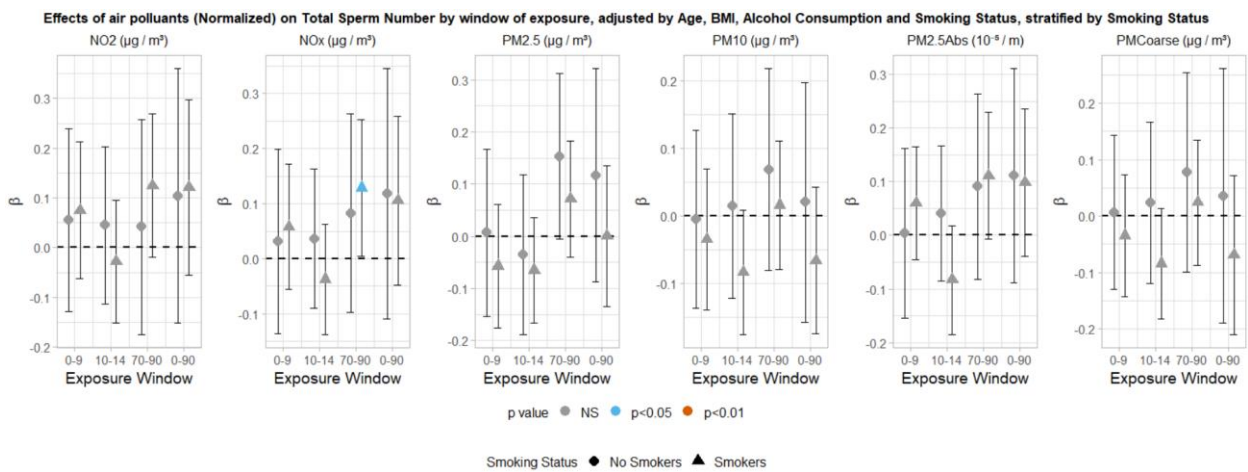


d. Stratified by Geographic area of exposure.

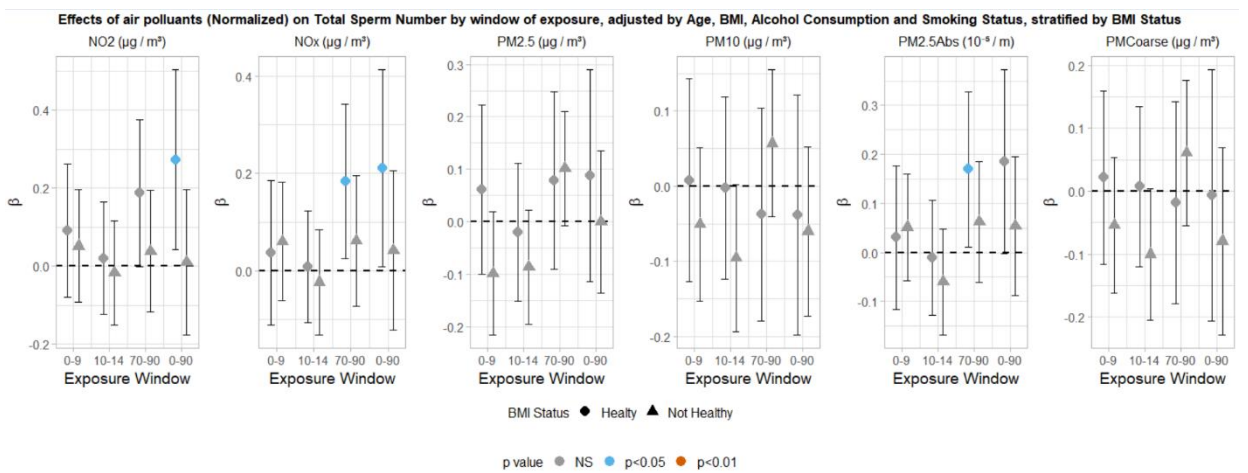
Figure 4.9 (Fig. S3 of the manuscript): Stratified effects of air pollutants on **total sperm number** by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.



a. Stratified by Age group.

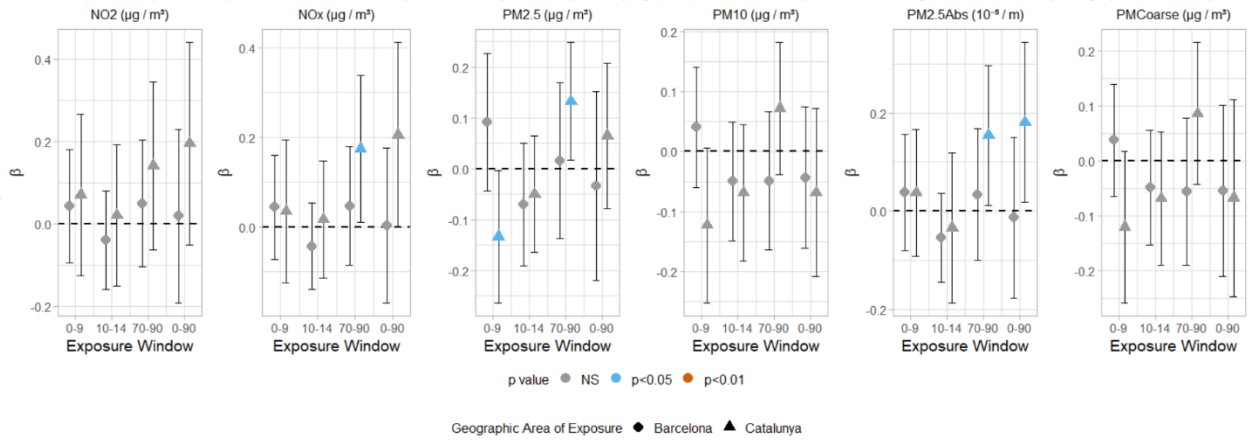


b. Stratified by Smoking status.



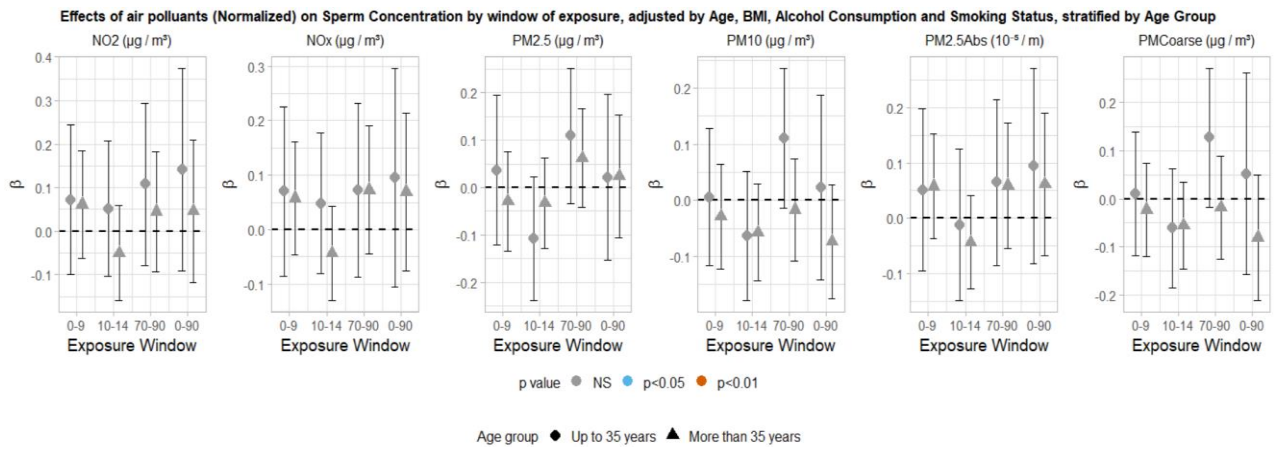
c. Stratified by BMI status.

Effects of air pollutants (Normalized) on Total Sperm Number by window of exposure, adjusted by Age, BMI, Alcohol Consumption and Smoking Status, stratified by Geographic Area of Exposure

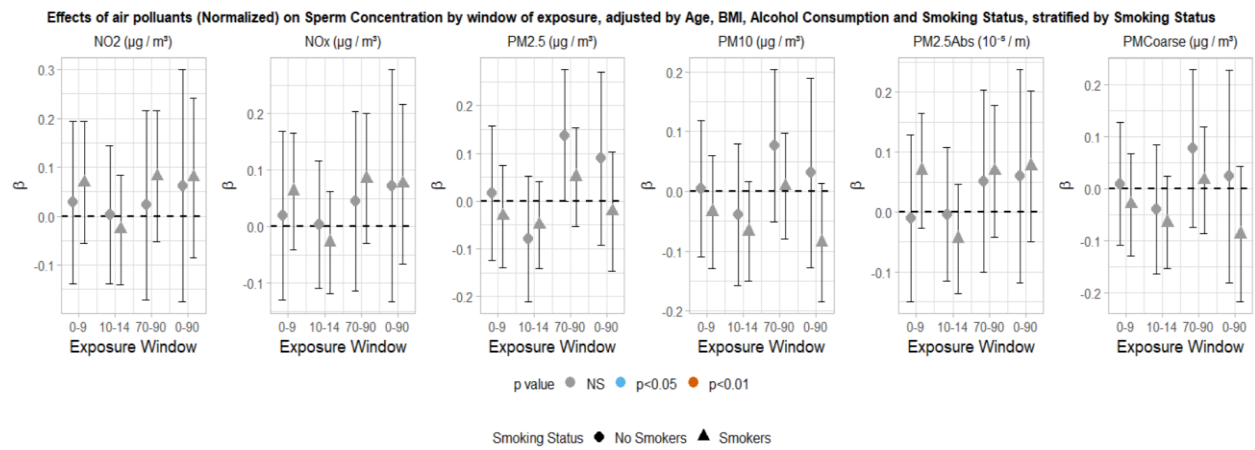


d. Stratified by Geographic area of exposure.

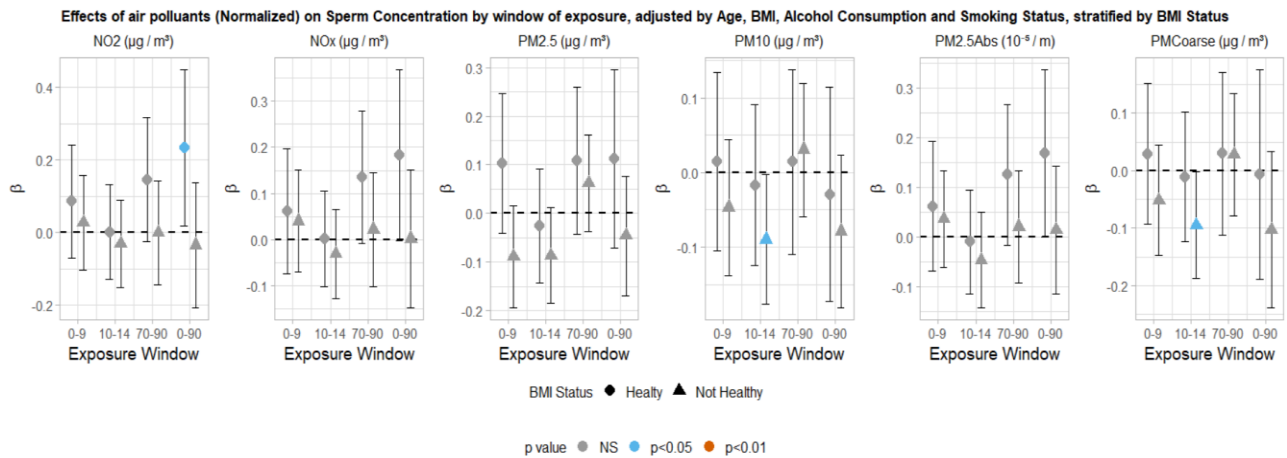
Figure 4.10 (Fig. S4 of the manuscript): Stratified effects of air pollutants on **sperm concentration** by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.



a. Stratified by Age group.

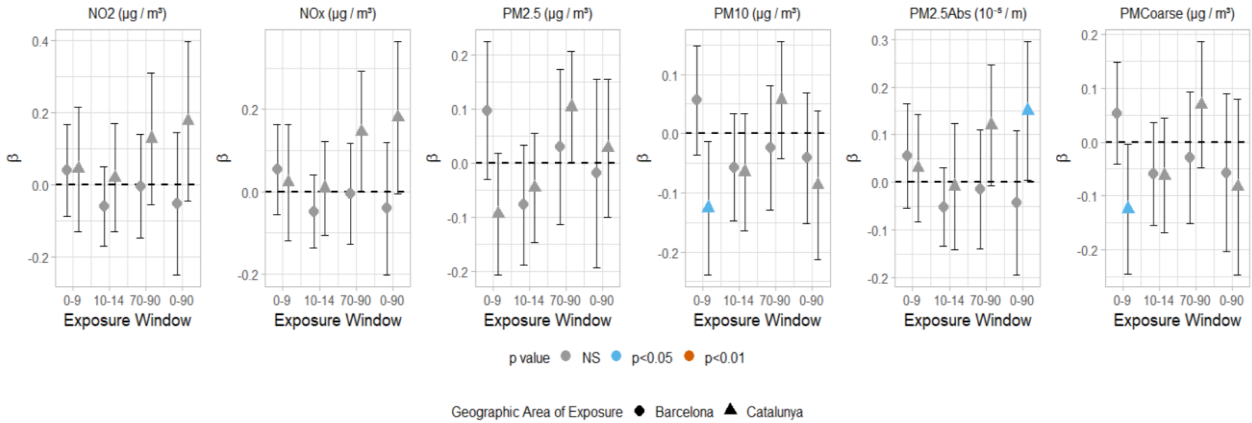


b. Stratified by Smoking status.



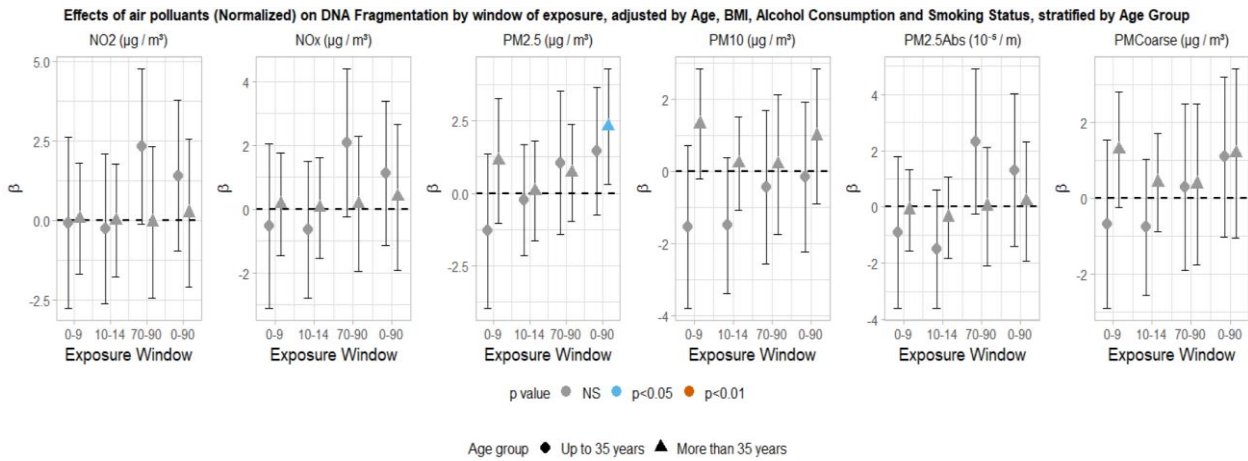
c. Stratified by BMI status.

Effects of air pollutants (Normalized) on Sperm Concentration by window of exposure, adjusted by Age, BMI, Alcohol Consumption and Smoking Status, stratified by Geographic Area of Exposure

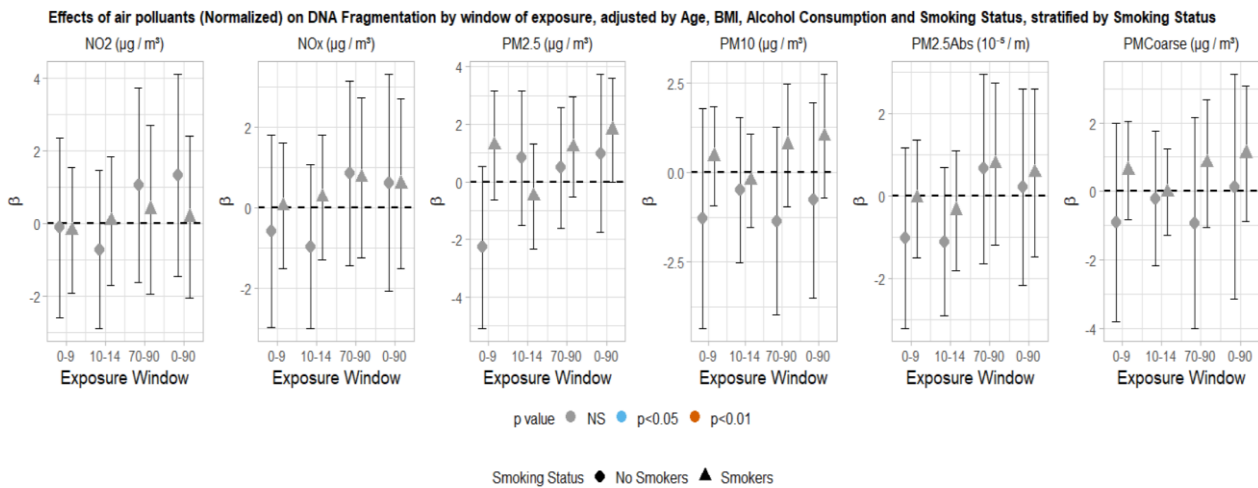


d. Stratified by Geographic area of exposure.

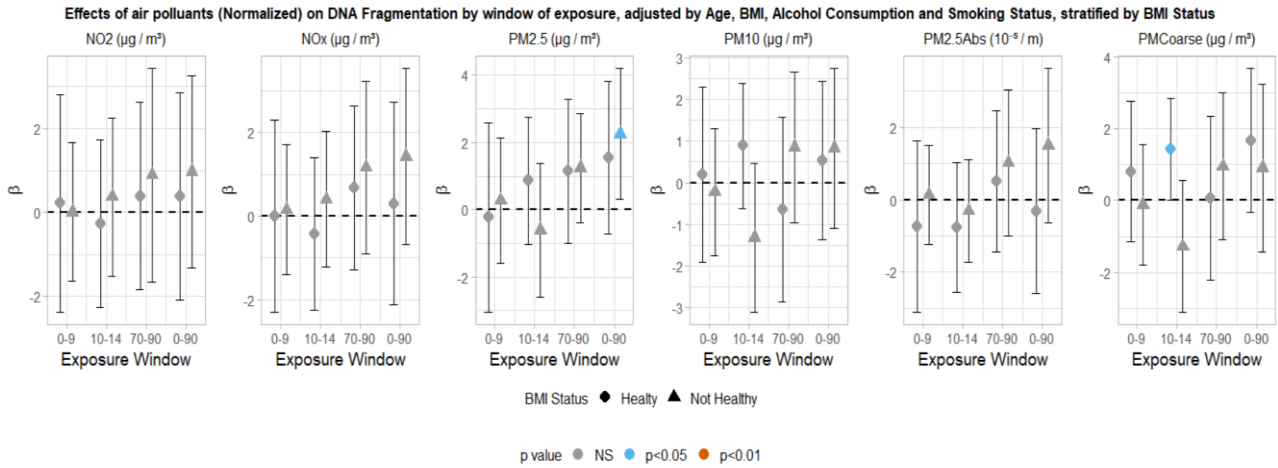
Figure 4.11 (Fig. S5 of the manuscript): Stratified effects of air pollutants on DNA fragmentation by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.



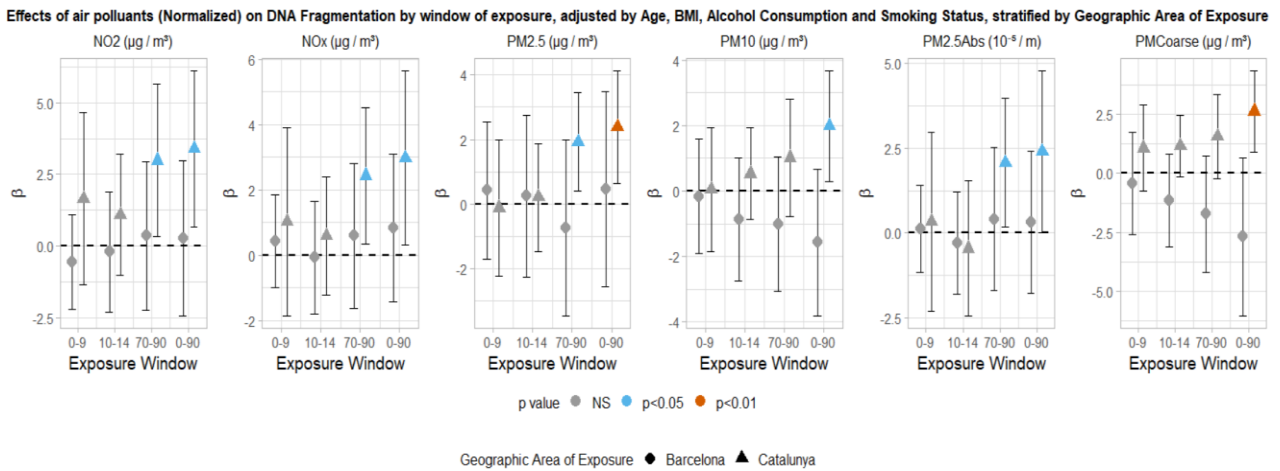
a. Stratified by Age group.



b. Stratified by Smoking status.



c. Stratified by BMI status.



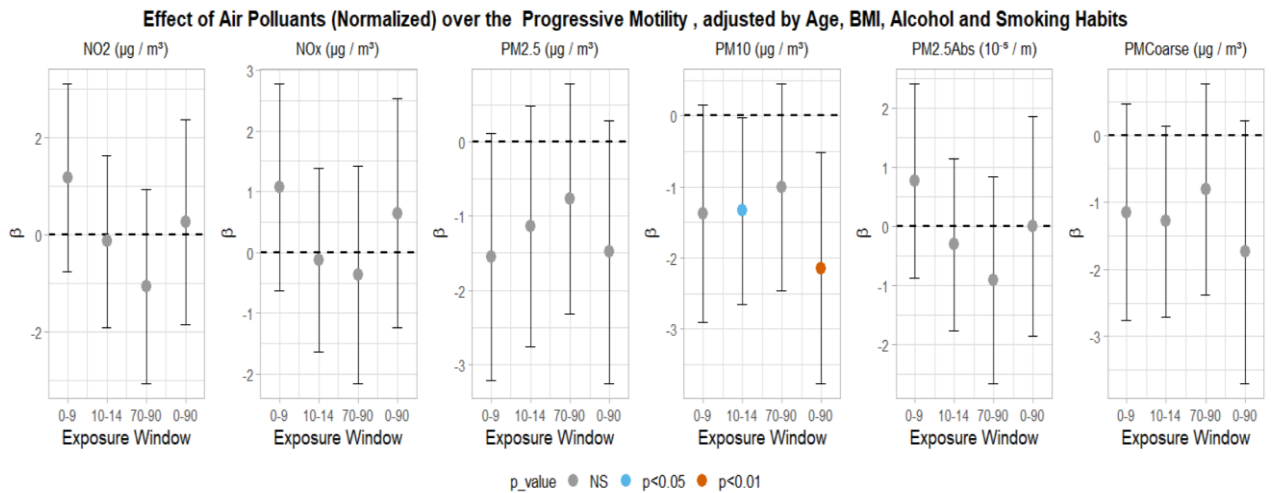
d. Stratified by Geographic area of exposure.

4.1.4.4 Sensitivity analyses

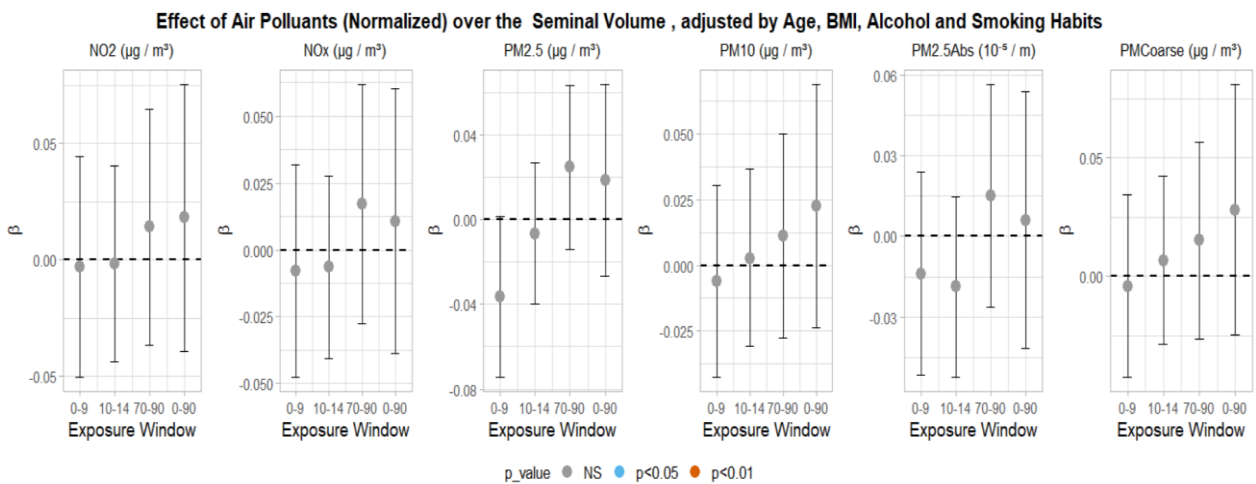
Our findings indicate that adding exposure data related with study participants' work addresses to the baseline model (Supplementary Figure S6.) did barely change the results. The association between pollutant and sperm parameters are preserved in the same way, despite that some of these became statistically insignificant.

Figure 4.12 (Fig. S6 of the manuscript): Effect of air pollutants on sperm parameters by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status.

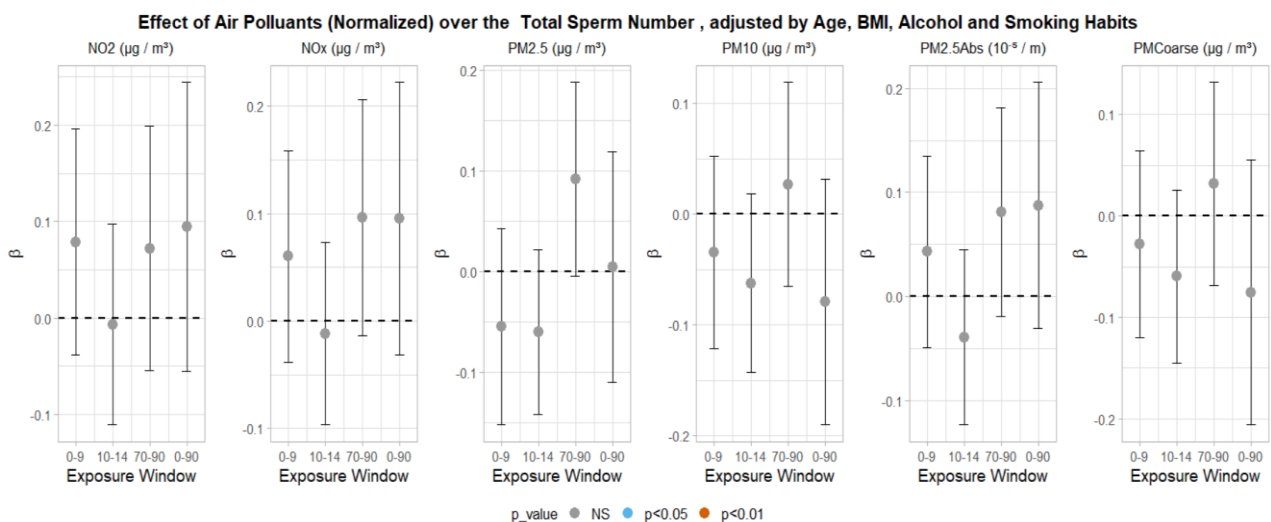
Air pollution estimated at residence and workplace addresses of the participants, weighted by the time spent in each location.



a. Effect on Progressive motility

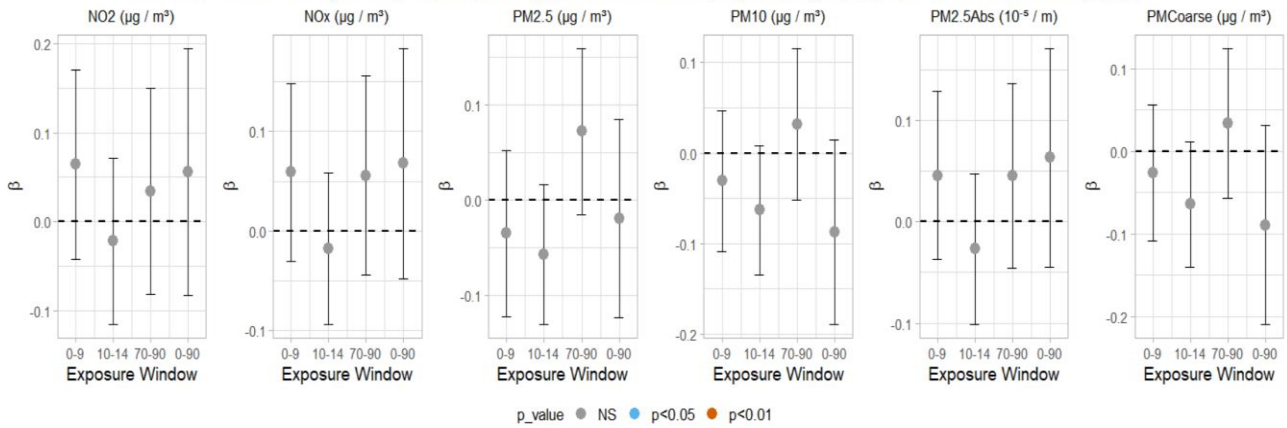


b. Effect on Seminal volume



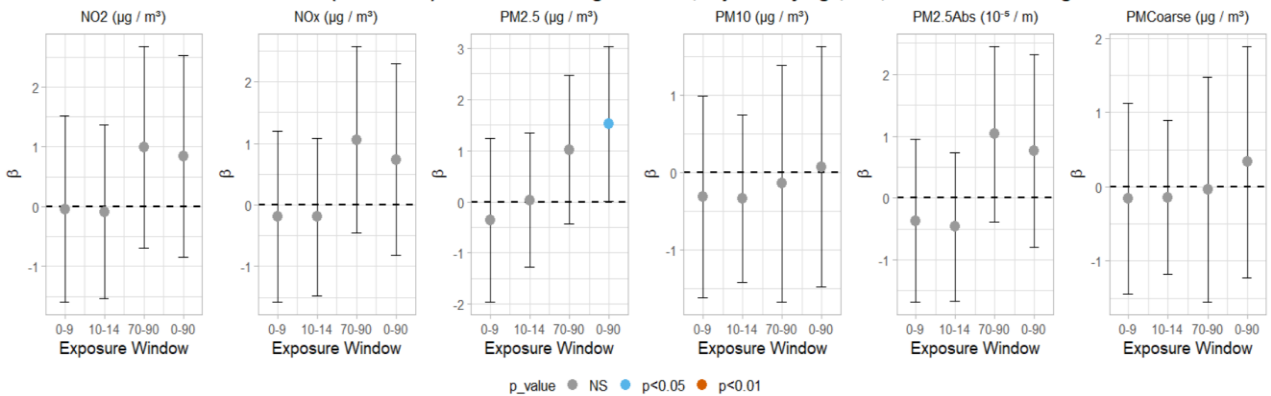
c. Effect on Total sperm number

Effect of Air Pollutants (Normalized) over the Sperm Concentration , adjusted by Age, BMI, Alcohol and Smoking Habits



d. Effect on Sperm concentration

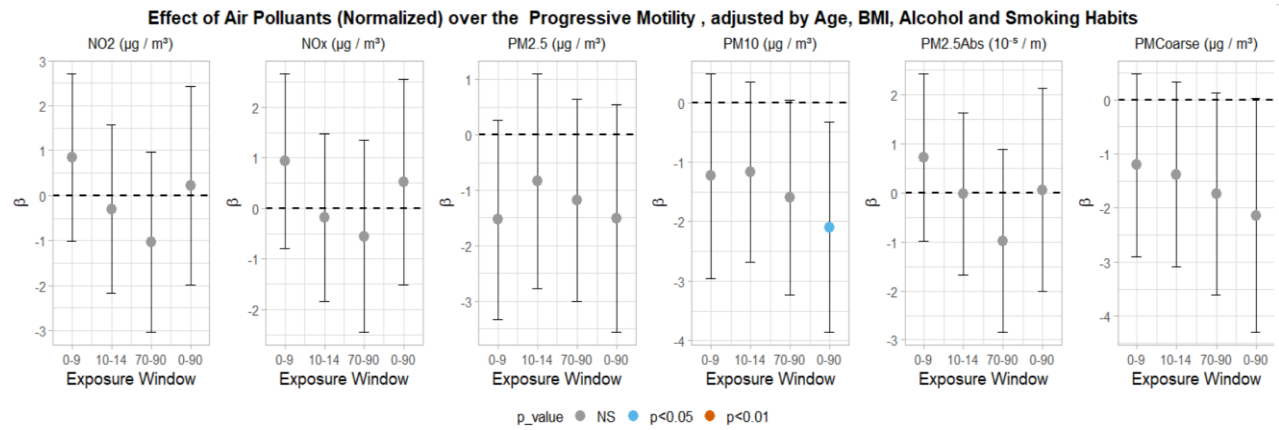
Effect of Air Pollutants (Normalized) over the DNA Fragmentation , adjusted by Age, BMI, Alcohol and Smoking Habits



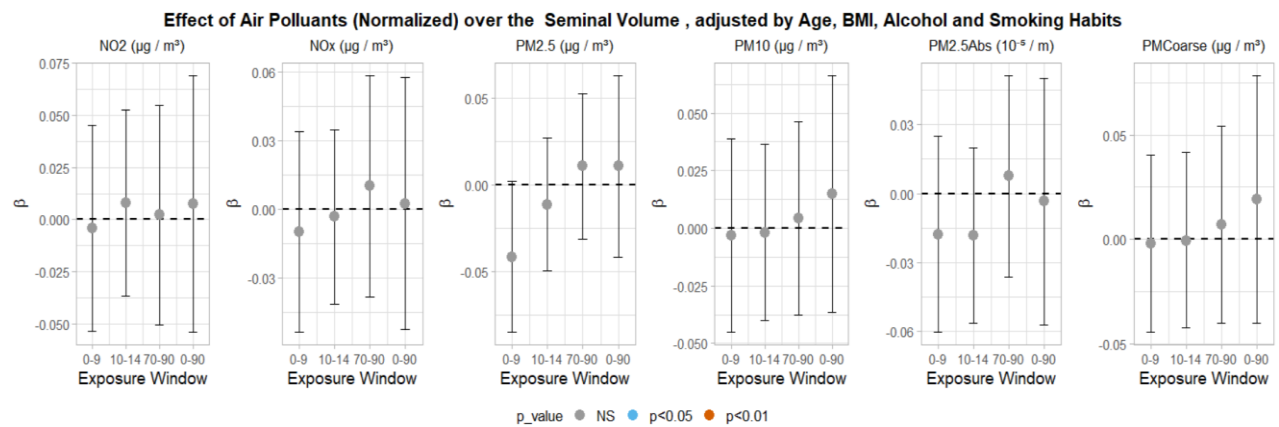
e. Effect on DNA fragmentation

A similar result was obtained in the second sensitivity analysis for which the data for participants who did not provide their workplace address were removed (Supplementary Figure S7).

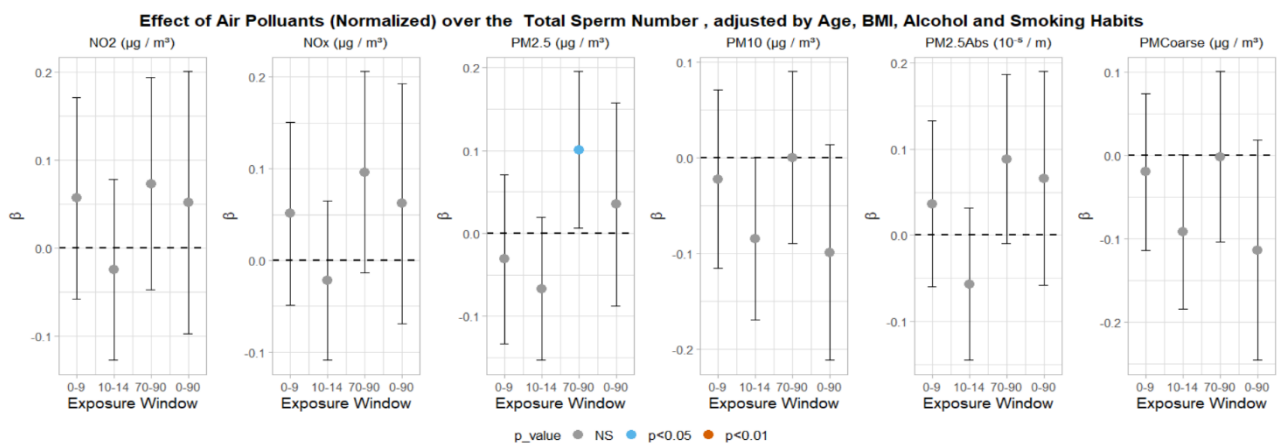
Figure 4.13 (Fig. S7 of the manuscript): Effect of air pollutants on sperm parameters by exposure window adjusted for age, BMI, alcohol consumption and smoking status. Air pollution estimated at residence and workplace addresses of the participants, excluding participants with imputed exposure in their workplace.



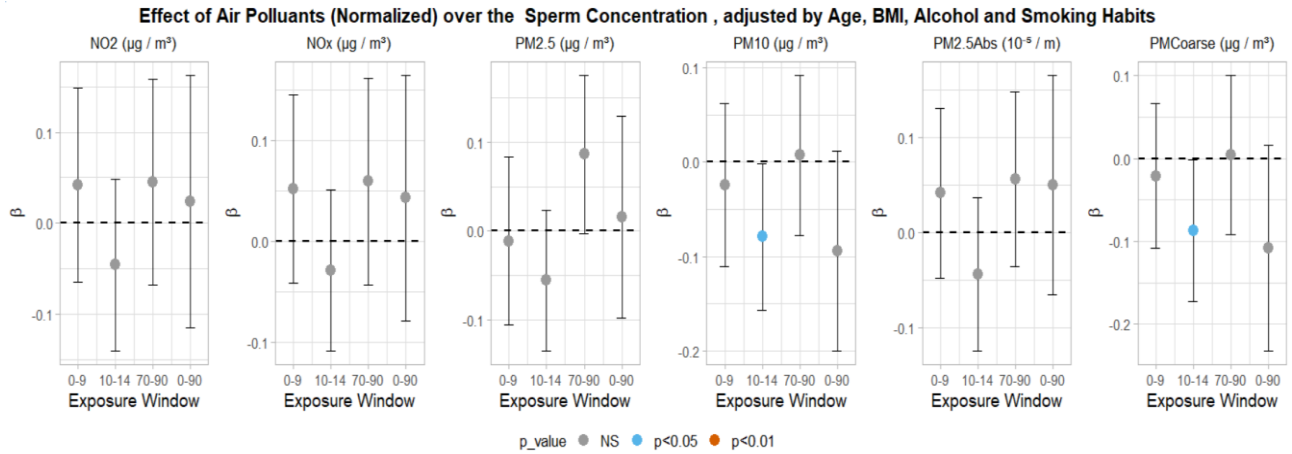
a. Effect on Progressive motility



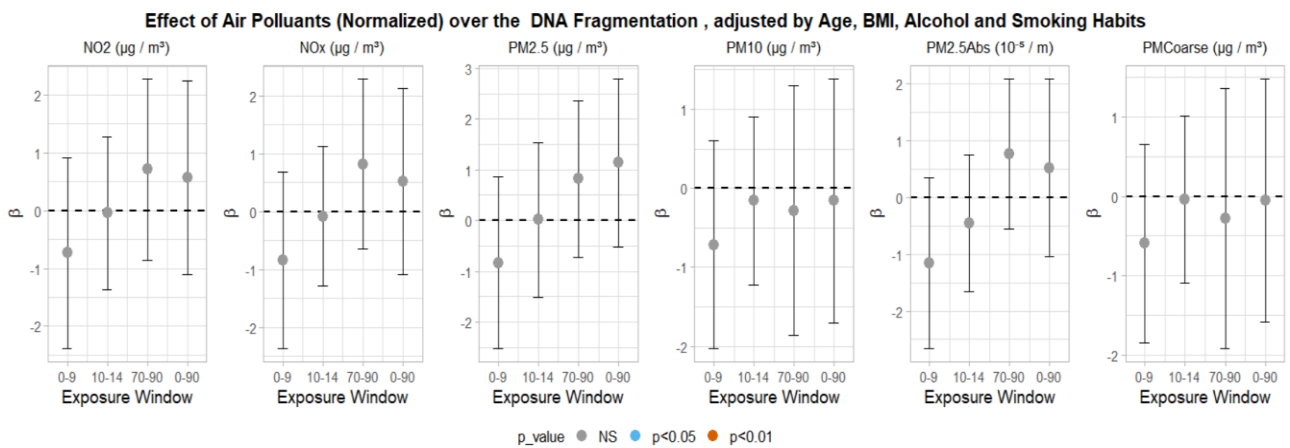
b. Effect on Seminal volume



c. Effect on Total sperm number



d. Effect on Sperm concentration



e. Effect on DNA fragmentation

The logistic regression analysis of the effects of air pollutants on dichotomized sperm quality parameters reveals a similar effect to that seen in prior analyses, as shown in Supplementary tables S3 to S7.

Air Pollutant	EXPOSURE WINDOWS											
	0-9			10-14			70-90			0-90		
	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value
NO2	0.7450	0.5253;1.0566	0.0987	1.0405	0.7669;1.4117	0.7987	1.1374	0.7845;1.6491	0.4969	0.9397	0.6268;1.4086	0.7632
NOx	0.8172	0.6073;1.0996	0.1825	1.1078	0.8681;1.4136	0.4107	1.0481	0.7542;1.4566	0.7796	0.9240	0.6375;1.3394	0.6766
PM2.5	1.0569	0.7761;1.4394	0.7252	1.1924	0.9067;1.5681	0.2081	0.9208	0.6756;1.2551	0.6017	1.0236	0.7209;1.4533	0.8964
PM10	1.1834	0.8958;1.5632	0.2359	1.2801	0.9862;1.6616	0.0635	1.0762	0.8101;1.4297	0.6122	1.2757	0.9356;1.7393	0.1237
PM2.5ABS	0.7793	0.5805;1.0462	0.0970	1.0304	0.7976;1.3310	0.8189	1.0417	0.7496;1.4476	0.8077	0.8730	0.6098;1.2498	0.4581
PMCoarse	1.1770	0.8860;1.5634	0.2607	1.2750	0.9713;1.6735	0.0801	1.1107	0.8071;1.5286	0.5192	1.3140	0.9005;1.9173	0.1566

Tableau 4.6 (Table S3 of the manuscript): Adjusted odds ratios for progressive motility associated with IQR-scaled air pollutants by exposure window. Adjusted for age BMI, smoking status, and alcohol consumption. Statistically significant associations (p-value < 0.05) are shown in bold.

Air Pollutant	EXPOSURE WINDOWS											
	0-9			10-14			70-90			0-90		
	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value
NO2	1.1241	0.6108; 2.0687	0.7070	0.9884	0.5890;1.6587	0.9648	0.7305	0.3815;1.3988	0.3435	0.7225	0.3498;1.4924	0.3798
NOx	1.1885	0.7054; 2.0025	0.5165	0.9911	0.6550;1.4999	0.9664	0.6369	0.3538;1.1465	0.1325	0.7148	0.3686;1.3863	0.3205
PM2.5	1.8142	1.0000; 3.2911	0.0500	1.0265	0.6453;1.6330	0.9119	0.7283	0.4228;1.2546	0.2532	1.0785	0.5938;1.9588	0.8039
PM10	0.9621	0.5673; 1.6316	0.8860	0.8872	0.5691;1.3832	0.5974	0.9947	0.6471;1.5291	0.9807	0.7276	0.4192;1.2628	0.2583
PM2.5ABS	1.3026	0.8001; 2.1208	0.2877	1.1850	0.7845;1.7899	0.4198	0.6211	0.3548;1.0873	0.0955	0.7685	0.4226;1.3976	0.3882
PMCoarse	0.9588	0.5603; 1.6407	0.8779	0.8739	0.5477;1.3944	0.5718	0.9975	0.6003;1.6574	0.9922	0.7153	0.3613;1.4163	0.3364

Tableau 4.7 (Table S4 of the manuscript): Adjusted odds ratios for seminal volume associated with IQR-scaled air pollutants by exposure window. Adjusted for age BMI, smoking status, and alcohol consumption. Statistically significant associations (p-value < 0.05) are shown in bold.

Air Pollutant	EXPOSURE WINDOWS											
	0-9			10-14			70-90			0-90		
	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value
NO2	0.5035	0.2531;1.0019	0.0506	0.9355	0.5457;1.6036	0.8084	0.8041	0.3985;1.6225	0.5427	0.4857	0.2032;1.1607	0.1042
NOx	0.4947	0.2559;0.9566	0.0364	1.0695	0.6980;1.6387	0.7576	0.8079	0.4256;1.5334	0.5141	0.5429	0.2443;1.2065	0.1338
PM2.5	0.7203	0.3967;1.3081	0.2812	0.8809	0.5226;1.4849	0.6342	0.5759	0.3025;1.0967	0.0931	0.6553	0.3145;1.3658	0.2593
PM10	1.0216	0.6186;1.6872	0.9334	1.2064	0.7709;1.8879	0.4115	0.9536	0.5648;1.6100	0.8589	1.1504	0.6525;2.0283	0.6282
PM2.5ABS	0.4830	0.2597;0.8983	0.0215	1.0921	0.7152;1.6677	0.6833	0.8437	0.4521;1.5746	0.5934	0.5793	0.2836;1.1835	0.1342
PMCoarse	1.0479	0.6282;1.7479	0.8578	1.2082	0.7547;1.9343	0.4308	0.9683	0.5355;1.7509	0.9152	1.1937	0.5915;2.4089	0.6211

Tableau 4.8 (Table S5 of the manuscript): Adjusted odds ratios for total sperm number associated with IQR-scaled air pollutants by exposure window. Adjusted for age BMI, smoking status, and alcohol consumption. Statistically significant associations (p-value < 0.05) are shown in bold.

Air Pollutant	EXPOSURE WINDOWS											
	0-9			10-14			70-90			0-90		
	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value
NO2	0.6955	0.3815;1.2677	0.2358	0.7665	0.4625;1.2702	0.3021	0.8422	0.4490;1.5797	0.5925	0.4795	0.2168;1.0605	0.0695
NOx	0.7366	0.4272;1.2698	0.2712	0.8901	0.5916;1.3393	0.5765	0.8381	0.4807;1.4612	0.5335	0.5186	0.2489;1.0806	0.0796
PM2.5	1.0240	0.6101;1.7188	0.9285	1.1560	0.7136;1.8725	0.5558	0.6643	0.3972;1.1111	0.1191	0.9545	0.9535;0.9556	0.625
PM10	1.4317	0.9051;2.2646	0.1251	1.1160	0.7289;1.7086	0.6136	0.9823	0.6304;1.5307	0.9372	1.3849	0.8285;2.3151	0.2141
PM2.5ABS	0.6737	0.3959;1.1465	0.1454	0.9970	0.6715;1.4803	0.9880	0.9174	0.5384;1.5632	0.7512	0.5514	0.2860;1.0631	0.0755
PMCoarse	1.4246	0.8878;2.2861	0.1424	1.1133	0.7114;1.7421	0.6386	0.9877	0.5906;1.6519	0.9625	1.4260	0.7489;2.7154	0.2801

Tableau 4.9 (Table S6 of the manuscript): Adjusted odds ratios for sperm concentration associated with IQR-scaled air pollutants by exposure window. Adjusted for age BMI, smoking status, and alcohol consumption. Statistically significant associations (p-value < 0.05) are shown in bold.

Air Pollutant	EXPOSURE WINDOWS											
	0-9			10-14			70-90			0-90		
	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value	OR	CI(95%)	p-value
NO2	0.9046	0.6567;1.2460	0.5394	0.9329	0.6861;1.2683	0.6576	1.1146	0.8045;1.5441	0.5142	1.0005	0.7192;1.3918	0.9976
NOx	0.9135	0.6853;1.2177	0.5373	0.9265	0.7065;1.2150	0.5810	1.1910	0.8860;1.6010	0.2469	1.0590	0.7726;1.4516	0.7217
PM2.5	1.0557	0.7231;1.5415	0.7788	1.1484	0.8337;1.5818	0.3970	1.4722	1.0714;2.0228	0.0171	1.5814	1.1406;2.1925	0.0060
PM10	1.0322	0.7585;1.4046	0.8401	0.8859	0.6433;1.2201	0.4583	1.2943	0.9571;1.7502	0.0939	1.2112	0.8889;1.6503	0.2247
PM2.5ABS	0.9454	0.6924;1.2909	0.7240	0.8424	0.6349;1.1178	0.2346	1.3103	0.9526;1.8022	0.0966	1.1539	0.8255;1.6128	0.4023
PMCoarse	1.1194	0.8318;1.5065	0.4566	0.9743	0.7141;1.3292	0.8694	1.4002	1.0152;1.9313	0.0402	1.3552	0.9609;1.9113	0.0831

Tableau 4.10 (Table S7 of the manuscript): Adjusted odds ratios for DNA fragmentation associated with IQR-scaled air pollutants by exposure window. Adjusted for age BMI, smoking status, and alcohol consumption. Statistically significant associations (p-value < 0.05) are shown in bold.

4.1.5 Discussion

In this study, we assessed the effects of long-term exposure to different air pollutants on several sperm quality parameters for different exposure windows, and we found some associations, namely a decrease in progressive motility associated with PM₁₀ exposure, a decrease in seminal volume and an increase in DNA fragmentation associated with PM_{2.5} exposure and an increase in total sperm number associated NO_x, PM_{2.5} and PM_{2.5}absorbance exposures. No other statistically significant associations were found.

4.1.5.1 Comparison with the literature

Our results for the progressive motility are in line with what have been reported in the literature, as it the negative association between PM₁₀ exposure and progressive motility was also reported by Sun *et al* in 2020³¹, in a study in 1061 males attending an infertility clinic in Wuhan, China, between 2011 and 2013. Similar results were obtained by Wang *et al* in 2018³², also in the city of Wuhan, while in the study conducted by Zhou *et al*³³ a significant decrease in sperm kinetic parameters associated with exposure to PM₁₀ was reported.

In this study, we employed LUR models developed in the framework of the European project ESCAPE, which are validated and repeatable models, enabling us to estimate the effects of air pollutants on sperm parameters (even at the low concentration levels observed in this work). Furthermore, by using an average of three spermograms per participant, we were able to account for intra-subject variation. This, combined with information on each participant's residential address, allowed us to calculate the average concentration of exposure to each contaminant in a more individualized and precise way and providing robustness to our observations.

We also observed a significant decrease in ejaculate volume for the exposure window between 0 - 9 days, as well as an increase in DNA fragmentation for the exposure window between 0 - 90 days, associated to PM_{2.5} exposure. Despite the fact that these effects have yet to be documented in the literature, exposure to PM_{2.5} has been associated to certain detrimental effects on sperm parameters, including a decrease in sperm concentration and forward motility concentration³⁴, progressive motility³⁵, and sperm concentration and sperm number³⁶.

Additionally, an impact in the opposite direction to that expected of air pollution exposure was observed: a statistically significant increase in total sperm number was associated with long-term exposure to NO_x, PM_{2.5} and PM_{2.5} absorbance always in the exposure window between 70 and 90 days before sampling. The retrospective observational cohort study conducted by Santi *et al* in the province of Modena – Italy³⁷ yielded similar results with a positively association with total sperm number for PM_{2.5} exposure.

No significant association was found between sperm concentration and any of the six air pollutants studied in this cohort, similar to what was described in the Nanjing Medical University Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (NMU-LIFE) study conducted with 1607 fertile men in the Yangtze River Delta Region, China between 1st, 2014 and December 31st, 2016³⁶ and by Huang *et al*⁸⁸ in a retrospective cohort of 1259 voluntary donors from the Guangdong Human Sperm Bank in China between May 2018 and March 2019.

Although some of our findings are consistent with those of previous studies, there are still some inconsistencies that may be due in part, to variations in air pollution levels based on geographic location, the quality and frequency of pollutant measurements, or the composition of suspended particulate matter. The study by Wu *et al* in 1759 men in consultation at an assisted reproduction center in Wuhan, China, between 2013 and 2015 suggests that exposure to PM_{2.5} and PM₁₀ levels below 100 and 150 g/m³ respectively, may not be associated with a decrease in sperm quality, particularly sperm concentration and total sperm number³⁹.

4.1.5.2 Association between sperm quality parameters and exposure to air pollutants during different exposure windows

In this study, several patterns of association between air pollution exposure and the quality of sperm parameters in key stages of spermatogenesis were identified, however not all were statistically significant.

During the early stages of spermatogenesis (70 - 90 days before sampling), a statistically non-significant (since the 95% CI contains zero) increase in DNA fragmentation was observed in association with NO_x; NO₂; PM_{2.5}; PM_{2.5}absorbance; and PM_{coarse} exposures. This finding contrasts with the significant increase in total sperm number observed for the same exposure window and associated to NO_x; PM_{2.5}; and PM_{2.5}absorbance exposure.

10 - 14 days preceding semen sampling is the critical period for sperm motility development. Despite the fact that it is non-statistically significant, a relationship between PM₁₀; PM_{2.5}; and PM_{coarse} exposure and a detriment to progressive motility was observed, which is similar to the statistically significant findings made by Sun *et al* in 2020³¹. There is also a non-significant decrease in sperm concentration associated with PM_{2.5} and PM₁₀ exposure during this exposure window, similar to that reported by Huang *et al* and by Guan *et al* in two independent studies published in 2020.^{38, 40}

The seminal volume decreases significantly throughout the epididymal storage phase (0-9 days before sampling) associated with PM_{2.5} exposure. Finally, in the exposure window corresponding to the complete spermatogenesis process (0 - 90 days before sampling), there was a significant decrease in progressive motility associated with PM₁₀ exposure and a significant increase in DNA fragmentation associated with PM_{2.5} exposure.

These findings suggest that there is a susceptibility to pollutant exposure during specific key phases of spermatogenesis, which has a deleterious impact on the quality of sperm parameters. In our experience, the potentially most vulnerable exposure windows corresponded to the early stages of spermatogenesis and the development of sperm

Although there are studies that have explored the effects of air pollution on sperm parameters for different exposure windows^{36, 41, 42, 43}; these are still limited in number and the results obtained remain inconsistent. Therefore, it is necessary to continue with this line of research, including the analysis of alternative windows of exposure other than those currently investigated, with the aim of identifying which are the critical periods of susceptibility during spermatogenesis and their impact on sperm quality parameters and male fertility.

4.1.5.3 Possible mechanisms.

The biological mechanisms that contribute to the deterioration of semen quality associated with exposure to air pollutants have been extensively explored.

Particulate matter can accumulate in the lungs, penetrate the pulmonary barrier and enter the bloodstream⁴⁴. Additionally, the PM can induce reactive oxygen species (ROS) generation.⁴⁵ An imbalance between the cell's antioxidant defense systems and the production of ROS leads to cellular oxidative stress.

At the testicular level, ROS can potentially attack the sperm plasma membrane, induces mitochondrial dysfunction, apoptosis, and consequently DNA fragmentation⁴⁶.

Certain immunological factors could be linked to decreased sperm motility⁴⁷. long-term exposure to particulate matter can induce an immune response leading to the secretion of proinflammatory cytokines⁴⁸. In a study carried out in 82 male individuals (27 healthy controls and 55 infertile patients) a cytokinetic profile marked by high levels of IL-1 β was found; IL-10; IL-18; TGF- β 1; IFN- γ and IL-1 β , IFN- γ in blood and TGF- β 1 in seminal plasma in patients with idiopathic infertility compared to the levels presented in the healthy population⁴⁹.

A mechanism based on a hormonal regulation system as a compensatory response to exposure to air pollutants could be the explanation for the positive relationship between NO_x, PM_{2.5} and PM_{2.5} absorbance and total sperm number reported in this study. This hypothesis had already been expressed previously by Tomei *et al*⁵⁰, who observed an increase in follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), both of which promote spermatogenesis, in working men exposed to urban chemical stressors; however, since the biological mechanism behind this association is still unclear, these findings should be interpreted with discretion.

4.1.5.4 Strength and limitations

Our study has several strengths. Each participant provided an average of 3 spermograms. These repeated measurements allow to control the within-subject variability and provide reliable findings. Exposure to pollutants was assessed using validated LUR models developed as part of the European project ESCAPE: Effects of Air Pollution, which are validated and reproducible models allowing to have Individual exposure measurements. With information on the participants' addresses of residence and workplace, we were able to calculate the average concentration of each participant's average exposure to each pollutant in a more individualized and precise way.

Sperm parameters were measured in the same laboratory. Which reduces the risk of a possible dispersion of the results of the spermograms linked to the use of several analysis laboratories.

This study also presents some limitations: there may be a selection bias in the study population. Since the participants are from couples who attended an assisted reproduction

clinic, the ability to detect a detrimental impact related to air pollution exposure may be compromised. Our study lacked data on the subjects' time abstinence, which might have influenced the spermograms results, however, all subjects were instructed to abstain sexual activity 3 to 5 days prior sampling, and, since all of them were men from couples who attended an assisted reproduction clinic, it is probable that they strictly adhered to the instructions.

Although statistically significant differences were observed in alcohol consumption and smoking habits between study participants and excluded subjects, it is important to note that half of the excluded subjects did not provide the recruitment questionnaire, so the lack of data in this specific population could justify the difference observed between both populations.

Furthermore, as a large number of statistical tests have been performed using different exposure windows, there is a possibility that some of the significant results are due to chance. However, it should be noted that these results are consistent throughout the different windows of exposure even if not always significant and coincide with what is reported in the literature. Finally, the sample size may be insufficient to detect some relationship between air contaminants and sperm quality even if our total number of participants was slightly above the calculated number and the average number of repeated samples just below.

4.1.6 Conclusions

Our results suggest that certain air pollutants may have a deleterious impact on sperm quality, in particular on progressive motility related with long term PM_{10} exposure and on seminal volume and DNA fragmentation associated with long term $PM_{2.5}$ exposure.

Our findings on the windows of exposure associated with critical phases of spermatogenesis are consistent with previously published epidemiological research, even though that certain findings were not statistically significant.

Considering the ubiquity of exposure to air pollution, the possibly detrimental effects on sperm quality can lead to a significant rise in the number of couples experiencing reproductive issues. This study contributes to the existing range of evidence that supports the development of air pollution control strategies that might improve male reproductive health.

4.1.7 References

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
2. World Health Organization. Infertility. World Health Organization 2019. https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1 Accessed March 26, 2022.
3. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:37. doi:10.1186/s12958-015-0032-1
4. Nelson CM, Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril.* 1974;25(6):503-507. doi:10.1016/s0015-0282(16)40454-1
5. Mínguez-Alarcón L, Williams PL, Chiu YH, et al. Secular trends in semen parameters among men attending a fertility center between 2000 and 2017: Identifying potential predictors. *Environ Int.* 2018;121(Pt 2):1297-1303. doi:10.1016/j.envint.2018.10.052
6. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305(6854):609-613. doi:10.1136/bmj.305.6854.609
7. Berling S, Wölner-Hanssen P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod.* 1997;12(5):1002-1005. doi:10.1093/humrep/12.5.1002
8. Fisch H. Declining worldwide sperm counts: disproving a myth. *Urol Clin North Am.* 2008;35(2):137-vii. doi:10.1016/j.ucl.2008.01.001
9. Vahidi S, Moein MR, Yazdinejad F, Ghasemi-Esmailabad S, Narimani N. Iranian temporal changes in semen quality during the past 22 years: A report from an infertility center. *Int J Reprod Biomed.* 2020;18(12):1059-1064. doi:10.18502/ijrm.v18i12.8027
10. Vilcassim MJR, Thurston GD, Chen LC, et al. Exposure to air pollution is associated with adverse cardiopulmonary health effects in international travellers. *J Travel Med.* 2019;26(5):taz032. doi:10.1093/jtm/taz032
11. Mehta RH, T. C AK. Declining semen quality in Bangaloreans: A preliminary report. *Current Science.* 1997;72(9):621-622. <https://www.jstor.org/stable/24099666?seq=1> Accessed September 1, 2021.

12. Wu L, Jin L, Shi T, et al. Association between ambient particulate matter exposure and semen quality in Wuhan, China. *Environ Int.* 2017;98:219-228. doi:10.1016/j.envint.2016.11.01313.
13. Liu J, Dai Y, Li Y, et al. A longitudinal study of semen quality among Chinese sperm donor candidates during the past 11 years. *Scientific Reports.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-67707-x
14. Sharqawi M, Hantisteanu S, Bilgory A, et al. The Impact of Lifestyle on Sperm Function, Telomere Length, and IVF Outcomes. *American Journal of Men's Health.* 2022;16(5):155798832211199. doi:10.1177/15579883221119931
15. Huang G, Zhang Q, Wu H, et al. Sperm quality and ambient air pollution exposure: A retrospective, cohort study in a Southern province of China. *Environ Res.* 2020;188:109756. doi:10.1016/j.envres.2020.109756
16. Hoek G, Beelen R, de Hoogh K, et al. A review of land-use regression models to assess spatial variation of outdoor air pollution. *Atmospheric Environment.* 2008;42(33):7561-7578. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.05.057
17. Beelen R, Hoek G, Vienneau D, et al. Development of NO₂ and NO_x land use regression models for estimating air pollution exposure in 36 study areas in Europe – The ESCAPE project. *Atmospheric Environment.* 2013;72:10-23. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.02.037
18. Cyrus J, Eeftens M, Heinrich J, et al. Variation of NO₂ and NO_x concentrations between and within 36 European study areas: Results from the ESCAPE study. *Atmospheric Environment.* 2012;62:374-390. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.080
19. Eeftens M, Beelen R, de Hoogh K, et al. Development of Land Use Regression models for PM_{2.5}, PM_{2.5} absorbance, PM₁₀ and PM_{coarse} in 20 European study areas; results of the ESCAPE project. *Environ Sci Technol.* 2012;46(20):11195-11205. doi:10.1021/es301948k
20. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2015;19:22-33. doi:10.1016/j.arr.2014.10.007
21. Ma Y, Zhang J, Cai G, et al. Inverse association between ambient particulate matter and semen quality in Central China: Evidence from a prospective cohort study of 15,112 participants. *Science of The Total Environment.* 2022;833:155252. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155252'

22. Yu X, Wang Q, Wei J, et al. Impacts of traffic-related particulate matter pollution on semen quality: A retrospective cohort study relying on the random forest model in a megacity of South China. *Science of The Total Environment*. 2022;851:158387. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158387
23. Wu H, Yu X, Wang Q, et al. Beyond the mean: Quantile regression to differentiate the distributional effects of ambient PM_{2.5} constituents on sperm quality among men. *Chemosphere*. 2021;285:131496. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131496
24. Wang X, Tian X, Ye B, et al. Gaseous pollutant exposure affects semen quality in central China: a cross-sectional study. *Andrology*. 2019;8(1):117-124. doi:10.1111/andr.12655
25. Huang LP, Lee CC, Hsu PC, Shih TS. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertility and Sterility*.
26. Mularoni V, Esposito V, Di Persio S, et al. Age-related changes in human Leydig cell status. *Human Reproduction*. 2020;35(12):2663-2676. doi:10.1093/humrep/deaa271
27. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. 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*. 2016;70(4):635-645. doi:10.1016/j.eururo.2016.04.010.
28. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):253-263. doi:10.4161/spmg.21362.
29. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2222-2225. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.011
30. Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, Glander HJ. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertility and Sterility*. 2010;94(7):2898-2901. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.047
31. Sun S, Zhao J, Cao W, Lu W, Zheng T, Zeng Q. Identifying critical exposure windows for ambient air pollution and semen quality in Chinese men. *Environ Res*. 2020;189:109894. doi:10.1016/j.envres.2020.109894.

32. Wang XC, Tian XJ, Ye B, Ma L, Zhang Y, Yang J. The effect of ambient PM10 on sperm quality in Wuhan. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi (Chinese journal of preventive medicine)*. 2018;52(1). doi:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2018.01.014.
33. Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut*. 2014;187:145-152. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.030
34. Qiu Y, Yang T, Seyler BC, et al. Ambient air pollution and male fecundity: A retrospective analysis of longitudinal data from a Chinese human sperm bank (2013-2018). *Environ Res*. 2020;186:109528. doi:10.1016/j.envres.2020.109528
35. Santi D, Magnani E, Michelangeli M, et al. Seasonal variation of semen parameters correlates with environmental temperature and air pollution: A big data analysis over 6 years. *Environmental Pollution*. 2018;235:806-813. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.021
36. Wu W, Chen Y, Cheng Y, et al. Association between ambient particulate matter exposure and semen quality in fertile men. *Environ Health*. 2022;21(1):16. Published 2022 Jan 16. doi:10.1186/s12940-022-00831-5
37. Santi D, Vezzani S, Granata AR, et al. Sperm quality and environment: A retrospective, cohort study in a Northern province of Italy. *Environ Res*. 2016;150:144-153. doi:10.1016/j.envres.2016.05.053
38. Huang G, Zhang Q, Wu H, et al. Sperm quality and ambient air pollution exposure: A retrospective, cohort study in a Southern province of China. *Environ Res*. 2020;188:109756. doi:10.1016/j.envres.2020.109756
39. Wu L, Jin L, Shi T, et al. Association between ambient particulate matter exposure and semen quality in Wuhan, China. *Environ Int*. 2017;98:219-228. doi:10.1016/j.envint.2016.11.013
40. Guan Q, Chen S, Wang B, et al. Effects of particulate matter exposure on semen quality: A retrospective cohort study. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;193:110319. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110319
41. Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect*. 2006;114(3):360-365. doi:10.1289/ehp.8232
42. Chen Q, Jiang H, Zhang HT, et al. Ambient ozone pollution is associated with decreased semen quality: longitudinal analysis of 8945 semen samples from 2015

- to 2018 and during pollution-control period in Beijing, China. *Asian Journal of Andrology*. 2019;21(5):501. doi:10.4103/aja.aja_116_18
43. Yang T, Deng L, Sun B, et al. Semen quality and windows of susceptibility: A case study during COVID-19 outbreak in China. *Environ Res*. 2021;197:111085. doi:10.1016/j.envres.2021.111085
 44. Schraufnagel DE. The health effects of ultrafine particles. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52(3):311-317. doi:10.1038/s12276-020-0403-3
 45. Li XY, Hao L, Liu YH, Chen CY, Pai VJ, Kang JX. Protection against fine particle-induced pulmonary and systemic inflammation by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(3):577-584. doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.018
 46. Asadi A, Ghahremani R, Abdolmaleki A, Rajaei F. Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. *Int J Reprod Biomed*. 2021;19(6):493-504. Published 2021 Jul 27. doi:10.18502/ijrm.v19i6.9371
 47. Ficarra V, Porcaro AB, Righetti R, et al. Antegrade scrotal sclerotherapy in the treatment of varicocele: a prospective study. *BJU Int*. 2002;89(3):264-268. doi:10.1046/j.1464-4096.2001.0.
 48. Glencross DA, Ho TR, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:56-68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179
 49. Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, Kril I, Kurpysz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Central European Journal of Immunology*. 2015;3:337-344. doi:10.5114/ceji.2015.54596
 50. Tomei G, Tomao E, Ciarrocca M, et al. Follicle-stimulating hormone levels in male workers exposed to urban chemical, physical, and psychosocial stressors. *Toxicol Ind Health*. 2009;25(6):395-402. doi:10.1177/0748233709106466

4.2. Effet de la température ambiante sur la qualité spermatique : une étude sur des hommes jeunes et en bonne santé

4.2.1 Résumé en français

Contexte : Les expositions environnementales pourraient être associées à un déclin de la qualité spermatique ; cependant, peu d'études ont évalué les effets de l'exposition à la température ambiante au niveau individuel sur les paramètres du sperme. Le but de cette étude est d'évaluer l'association entre l'exposition à la température ambiante et la qualité spermatique chez des hommes sains.

Matériel et méthodes : Au total, 172 potentiels donneurs de sperme ont été inclus, contribuant avec 597 échantillons. Les paramètres spermatiques inclus dans cette étude étaient le volume séminal, la concentration de spermatozoïdes et la motilité progressive. Les expositions à la température ambiante ont été évaluées pour différentes fenêtres temporelles (0 - 9 jours, 10 - 14 jours, 70 - 90 jours et toute la période 0 - 90 jours) avant l'échantillonnage. Les estimations, dérivées de modèles mixtes, ont été ajustées en fonction de l'âge, du tabagisme et du SES

Résultats : L'âge moyen était de 25 ans (SD : 4.0) et chaque donneur a contribué en moyenne avec 3.4 échantillons (min 1 - max 21). Une augmentation d'un degré Celsius de la température ambiante était associée à une diminution significative de la concentration de spermatozoïdes pour la fenêtre d'exposition de 10 à 14 jours (β : -0.015 ; IC à 95 % : -0.03, -0.004, p-value 0.008) et celle de 0 à 90 jours d'exposition (β : -0.024 ; IC 95 % : -0.04 ; -0.007 ; p-value 0.006) ; et avec une motilité progressive significativement plus faible pour la fenêtre d'exposition de 10 - 14 jours (β : -0.44 ; 95 % IC : -0.80 ; -0.09 ; p-value 0.001) et celle de 0 - 90 jours d'exposition (β : -0.66 ; IC 95 % : -1.17 ; -0.15 ; p-value 0.01).

Conclusions : Une association significative a été retrouvée entre l'augmentation de la température ambiante et une concentration de spermatozoïdes et une motilité progressive plus faibles, cette dernière étant un puissant prédicteur de la fertilité masculine.

4.2.2 Introduction

For over 35 years, the development of assisted reproductive technologies has progressed and has enabled millions of couples to become parents. The need for such techniques is due to a notable decline in fertility rates in the last two decades^{1,2,3}. Male factor can be responsible for up to 50% of fertility problems⁴. Although social aspects have contributed significantly to this global decline in fertility, mainly increase age at first maternity-paternity, some authors suggest that they occurred synchronously with the deterioration of reproductive health caused by environmental factors⁵.

Environmental contaminants^{6,7,8,9,10}, as well as the change in lifestyles^{11,8,12,13,14,15} is considered important factors contributing to the decline in semen quality. An environmental factor that could be associated with a decline in semen quality is ambient temperature. In fact, the acquisition of sperm function involves both the morphological differentiation of male germ cells during spermatogenesis and their functional transformation during sperm maturation and it has been shown to be a temperature dependent process¹⁶. Testes are particularly sensitive to heat stress because the scrotal temperature in mammals should be about 2°C to 8°C below the body temperature to achieve a normal spermatogenesis. Hence, an acute or chronic rise in testicular temperature could produce an impairment of spermatogenesis with a decrease in spermatozoa concentration, viability, morphological normalcy, motility, acrosome integrity, and chromatin stability, leading to periods of subfertility, temporary or permanent sterility¹⁷.

The aim of this study was to evaluate the effects of ambient temperature on healthy individuals under 30 years of age and who voluntarily go to an assisted reproduction center as candidates to be semen donors.

4.2.3 Material and Methods

4.2.3.1 Study design and subject recruitment

In this retrospective cohort, we included 172 young men, candidates to be sperm donors, seen between 2007 and 2012 in a private reproductive clinic. Two independent authors (KL and MG) revised their medical history and collected their socio-demographic characteristics, medication, allergies, surgeries, lifestyle habits (tobacco, alcohol, drugs) and family medical history. We also collected the data from all their sperm analyses.

4.2.3.2 Semen collection and analyses

Semen samples were collected on-site by masturbation into sterile containers, and the abstinence interval recorded (an interval of 2–5 days having been requested). The semen was allowed to liquefy at 37°C temperature for 20 min and processed within 45 minutes of collection. Semen volume, sperm concentration and percentage of progressive motility were retrieved. Sample volume was measured in a 15 mL graduated centrifuge tube and an aliquot removed to determine sperm concentration and progressive motility using a computer-aided sperm analysis (CASA) and mounted on Makler camera in heated (37°C) microscope stage.

4.2.3.3 Temperature data determination

For each sperm analysis, we calculated the daily average of the available meteorological stations within the air quality zones (ZQA) based on the participants' residence address collected at their first clinic visit (Barcelonès I Vallès-Llobregat), as well as from the nearest station for participants residing outside of that region. A ZQA is an area defined to be representative of the air quality throughout the entire area, thus it might be homogenous in terms of orography, climatology, population density and the volume of industrial and traffic emissions. Table 1 shows the average annual temperatures at the meteorological stations used for the measurements in this study in the cities of Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Sabadell and Vacarisses.

City	Temperature (°C)	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Barcelona	Minimum	4.0	4.3	6.5	9.1	12.7	17.0	19.8	20.2	17.5	14.2	8.5	5.0
	Mean	7.9	8.5	10.9	13.5	17.0	21.3	23.8	23.9	20.9	17.4	12.1	8.6
	Maximum	12.3	12.9	15.5	17.6	20.9	25.3	27.6	27.6	24.2	20.7	15.9	12.9
Cerdanyola del Vallès	Minimum	3.2	3.6	5.8	8.5	12.1	16.4	19.3	19.5	16.9	13.5	7.6	4.2
	Mean	7.2	7.9	10.5	13.0	16.6	21.0	23.5	23.5	20.3	16.8	11.4	7.9
	Maximum	11.9	12.6	15.4	17.4	20.9	25.3	27.6	27.5	24.0	20.4	15.5	12.4
Sabadell	Minimum	3.2	3.6	5.8	8.5	12.1	16.4	19.3	19.5	16.9	13.5	7.6	4.2
	Mean	7.2	7.9	10.5	13.0	16.6	21.0	23.5	23.5	20.3	16.8	11.4	7.9
	Maximum	11.9	12.6	15.4	17.4	20.9	25.3	27.6	27.5	24.0	20.4	15.5	12.4
Vacarisses	Minimum	1.3	1.9	4.4	7.2	10.9	15.2	18	18.1	15.1	11.6	5.5	2.0
	Mean	5.5	6.5	9.6	12.3	16.1	20.6	23.0	22.7	19.1	15.5	9.6	6.0
	Maximum	10.8	11.9	15.2	17.5	21.2	25.9	28.1	27.7	23.7	19.9	14.4	11.2

Tableau 4.11 (Table 1 of the manuscript): Average annual temperatures at the meteorological stations used for the measurements in this study. Source Servei Meteorològic de Catalunya.

The meteorological stations are part of the Network of Automatic Meteorological Stations (XEMA by its acronym in catalan) of the Servei Meteorològic de Catalunya (SMC by its acronym in catalan). These stations compile information every 30 minutes, which are then used to create daily, monthly, and yearly temperature statistics. All temperature data, including extreme daily temperature data, is stored in the Catalan Meteorological Database. XEMA data is subjected to post-recording quality control, which includes a number of hierarchical and semi-automatic data verification procedures that are always overseen by technical experts.

We calculated the mean, maximum and minimum temperature of the 0 - 9 days, 10 -14 days, 70 - 90 days and between 0 - 90 days before each sampling, which encompass either the entire period of spermatogenesis (i.e., 90 days) or key periods of sperm development such as epididymal storage, development of sperm motility, and early spermatogenesis¹⁸.

4.2.3.4 Statistical analysis

To assess the association between ambient temperature and sperm parameters, we used different models according to the characteristics of each parameter. For the sperm concentration we used negative binomial regressions, for the volume we used log transformed linear regression and for the progressive motility we used censored Tobit regression as it is a percentage. The estimates, derived from mixed models to consider the repeated measurements, were adjusted per age, smoking habits and Socioeconomic Status (SES). These variables were selected as potential confounders according to their association with sperm quality parameters and inclusion in previous research.^{19, 20, 21}

We also conducted stratified analyses on smoking habits (non-smokers vs current smokers), season (Spring, summer, autumn, and winter), number of semen samples provided per participant (3 or less, or more than 3 samples), and according to the precision of geocoding (Geocoding 1 for Barcelona or Geocoding 2,3,4 for the rest of Catalogne). The precision of the geocoding was given by the geocoding software, 1 being the most accurate thus is at the exact address and 4 the less accurate thus is at the commune level) .

This study includes a number of statistical analyses that consider different sperm parameters as well as ambient temperatures. In order to calculate statistical power, the

outcome with the greatest variability and least repeatability was chosen as a conservative option: sperm motility.

The calculations consider the categorization of the exposure variable into two groups (exposed to high ambient temperatures above the third quartile, vs. the rest of the population). This classification was also done conservatively, since the final analysis using the continuous exposure to ambient temperature could have more statistical power.

Based on these assumptions, a sample of 250 people has 80% power to detect a 5% difference in sperm motility.

The following values, obtained from our own data and the literature, were used to calculate statistical power:

- Lost to follow-up: 10%
- Sperm motility variance: 410
- Final model R²: 15%
- Number of repeated measurements: 4
- Intra-class correlation of repeated measurements of sperm motility: 0.6
- Type I Error: 0.05

4.2.3.5 Sensitivity analysis

The association between ambient temperature and sperm parameters was analyzed adjusting for different air pollutants (NO₂, NO_x, PM₁₀, PM_{2.5}, PM_{2.5}absorbance, and PM_{coarse}), using exposure estimates at each participant's residential addresses. The spatiotemporal exposure assessment approach was based on a land use regression (LUR) modeling framework developed in the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE) framework^{22, 23, 24} (www.escapeproject.eu). Following the ESCAPE protocol, 20 measurement sites were selected for PM₁₀, PM_{2.5-10}, PM_{2.5}, and PM_{2.5}absorbance, and 40 measurement sites for NO₂ and NO_x. These sites included both traffic and background locations, and represented the gradient of various land use, emission sources, and traffic characteristics. Three 2-week monitoring campaigns were conducted in 2009 during different seasons. Air pollution exposure was predicted at the residential address using LUR models and assigned to each participant according to different time windows before semen collection. The temporal adjustment factor was done following the ESCAPE guidelines^{22, 24}, using daily routine monitoring data from selected background stations within the ZQA's.

The study protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of Parc Salut Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, and study participants gave at the time of first donation written consent to participate in scientific studies anonymously.

4.2.4 Results

4.2.4.1 Study population

The study was performed from 2007 to 2012. All 172 subjects (25 years \pm 4) contributed with a total of 597 semen analysis. Table 1 shows the main characteristics of participating subjects, as well as their lifestyles. The mean of the sperm parameters is above WHO criteria 2010 values.

Characteristics of population	Mean \pm Standard Deviation (SD)
Age (years)	24.4 \pm 4.1
Height (m)	1.77 \pm 0.06
Weight (Kg)	73.13 \pm 9.6
Sperm parameters	
Seminal volume (mL)	3.5 \pm 1.7
Sperm concentration (mill/mL)	93.4 \pm 55.1
Progressive motility (%)	52.4 \pm 16.0
Lifestyles factors	
	n (%)
Current smokers	58 (33.7)
Medication drugs	9 (5.3)

Tableau 4.12 (Table 2 of the manuscript): Characteristics and lifestyle factors of the study population

4.2.4.2 Ambient temperature and sperm parameters

4.2.4.2.1 Sperm concentration

For this parameter, a statistically significant decrease is observed in all the exposure windows associated with higher ambient temperatures in the crude model. Associations were preserved in the adjusted model for the windows between 10-14 days (β : -0.015; CI 95%: -0.03, -0.004, p-value 0.008) and between 0-90 days before sampling. (β : -0.024; 95% CI: -0.04; -0.007; p-value 0.006).

Figure 1 shows the effect of ambient temperature on the sperm concentration for the crude and adjusted model.

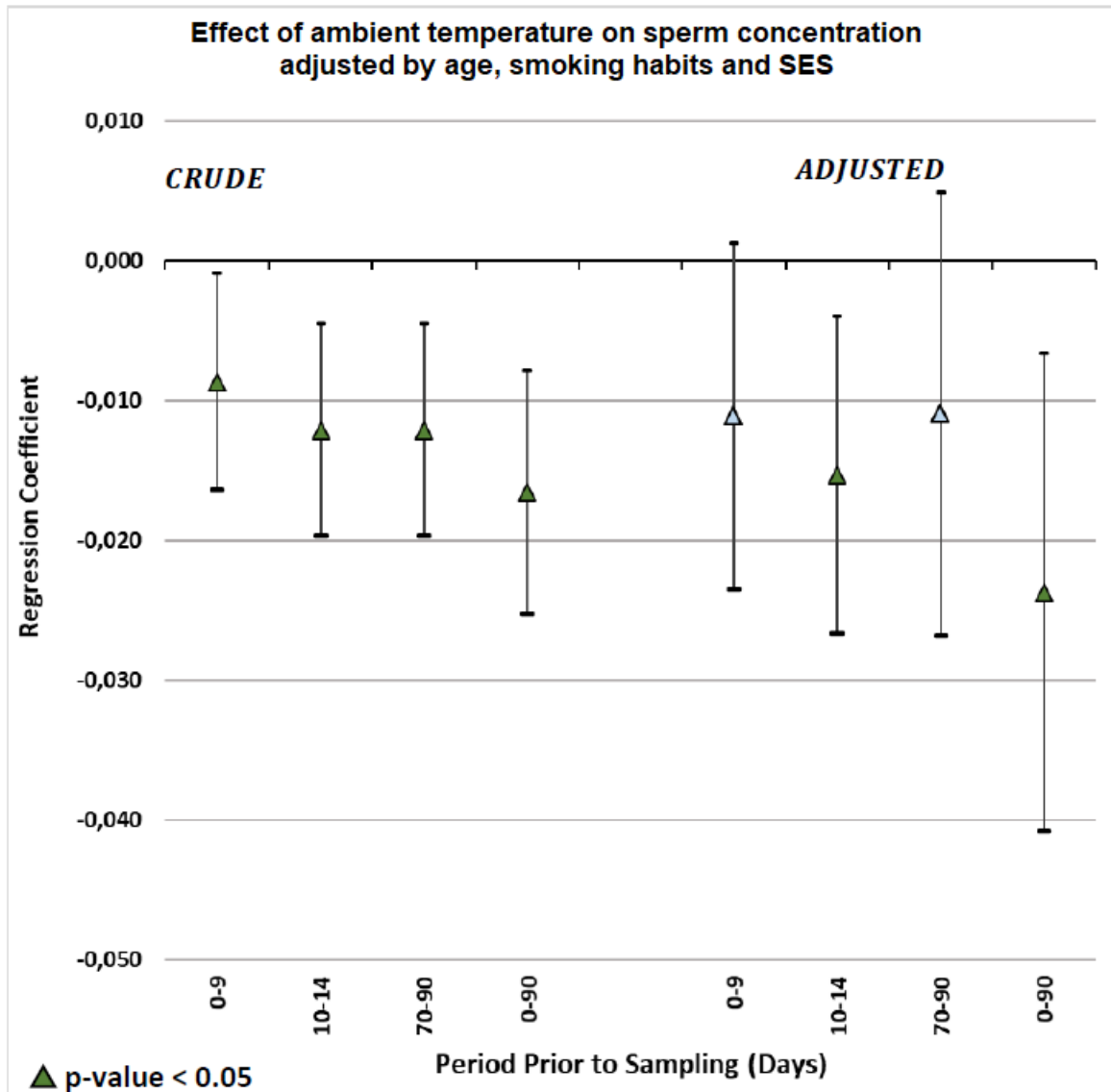


Figure 4.14 (Figure 1 of the manuscript): Association between **sperm concentration** and ambient temperature at the different exposure windows; adjusted per age, smoking habits, and SES. Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05.

4.2.4.2.2 Progressive motility

In the crude model, a statistical decline was observed for all the exposure windows. When adjusting per age, smoking habits and SES, there was a decrease in progressive motility only for the exposure windows between 10-14 days (β : -0.44; 95% CI: -0.80; -0.09; p-value 0.001) and 0-90 days before sampling (β : -0.66; 95% CI: -1,17; -0.15; p-value 0.01)

Figure 2 shows the effect of ambient temperature on the sperm concentration for the crude and adjusted model.

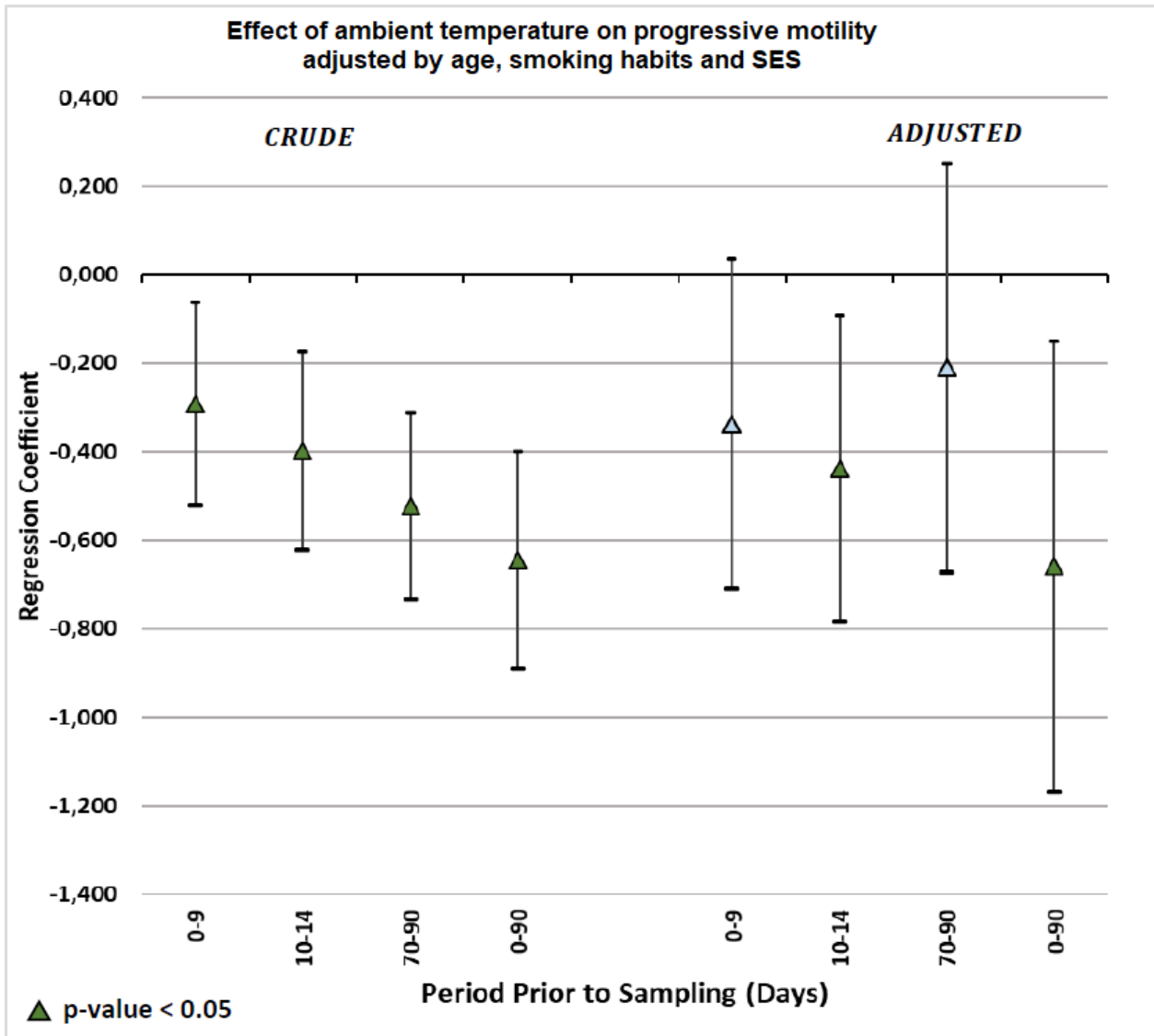


Figure 4.15 (Figure 2 of the manuscript): Association between **progressive motility** and ambient temperature at the different exposure windows; adjusted per age, smoking habits, and SES. Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05.

4.2.4.2.3 Seminal volume

In both the crude and adjusted models, no statistically significant associations were observed between the increase in ambient temperature and seminal volume, however, a decrease in the parameter corresponding to the interval between 70 - 90 days before sampling was observed without reaching statistical significance. Figure 3 shows the effect of ambient temperature on the seminal volume for the crude and adjusted model.

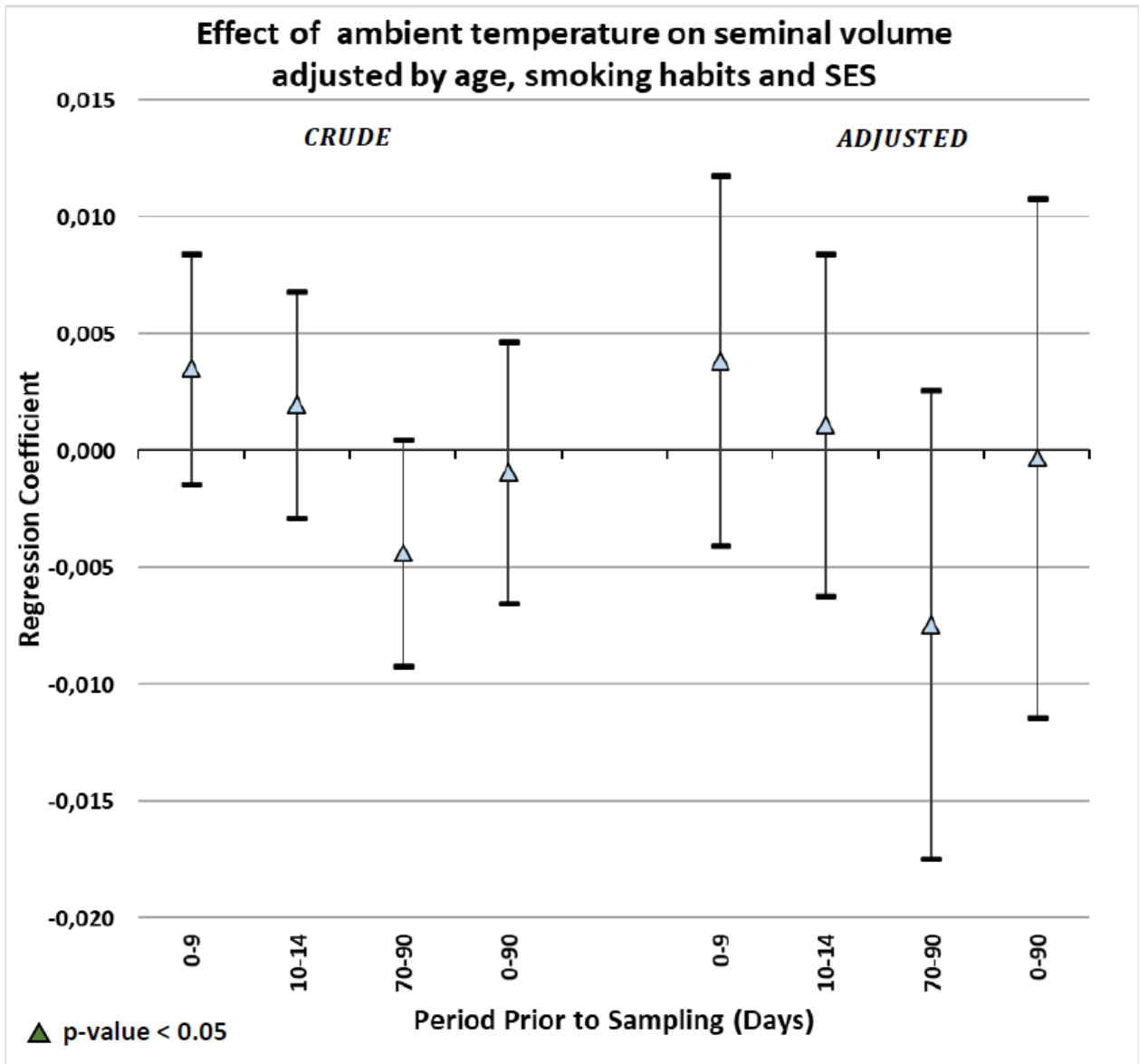


Figure 4.16 (Figure 3 of the manuscript): Association between **seminal volume** and ambient temperature at the different exposure windows; adjusted per age, smoking habits, and SES.

Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05.

4.2.4.2.5 Sensitivity analysis

Further adjusting by air pollution did not modify the previously shown associations between ambient temperature and sperm parameters. The results of the sensitivity analyses are shown in the supplementary figures S4 to S6.

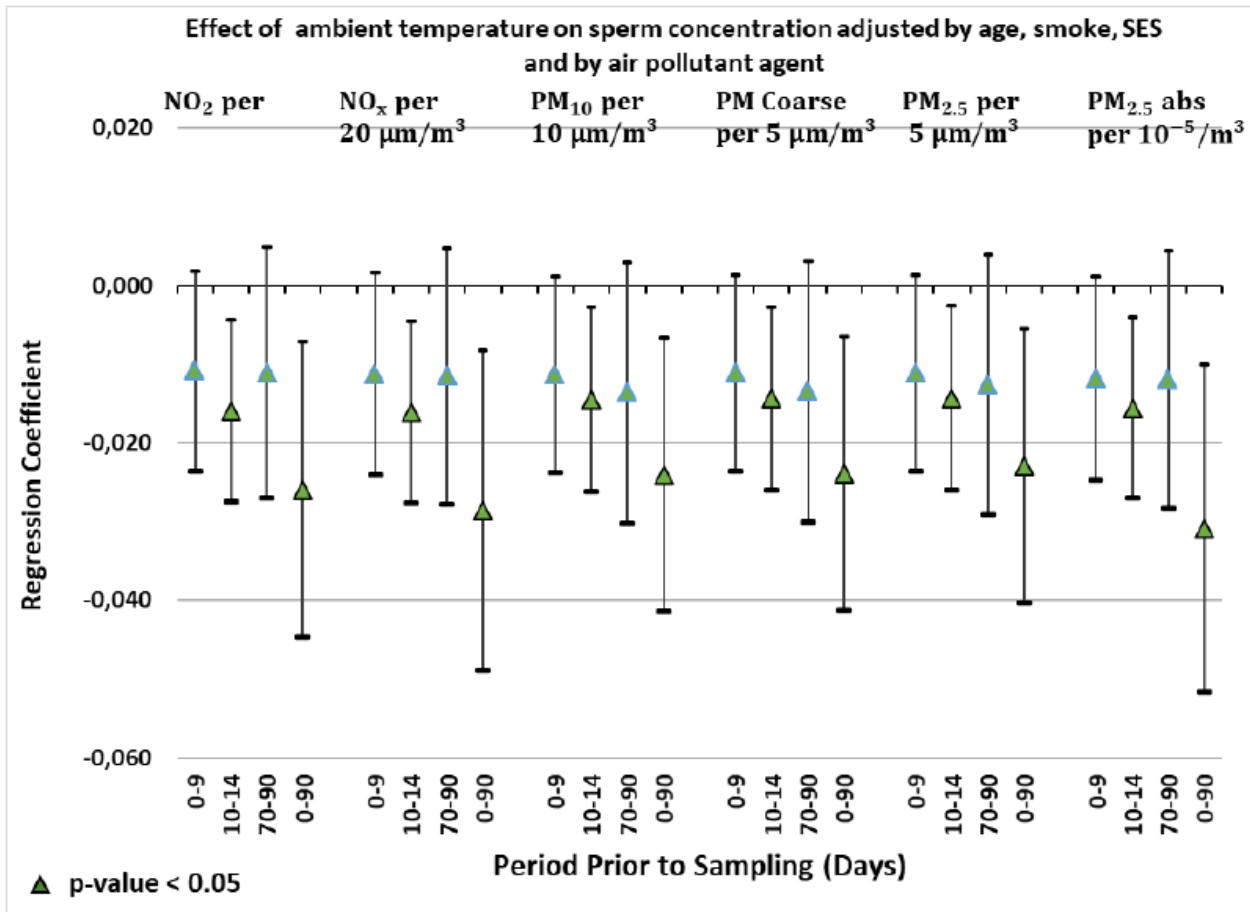


Figure 4.17 (Figure S4 of the manuscript): Effect of ambient temperature on **sperm concentration** at the different exposure windows, adjusted per age, smoking habits, SES and different **air pollutants**. Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05

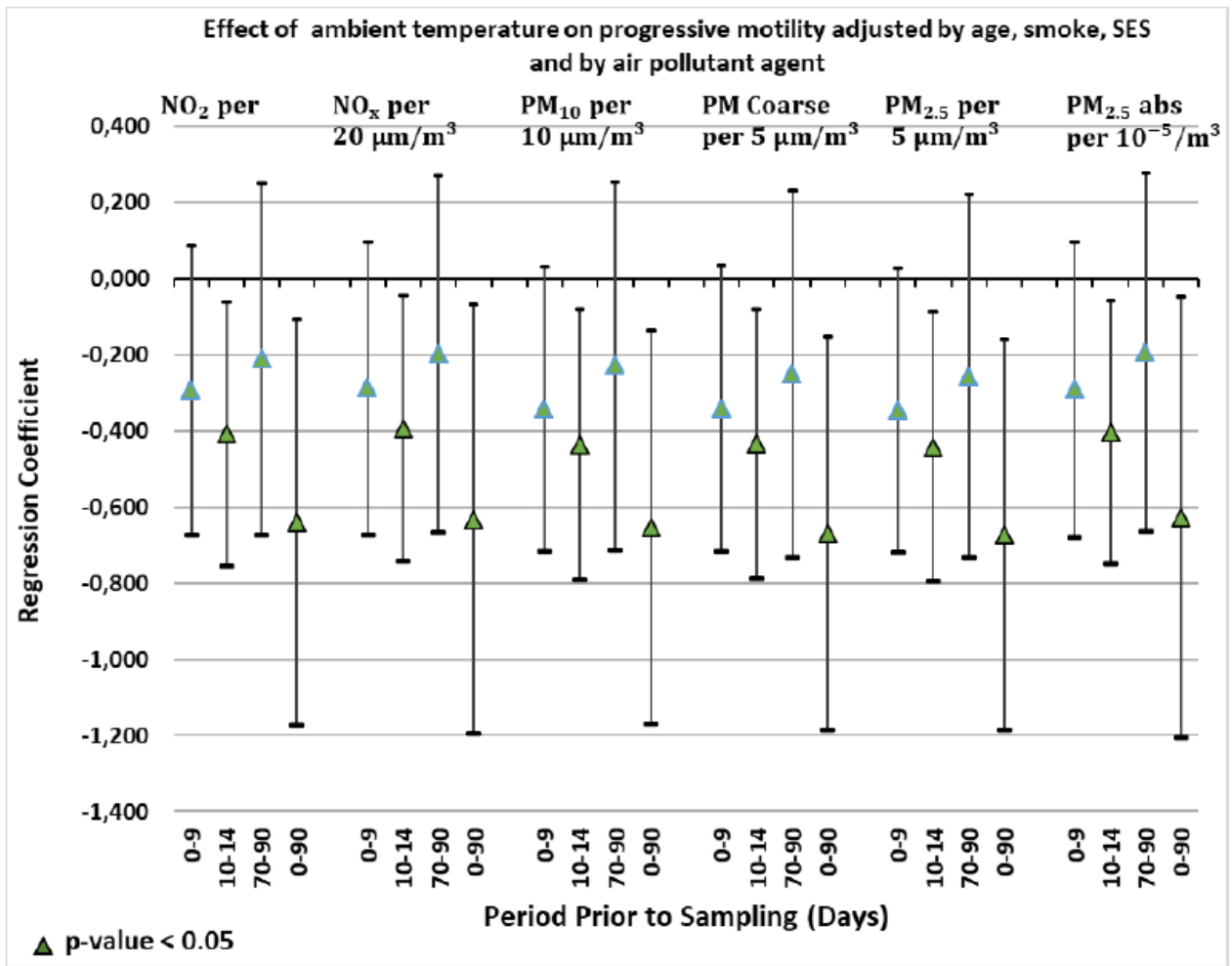


Figure 4.18 (Figure S5 of the manuscript): Effect of ambient temperature on **progressive motility** at the different exposure windows, adjusted per age, smoking habits, SES and different **air pollutants**. Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05.

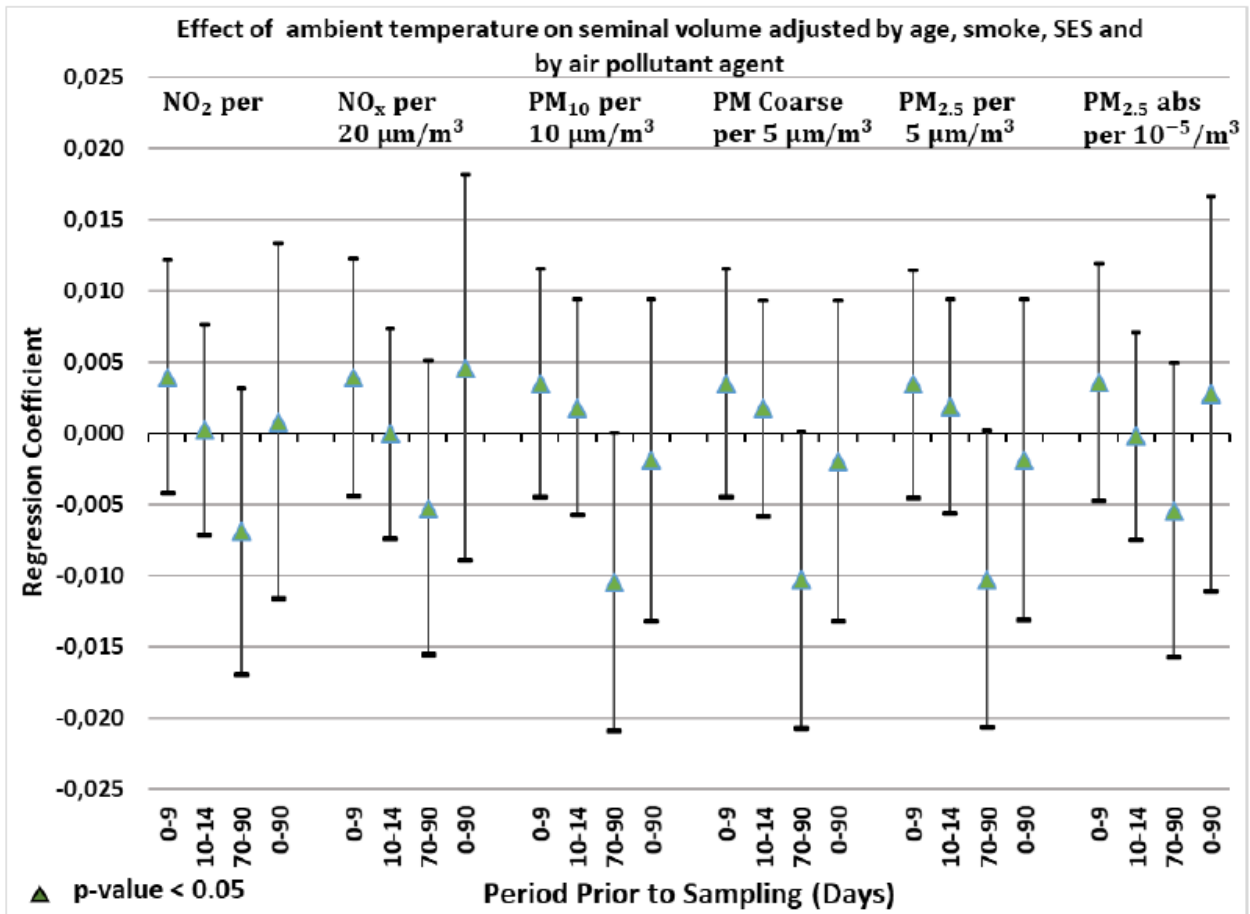


Figure 4.19 (Figure S6 of the manuscript). Effect of ambient temperature on **seminal volume** at the different exposure windows, adjusted per age, smoking habits, SES and different **air pollutants**. Coefficients (95% CI). Square markers green shows a regression coefficient with p-value < 0.05

4.2.5 Discussion

In this retrospective study, including young and healthy men with high quality sperm, and adjusting for important potential confounders, we found a negative effect of ambient temperature, where higher temperatures were associated with lower semen quality. We found effects in two of the three sperm parameters studied. The most adversely affected was progressive motility.

4.2.5.1 Comparison with the literature

To the best of our knowledge, few publications have addressed the effect of ambient temperature on normozoospermic men. Our study shows that the ambient temperature has the greatest effect in between 10 -14 days before the ejaculation, which corresponds to the stage of sperm motility development. The effect is even greater when considering the overall period that includes the whole cycle of spermatogenesis (0 - 90 days before sampling). Results that persisted even when air pollutants were introduced in the adjusted model. A longitudinal study of 10,802 men in China²⁰ reported that every 5°C increase in temperature was significantly associated with a decrease in sperm concentration, progressive motility, total sperm count, total motility, total motile sperm count and progressively motile sperm count. Additionally, in a meta-analysis of nine publications which assessed the effects of high ambient temperatures on men's reproductive health, Hoang-Thi *et al* observed a decline in sperm quality in 356 men from Iran, Italy, Thailand, China and Egypt, with decreased in sperm volume, total sperm number, sperm concentration, progressive motility, and normal morphology²⁵.

Although there have been previous studies on the effects of temperature on human reproductive health have been performed, these have generally focused on scrotal temperature instead of ambient temperature. These studies showed a negative correlation between scrotal temperature and a decrease in sperm parameters, sperm DNA integrity, and inhibin B, which is considered a biochemical marker of sperm production^{26, 27, 28, 29}. It is known that in groups of subfertile men there is a higher scrotal temperature than in groups of fertile men^{26, 29}. Additionally, the presence of varicocele is a clear example of the effect of temperature on the testicular level, mainly because the veins that drain the testicle increase resistance to blood circulation and subsequently temperature, and varicocele is a known cause of infertility³⁰.

However, a direct relationship between scrotal temperature and sperm quality is not always observed. The internal temperature is not only responsible for these changes as we show that the ambient temperature can have an effect. In the study by Levitas *et al* in 2013³¹, seasonal variations and their effect on annual semen variations were evaluated considering 6455 spermograms, concluding that there was an association that could be related to annual circadian rhythms, and that the effect is different when differentiate between normozoospermic and oligozoospermic individuals.

4.2.5.2 Possible mechanisms

Although evidence suggests a potential link between high ambient temperatures and reduced sperm quality, the underlying mechanisms of this association are unknown.

Several studies, for example, have described how elevated testicular temperature can be caused by high ambient temperatures. This scenario could lead in an increase in reactive oxygen species (ROS)³², as well as high levels of cytochrome c and caspases 9 and 3, that are implicated in DNA fragmentation which happens in one of the most advanced phases of sperm apoptosis³³. In 2006, Chen *et al* found an inverse association between percentage apoptosis and progressive motility, as well as a positive relationship between percentage apoptosis and sperm tail abnormalities³⁴.

Neutral seminal glucosidase (NAG), a substance secreted by the epididymis, has been associated to sperm motility³⁵. while low NAG activity was related to functional deficiency of the epididymis in infertile men.³⁶ Henkel *et al* found that NAG activity was highest in spring and lowest in autumn.³⁷

More recently, Yan-Qing Wu *et al* in 2020 reported a possible biological mechanism that could explain our results. After exposing healthy volunteers to temporary scrotal hyperthermia, they observed a decrease in the expression of 61 proteins involved in sperm motility and sperm concentration particularly AKAP4, SPESP1, ODF1, ODF2, GAPDHS, and ACTRT2 proteins³⁸.

However, the most part of these mechanisms have been described in terms of the association between sperm quality and scrotal temperature. Epidemiological studies on the influence of environmental temperature on scrotal temperature and, therefore, on semen quality remain limited.

4.2.5.3 Strengths and limitations

The study's findings must be examined in light of several strengths and some limitations.

The participants, who resided in different areas of city, provided an average of 3.4 semen samples per person. With these repeated measurements, it is possible to reduce within-subject variability and produce accurate results. In this retrospective study in a cohort of healthy young men, several confounders, such as age, smoking habits, and SES, were controlled. Nevertheless, it is possible that some of other relevant factors, particularly those related to the lifestyle of the participants that were not available should have been considered.

We modeled the effects of ambient temperature on sperm quality at the residential participant level, considering for exposure windows corresponding to the entire period of spermatogenesis. Our findings are ground-breaking since few studies have analyzed this environmental factor with this degree of individualization. In addition, our results are not influenced by the exposure to air pollution by the participants.

The study was conducted in men selected to be sperm donors and although the choice of this population group can provide important strengths on the interpretation of the results of our study, it can also prevent their generalization to a general population.

Finally, we have not considered other sperm parameters that could be impacted by ambient temperature, such as DNA fragmentation, the level of oxidative stress, the percentage of cell apoptosis, and others. Nevertheless, this opens the possibility to future investigations with a larger sample size.

In conclusion, our analyses show an effect of the increase in ambient temperature associated with the decrease in sperm parameters. The observed effects were quite substantial, even for an increase of 1°C, which is to be considered in the era of climate change that we are experiencing. More research is required on the effects of ambient temperature on sperm quality, particularly in individuals with semen alterations, incorporating new semen quality parameters that assess cell functionality more precisely, making use of repeated seminal sampling and more accurate ambient temperature estimations.

4.2.6 References

1. Inhorn MC. Global infertility and the globalization of new reproductive technologies: illustrations from Egypt. *Soc Sci Med.* 2003;56(9):1837-1851. doi:10.1016/s0277-9536(02)00208-3
2. Lutz W, O'Neill BC, Scherbov S. Demographics. Europe's population at a turning point. *Science.* 2003;299(5615):1991-1992. doi:10.1126/science.1080316
3. Grant J, Hoorens S, Sivadasan S, et al. Trends in European fertility: should Europe try to increase its fertility rate...or just manage the consequences? *Int J Androl.* 2006;29(1):17-24. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00634.x
4. Singh K, Jaiswal D. Human male infertility: a complex multifactorial phenotype. *Reprod Sci.* 2011;18(5):418-425. doi:10.1177/1933719111398148
5. Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl.* 2006;29(1):2-11. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00573.x
6. Nordkap L, Joensen UN, 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. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(2):221-230. doi:10.1016/j.mce.2011.05.048
7. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil (Camb).* 2010;13(4):189-193. doi:10.3109/14647273.2010.531883
8. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):55-66. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.017
9. Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut.* 2014;187:145-152. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.030
10. Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, Bonde JP. Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health.* 2009;22(4):305-329. doi:10.2478/v10001-009-0036-1
11. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:66. Published 2013 Jul 16. doi:10.1186/1477-7827-11-66
12. 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.* 2011;95(1):116-123. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.031

13. Li Y, Li Y, Zhou N, et al. Socio-psycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2013;39(2):102-110. doi:10.1136/jfprhc-2011-100276
14. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, et al. Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med*. 2014;60(1):43-51. doi:10.3109/19396368.2013.840687
15. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S; Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med*. 2012;172(5):440-442. doi:10.1001/archinternmed.2011.1382
16. Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 2012;18(4):420-435. doi:10.1093/humupd/dms009
17. Maya-Soriano MJ, Taberner E, Sabés-Alsina M, et al. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. *Theriogenology*. 2015;84(3):384-389. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.03.033
18. Johnson L, Welsch TJ, Wilker C. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: *Comprehensive Toxicology*. Sipes G, McQueen CA, Gandolfi AJ, eds; 1997; 5-98.
19. Wang X, Tian X, Ye B, et al. The association between ambient temperature and sperm quality in Wuhan, China. *Environmental Health*. 2020;19(1). doi:10.1186/s12940-020-00595-w
20. Zhou Y, Meng T, Wu L, et al. Association between ambient temperature and semen quality: A longitudinal study of 10 802 men in China. *Environ Int*. 2020;135:105364. doi:10.1016/j.envint.2019.105364
21. Xie M, Utzinger KS, Blickenstorfer K, Leeners B. Diurnal and seasonal changes in semen quality of men in subfertile partnerships. *Chronobiol Int*. 2018;35(10):1375-1384. doi:10.1080/07420528.2018.1483942
22. Beelen R, Hoek G, Vienneau D, et al. Development of NO₂ and NO_x land use regression models for estimating air pollution exposure in 36 study areas in Europe – The ESCAPE project. *Atmospheric Environment*. 2013;72:10-23. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.02.037

23. Cyrus J, Eeftens M, Heinrich J, et al. Variation of NO₂ and NO_x concentrations between and within 36 European study areas: Results from the ESCAPE study. *Atmospheric Environment*. 2012;62:374-390. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.080
24. Eeftens M, Beelen R, de Hoogh K, et al. Development of Land Use Regression models for PM_{2.5}, PM_{2.5} absorbance, PM₁₀ and PM_{coarse} in 20 European study areas; results of the ESCAPE project. *Environ Sci Technol*. 2012;46(20):11195-11205. doi:10.1021/es301948k
25. Hoang-Thi AP, Dang-Thi AT, Phan-Van S, et al. The Impact of High Ambient Temperature on Human Sperm Parameters: A Meta-Analysis. *Iran J Public Health*. 2022;51(4):710-723. doi:10.18502/ijph.v51i4.9232
26. Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril*. 1987;48(6):1006-1011. doi:10.1016/s0015-0282(16)59600-9
27. Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia*. 2007;39(6):203-215. doi:10.1111/j.1439-0272.2007.00794.x
28. Zhang MH, Zhai LP, Fang ZY, Li AN, Qiu Y, Liu YX. Impact of a mild scrotal heating on sperm chromosomal abnormality, acrosin activity and seminal alpha-glucosidase in human fertile males [published online ahead of print, 2018 Feb 22]. *Andrologia*. 2018;10.1111/and.12985. doi:10.1111/and.12985
29. Hjollund NH, Storgaard L, Ernst E, Bonde JP, Olsen J. Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reprod Toxicol*. 2002;16(3):215-221. doi:10.1016/s0890-6238(02)00025-4
30. Paick S, Choi WS. Varicocele and Testicular Pain: A Review. *World J Mens Health*. 2019;37(1):4-11. doi:10.5534/wjmh.170010
31. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Har-Vardi I. Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(5):406.e1-406.e4066. doi:10.1016/j.ajog.2013.02.010
32. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2011;13(1):36-42. doi:10.1038/aja.2010.68
33. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;80(3):531-535. doi:10.1016/s0015-0282(03)00756-8

34. Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, et al. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl.* 2006;27(1):112-120. doi:10.2164/jandrol.05073
35. Qiu Z, Chu Q, Zhang W, Luo C, Quan S. Level of neutral alpha-1,4-glucosidase in seminal plasma of Chinese men. *Andrology.* 2018;50(3):10.1111/and.12948. doi:10.1111/and.12948
36. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2904-2911. doi:10.1093/humrep/17.11.2904
37. Henkel R. Seasonal Changes of Neutral α -Glucosidase Activity in Human Semen. *Journal of Andrology.* 2006;27(1):34-39. doi:10.2164/jandrol.05064
38. Wu YQ, Rao M, Hu SF, Ke DD, Zhu CH, Xia W. Effect of transient scrotal hyperthermia on human sperm: an iTRAQ-based proteomic analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):83. Published 2020 Aug 12. doi:10.1186/s12958-020-00640-w

CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

5.1. Discussion

Dans la présente étude, j'ai examiné l'effet de deux facteurs environnementaux sur la qualité spermatique. Deux populations différentes ont été étudiées : une cohorte d'hommes de couples qui fréquentaient une clinique de procréation médicalement assistée, où l'effet de l'exposition aux polluants de l'air ont été étudié ; et une cohorte de jeunes en bonne santé, potentiels donneurs de sperme, où l'on a analysé l'effet de la température ambiante sur la qualité spermatique. On trouvera ci-après une analyse des résultats de ces deux populations.

5.1.1 Pollution de l'air

On a trouvé une association l'exposition aux PM_{10} et une réduction de la motilité progressive ainsi qu'une association entre l'exposition aux $PM_{2.5}$ et une augmentation de la fragmentation de l'ADN au cours de la période couvrant le cycle complet de la spermatogenèse (0 à 90 jours avant l'échantillonnage); tandis que, dans les stades finaux de la spermatogenèse (0 à 9 jours avant l'échantillonnage), l'exposition aux $PM_{2.5}$ est liée à une diminution du volume séminal.

De plus, l'exposition aux NO_x , $PM_{2.5}$ et $PM_{2.5\text{absorbance}}$ était associée à une augmentation du nombre total de spermatozoïdes aux premiers stades de la spermatogenèse (70 à 90 jours avant l'échantillonnage). L'association négative entre l'exposition aux PM, en particulier les PM_{10} , et les paramètres de motilité des spermatozoïdes tout au long de la période de spermatogenèse (0 - 90 jours avant l'échantillonnage) est une observation retrouvée par plusieurs auteurs^{119, 120, 121, 122}. ce qui est le seul résultat relativement consistant dans la littérature : en effet, en ce qui concerne les autres paramètres spermatiques, les résultats des différentes études épidémiologiques restent inconsistants. Les résultats concernant la concentration spermatique en constituent un exemple. Bien que dans cette étude et les précédents^{102, 120, 123} n'aient trouvé aucune association entre l'exposition à la pollution de l'air et la concentration de spermatozoïdes, d'autres chercheurs ont identifié une association négative entre ce paramètre et les mêmes polluants de l'air analysés dans cette thèse^{114, 119, 124}.

Au-delà des facteurs associés à la population étudiée tels que la taille de l'échantillon ou la variabilité intra-sujet, entre autres, ces contradictions peuvent être influencées par la méthode d'estimation de l'exposition aux polluants, des différences de localisation géographique où les études ont été menées, ainsi que la composition des polluants, en particulier des PM qui peut varier dans le temps et l'espace. Bien que la taille et la surface des particules définissent leur impact sur la santé humaine, la pertinence potentielle de leur composition, qui est complexe et dépend de leurs sources d'émission, ne doit pas être négligée. Et c'est précisément cette complexité qui peut influencer les mécanismes d'immunotoxicité chez l'homme et donc conduire à des effets différents sur la qualité spermatique¹²⁵.

L'augmentation du nombre total de spermatozoïdes en association avec une augmentation de l'exposition aux polluants de l'air a également été décrite par Lao *et al.*¹²⁶ et Tomei *et al.*¹²⁷. Un phénomène compensatoire d'activation de la spermatogenèse médié par l'augmentation des hormones FSH et LH en réponse à l'exposition aux stressseurs urbains pourrait en être l'explication.

5.1.2 Température ambiante

Nous avons montré que l'exposition à des températures ambiantes élevées était associée à une diminution significative de la concentration de spermatozoïdes et de la motilité progressive dans la phase intermédiaire de la spermatogenèse, ainsi que sur toute la période (0 à 90 jours).

Pendant la phase initiale de la spermatogenèse, une diminution du volume séminal a été observée, mais sans signification statistique. Les effets observés pour une augmentation de 1 °C, ce qui n'est pas négligeable. Il est important de noter que la population d'étude était composée de jeunes donneurs potentiels de sperme, sains, avec une haute qualité spermatique ; et bien que cette cohorte ne représente pas l'ensemble de la population masculine, la détermination de la dégradation significative des paramètres de qualité spermatique chez ces sujets est un facteur clé qui ne devrait pas être sous-estimé.

De nombreuses études antérieures ont démontré que, comme déjà discuté dans le chapitre 4, une température ambiante élevée peut donner lieu à une augmentation de la température scrotale, ce qui est associé à une qualité spermatique inférieure.

5.2 Force et limites de l'étude

L'un des points forts de cette étude est d'avoir des participants avec des échantillons répétés, fournissant une moyenne de 3.27 séminogrammes par participant pour l'étude des effets de la pollution de l'air, et 3.4 séminogrammes par participant pour l'analyse de l'effet de la température ambiante. Cela permet de prendre en compte la variabilité intra-sujet tout au long de l'étude.

L'exposition aux polluants a été mesurée à l'aide de modèles LUR vérifiés établis dans le cadre du projet européen ESCAPE. De plus, les concentrations de polluants atmosphériques ont été calculées aux adresses résidentielles et de travail, ce qui est original, la plupart des études ayant des estimations d'exposition individuelles ne prennent en compte que l'adresse résidentielle. Les estimations de l'exposition à température ambiante ont été effectuées en tenant compte des stations météorologiques disponibles dans la ZQA en fonction de l'adresse de résidence des participants. Ce sont des modèles validés qui permettent des mesures d'exposition individuelles d'une façon précise.

Évaluer les effets de deux des facteurs environnementaux analysés dans la présente étude à l'aide de fenêtres d'exposition ; permet de disposer d'informations relatives à l'influence des polluants de l'air ainsi qu'à la température ambiante aux différents stades de la spermatogenèse.

Cependant, il existe des limitations :

- L'étude peut présenter un biais de sélection dans la population étudiée. D'une part, la cohorte SEMAP est constituée d'hommes appartenant à des couples ayant fréquenté une clinique de procréation médicalement assistée, et d'autre part, l'étude de l'influence de la température ambiante sur la qualité spermatique a été réalisée chez des hommes sélectionnés pour être des potentiels donneurs de sperme. Les deux cohortes ne sont pas représentatives de la population masculine générale.
- Du point de vue pré analytique, certaines informations concernant certaines covariables liées au mode de vie, et des renseignements sur l'activité professionnelle ou économique des participants, entre autres, ont été obtenues par auto-déclaration à partir du questionnaire de recrutement, ce qui peut conduire à des incohérences dans la collecte de ces données, affectant l'analyse finale.
- Finalement, la taille de l'échantillon peut ne pas être suffisante pour détecter un lien entre les facteurs environnementaux et la qualité spermatique.

5.3 Conclusion

La qualité spermatique est un sujet de recherche de grande actualité puisqu'elle entraîne des répercussions sur la santé reproductive. Dans cette étude et pour ces deux cohortes spécifiques, un impact négatif sur la qualité spermatique associé à l'exposition à des facteurs environnementaux a été trouvé ; en particulier, sur la motilité progressive et sur le volume séminal et la fragmentation de l'ADN associés à l'exposition aux polluants atmosphériques et sur la concentration de spermatozoïdes et la motilité progressive associée à l'exposition à des températures élevées. L'ubiquité de ces deux expositions environnementales rend nécessaire la mise en place à la fois de politiques publiques permettant un contrôle plus globalisé des émissions de polluants atmosphériques, ainsi qu'un engagement plus important dans la lutte pour réduire le risque d'augmentation de la température ambiante.

5.4 Perspectives

A court terme, il est prévu d'étudier les effets des expositions professionnelles sur la qualité spermatique.

L'étude des effets de nouvelles variables d'exposition, telles que l'exposition aux rayonnements non ionisants, les contaminants dans l'eau potable, le stress, etc. est aussi envisagée et peut fournir de nouvelles évidences sur des facteurs environnementaux pouvant avoir un effet délétère sur la qualité spermatique.

Sur le long terme, le développement de nouvelles techniques d'estimation plus fines des polluants de l'air, incluant au cours des transports, ainsi que des technologies avancées associés aux analyses du sperme du point de vue de la protéomique et de la génomique, peuvent fournir des données plus précises pour de futures études dans des cohortes plus représentatives de la population masculine générale.

Finalement, la mise en œuvre de meilleures méthodes de collecte de données associées au mode de vie des participants, en envisageant l'utilisation d'entretiens en face à face ou de questionnaires entièrement standardisés à choix multiples, pour éviter à la fois le manque de données fournies sur ces aspects avec biais d'information.

La continuité de ces études doit être envisagée en tenant compte du fait qu'il reste des aspects concernant la relation entre les expositions aux facteurs environnementaux et la

qualité spermatique qui doivent être clarifiés afin de garantir une meilleure qualité de la santé reproductive chez les hommes en âge de procréer.

ANNEXE 1. DOCUMENT INFORMATIF DESTINE AUX PATIENTS SUR LE PROJET

IMPACTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE VARONES DEL ÁREA METROPOLITANA DE BARCELONA (SEMAP)

Investigadores responsables: Dra. Bénédicte Jacquemin, Dr. M. A. Checa y Dr. M. Brassesco

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Ante todo, queremos agradecerle su participación en el proyecto SEMAP (Air Polution and SEMen quality).

Se sabe que la calidad del semen tiene un impacto directo sobre la tasa de embarazo. A peor calidad seminal, menos probabilidad de conseguir un embarazo. Varias exposiciones ambientales se han asociado a una disminución de la calidad seminal como son: el tabaquismo, la dieta, el uso de telefonía móvil, la temperatura, etc. Una de estas exposiciones ambientales que podría influir es la contaminación atmosférica, y principalmente la proveniente del tráfico.

El presente estudio pretende analizar el efecto de la exposición aguda a estos contaminantes

atmosféricos sobre la calidad del semen, y para ello necesitamos de su ayuda. Este estudio incluye a varones del área metropolitana de Barcelona, que acuden a este centro de infertilidad y que quieran participar independientemente de la causa de infertilidad. Intentamos así tener una amplia variedad de calidad de sémenes y poder medir mejor el impacto de la contaminación.

Este proyecto es un estudio que se coordina desde el CREAL (Centre de Recerca en Epidemiologia ambiental) que es un centre de investigación de renombre internacional, y donde participan pacientes del Hospital del Mar y del centro CIRH (Centro de Infertilidad y Reproducción Humana) en Barcelona. Todos los análisis de semen se realizarán en el centro CIRH.

PROTOCOLO DEL ESTUDIO

La participación a este estudio es totalmente voluntaria y anónima.

Si usted acepta la participación a este estudio se le pedirá:

- que cumplimente un cuestionario detallado sobre estilos de vida, hábitos dietéticos y de consumo, y actividad física,
- que nos facilite la dirección de su domicilio, así como la de su centro de trabajo para cuantificar su exposición personal a determinados contaminantes atmosféricos,
- que nos autorice a recopilar los datos de los parámetros seminales y % de fragmentación del ADN de dos muestras de semen recogidas en un intervalo de tiempo como mínimo de 30 días. Se pueden aprovechar las muestras necesarias para el diagnóstico clínico que pueda necesitar o la muestra que entregue para el tratamiento que necesite. El coste de los análisis adicionales que sean necesarios correrá a cargo de CIRH.

Todos los datos derivados del cuestionario, así como del análisis de las muestras semen serán tratados de forma totalmente confidencial y anónima. Todos los datos serán tratados de forma encriptada, donde nunca aparecerá el nombre del paciente.

El semen se analizará en el momento en que entregue la muestra en el centro CIRH, pudiendo disponer del resultado de las pruebas que se realicen.

PASOS A SEGUIR

Una vez acepte participar en el estudio:

- se le citará en el CIRH a un horario que le convenga con un investigador del centro CIRH para que entregue la primera muestra (si ya disponemos de esa información no será necesario repetir el análisis)
- se le pedirá firmar el consentimiento informado
- se le entregará un cuestionario de exposición ambiental que podrá rellenar y entregar en la siguiente visita.

PREGUNTAS HABITUALES

¿CUÁNTO TIEMPO DURA LA CITA?

El cuestionario se cumplimenta en aproximadamente 20 minutos, pero podrá hacerlo en casa y traerlo en la siguiente visita, o cuando entregue la segunda muestra de semen.

¿RECIBIRÉ ALGÚN BENEFICIO POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Es poco probable que a corto plazo obtenga otros beneficios médicos directos que los derivados de los resultados del seminograma. Sin embargo, esperamos que la

información que se obtenga como resultado de este estudio beneficie en el futuro la comprensión de las causas de infertilidad.

¿HAY ALGUN RIESGO POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

No hay ningún riesgo asociado, ya que se podrán aprovechar las muestras de semen necesarias para los estudios diagnósticos previos, o para el tratamiento que su médico le indique.

¿SE MANTENDRÁ LA CONFIDENCIALIDAD?

Los datos estarán protegidos de acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de datos*. El uso que se haga de la información obtenida será confidencial. Por lo tanto, la identidad del participante será siempre preservada. Igualmente, los datos obtenidos sólo podrán ser publicados de forma anónima, de forma agregada y no individual.

¿CUÁLES SON LOS COSTES?

Su participación en este estudio no representará ningún coste para usted. Usted no recibirá ninguna remuneración por participar en el estudio.

¿CUÁLES SON LOS DERECHOS COMO PARTICIPANTE?

La participación en el estudio es voluntaria. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento. El no participar o retirarse del estudio no representará ninguna penalidad o pérdida de beneficios a los que tiene derecho.

¿A QUIÉN DEBO LLAMAR SI TENGO UNA PREGUNTA O UN PROBLEMA?

Para preguntar acerca del estudio o por aspectos relacionados con la investigación comuníquese con Rafael Lafuente o Gemma López en el centro CIRH, teléfono: 93 206 36 96 ó al email: rlafuente@cirh.es

* INFORMACIÓN ESPECÍFICA SOBRE PROTECCIÓN DE DATOS:

En virtud de los artículos 4, 5 y 6 de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, la Fundació CREAL pone en su conocimiento que dispone de un fichero con datos de carácter personal denominado Investigación. La finalidad del fichero es desarrollar la investigación epidemiológica avanzada sobre factores ambientales que afectan a la salud humana,

para facilitar la prevención y el control de sus efectos perjudiciales. Los destinatarios de la información son el Grupo de Investigación encargado del estudio, y también los estamentos oficiales públicos o privados que, por obligación legal o necesidad material, deban acceder a los datos a efectos del correcto desarrollo del proyecto investigación, de acuerdo con

las buenas prácticas científicas. En cualquier caso, usted tiene derecho a ejercer los derechos de oposición, acceso, rectificación y cancelación en el ámbito reconocido por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre.

El responsable del fichero es la Fundación CREAL. Para ejercitar los derechos mencionados, y para cualquier aclaración, puede dirigirse por escrito mediante instancia dirigida a la Dirección de la Fundación en su domicilio sito en la calle Doctor Aiguader, 88, 08003 Barcelona.

ANNEXE 2. CONSENTEMENT A PARTICIPER A L'ETUDE

ID participante:

Hoja de consentimiento para participantes mayores de edad en un
proyecto de investigación biomédica

Contaminación atmosférica y calidad seminal (SEMAP)

Yo, _____, plena y libremente, acepto participar en el
estudio SEMAP.

Entiendo y comprendo que los objetivos de este estudio son para incrementar el conocimiento médico. Advierto que puedo renunciar a mi consentimiento en cualquier momento durante la realización de las pruebas, sin verme obligado a justificar las razones al CREAL. Sé que no padeceré ningún inconveniente por participar o dejar de participar en el estudio.

Doy fe que el propósito de este estudio, los riesgos de las pruebas, y la naturaleza y propósito de las mismas me ha sido completamente explicados por: _____ y que he tenido oportunidad de discutir este asunto con él/ella. También he recibido la información para el paciente del estudio.

Entiendo que por el hecho de participar en este estudio no se derivaran beneficios directos para mi persona, sino para la comunidad científica y la sociedad. Los datos obtenidos con estas exploraciones serán totalmente confidenciales.

1. Confirmando que he leído y entendido este documento, y que he tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que creía necesarias..... SI NO

2. Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirarme en cualquier momento, sin dar explicaciones, sin consecuencias legales o en la atención médica..... SI NO

3. Estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

Entrevista personal.....SI NO

Recogida de muestra de semen..... SI NO

Recogida de muestra de orina.....SI NO

Recogida de muestra de sangre.....SI NO

4. En el caso de producirse resultados que pudieran ser ciertamente relevantes para mí o mi familia deseo que se me comuniquen estos datos..... SI NO

5. Estoy de acuerdo en que se me contacte posteriormente por correo postal o teléfono en caso de que se haga un seguimiento de los participantes..... SI NO

Nombre y Apellidos del participante

Fecha

Firma

Rafael Lafuente/Anna Delgado

Fecha

Firma

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, por favor contacte con la Dra. Bénédicte Jacquemin en el número de teléfono 93 214 73 59 o al email bjacquemin@creal.cat.

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Parc de Salut MAR (CEIC – PS-MAR).

ANNEXE 3: QUESTIONNAIRE SUR L'EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE

CUESTIONARIO EXPOSICIÓN AMBIENTAL

Título del estudio: Impacto de los factores ambientales en la calidad espermática en varones residentes en el área metropolitana de Barcelona (Air Pollution and SEMen quality, SEMAP)

Investigadores responsables: Dra. Bénédicte Jacquemin, Dr. M. A. Checa y Dr. M. Brassesco

Centros participantes

Centro de Investigación en Epidemiología Ambiental (CREAL)

Hospital del Mar – Parc de Salut Mar de Barcelona

Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH)

INFORMACIÓN

Deberá dedicar unos **20 minutos** para rellenar este cuestionario. Procure **informar lo más detalladamente posible** cada parte del cuestionario para que tenga mayor validez. Puede entregar el cuestionario cumplimentado:

- en la siguiente visita al centro CIRH,
- a través de email a la atención de Rafael Lafuente (rlafuente@cirh.es)
- a través de FAX: 93 280 08 71 (a la atención de Rafael Lafuente)

Todos los datos derivados del cuestionario, así como los resultados de los análisis de las muestras semen, serán tratados de forma totalmente **confidencial y anónima**. Los datos serán tratados de forma **encriptada**, y nunca aparecerá los datos personales en los resultados del estudio.

Para cualquier duda o consulta puede contactar con:

Rafael Lafuente / Gemma López

Laboratorio de Andrología

CIRH-Clínica Corachan

93 206 36 96

rlafuente@cirh.es

DATOS PERSONALES

HC:

(Esta información es confidencial y será tratada de manera independiente respecto al resto de datos)

CENTRO:

CIRH

Hospital del Mar

Médico:.....

Nombre y Apellidos:

.....

Móvil:.....

Email:.....

0. DIRECCIÓN DOMICILIARIA Y LABORAL

(Esta información es confidencial y será tratada de manera independiente respecto al resto de datos)

A1. ¿Cuáles son los datos de su residencia actual?

CALLE: N°.....

PISO.....

Municipio/Provincia CP

A2. ¿Cuánto tiempo hace que vive en su domicilio actual? N° años |__|__| N° meses |__|__|

↳ A2a. Si lleva menos de 1 año, podría indicarnos la dirección de su domicilio anterior?

CALLE: N°.....

PISO.....

Municipio/Provincia CP

A3. ¿Podría facilitarnos la dirección de su centro de trabajo?

CALLE: N°.....

PISO.....

Municipio/Provincia CP

En caso de trabajo itinerante, indique en qué área lo desarrolla

1. DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS

A1. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? (Día/Mes/Año) |__|__|__| Edad:.....

Altura:..... Peso:.....

A2. ¿Dónde nació usted? (Municipio, País)

...../.....

A3. ¿A qué etnia o raza considera usted que pertenece?

Blanca/Caucásica

Gitana

Negra

Otra

Amerindia

Asiática

Magrebí

A4. ¿Cuál es su estado civil?

Soltero

Viudo

Otros

Casado o en pareja

Separado

A5. ¿Cuál es el nivel más alto de estudios que ha completado?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Sin estudios | <input type="checkbox"/> Estudios primarios |
| <input type="checkbox"/> Formación profesional (FP o similar) | <input type="checkbox"/> Bachillerato/BUP/COU |
| <input type="checkbox"/> Diplomatura/Licenciatura/Grado | <input type="checkbox"/> Máster y posgrado |
| <input type="checkbox"/> Doctorado | <input type="checkbox"/> Otros |

2. OCUPACIÓN

B1. ¿En relación a su situación laboral actual, cual le definiría mejor? *(Puede señalar más de una opción)*

- Trabajo tiempo completo
- Trabajo a tiempo parcial
- Paro
- Jubilado
- Estudiante
- Otro

[Saltar a la sección siguiente 'HISTORIA DE CONSUMO' en caso de no haber trabajado durante el último año]

B2. ¿En relación al trabajo actual y/o trabajos anteriores realizados durante el último año, podría indicarnos:

Período de contrato *Tiempo trabajado en la empresa (inicio y finalización del contrato)*
 Actividad de la empresa *¿A qué se dedica la empresa?*
 Puesto de trabajo *¿Qué puesto de trabajo ocupa el trabajador en la empresa?*
 Tareas *¿Qué tareas desempeña el trabajador en su trabajo?*
 Exposiciones químicas *¿El trabajador está expuesto en su trabajo a temperaturas extremas o sustancias (herbicidas, pesticidas, insecticidas...)? Por favor, indique el tipo de exposición*

Período de contrato (mes/Año)	Actividad de la empresa	Puesto de trabajo	Tareas	Exposiciones
Desde/..... Hasta/.....				
Desde/..... Hasta/.....				
Desde/..... Hasta/.....				

3. HISTORIA DE CONSUMO

C1. ¿Cómo definiría su relación con el hábito tabáquico?

- Fumador actual [Ir a la pregunta C2]
- Exfumador [Ir a la pregunta C5]
- He fumado en alguna ocasión [Ir a la pregunta C9]
- Nunca he fumado [Ir a la pregunta C9]

FUMADORES ACTUALES: En referencia a su consumo de tabaco actual:

C2. ¿Con qué edad inició su consumo de tabaco? |__|__| años.

C3. ¿Qué tipo de tabaco consume habitualmente?

- Tabaco rubio
- Tabaco negro
- Tabaco rubio y negro
- No sabe

C4. ¿Señale el número de cigarrillos/puros/pipas que fuma habitualmente? (Indique la cantidad y **SUBRAYE** 'día' o 'semana' según si la cantidad hace referencia al día o a la semana. Puede señalar más de una opción)

- Tabaco en cajetilla: |__|__| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar normal: |__|__| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar sin aditivos: |__|__| cigarrillos al día / semana
- Puro |__|__| puros al día / semana
- Tabaco de pipa |__|__| pipas al día / semana

[Ir a la pregunta C9]

EXFUMADORES: En referencia a su consumo de tabaco que tenía:

C5. ¿Con qué edad inició su consumo de tabaco? |__|__| años.

C6. ¿Con qué edad cesó su consumo de tabaco? |__|__| años.

C7. ¿Qué tipo de tabaco consumía habitualmente?

- Tabaco rubio
- Tabaco negro
- Tabaco rubio y negro
- No sabe

C8. ¿Cuánto fumaba habitualmente? (Indique la cantidad y **SUBRAYE** 'día' o 'semana' según si la cantidad hace referencia al día o a la semana. Puede señalar más de una opción)

- Tabaco en cajetilla: |__|__| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar normal: |__|__| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar sin aditivos: |__|__| cigarrillos al día / semana

- Puro |__|__| puros al día / semana
 Tabaco de pipa |__|__| pipas al día / semana

TABAQUISMO PASIVO: En referencia al tabaquismo en su domicilio:

C9. ¿Alguna de las personas que vive con usted fuma en el domicilio?

- Si
 ↳ C9a. Indique el consumo: |__|__| cigarrillos al día / semana
 (SUBRAYE 'día' o 'semana' según si el consumo hace referencia al día o a la semana)
 No, no se fuma en mi domicilio

C10. ¿Tiene en ocasiones personas de visita que fumen en su domicilio?

- Si
 ↳ C10a. Indique cuántas personas que vienen a su domicilio fuman: |__|__| personas
 al mes
 No

OTROS TIPOS DE CONSUMO

C11. ¿Durante una semana normal, ¿cuántos vasos, copas o consumiciones acostumbra a tomar? (Marcar el consumo entre semana y fin de semana. En caso de consumo ocasional especificar el consumo mensual)

	Entre semana	Fin de semana	Al mes
<input type="checkbox"/> Cerveza	__ __	__ __	__ __
<input type="checkbox"/> Vino o cava	__ __	__ __	__ __
<input type="checkbox"/> Licores, coñac	__ __	__ __	__ __
<input type="checkbox"/> Whisky, ginebra, ron, vodka	__ __	__ __	__ __

C12. ¿Ha utilizado algún tipo de droga durante el último mes? (Incluye marihuana, hachís, cocaína, anfetaminas, MDMA...)

- Si
 ↳ C12a. Por favor especifique qué sustancia y la frecuencia:
 a., |__|__| veces al mes
 b., |__|__| veces al mes
 No

4. HISTORIA RESIDENCIAL, CONSUMO Y USO DE AGUA

Vivienda

D1. ¿Cómo describiría su vivienda?

- Piso / apartamento (edificio) [Ir a pregunta D2]
 Casa unifamiliar aislada [Ir a pregunta D3]
 Casa unifamiliar pareada o adosada [Ir a pregunta D3]
 Otros

D2. En caso de piso o apartamento, en qué planta vive contando con entresuelo? |__|__| planta.

[Ir a la pregunta D4]

D3. En caso de casa aislada o apareada, en qué planta se encuentra el dormitorio? |__|__| planta.

D4. ¿Cuántos metros cuadrados tiene su domicilio sin contar jardín? |__|__|__| m².

D5. ¿Cuántas personas viven en su domicilio contando con usted? |__|__| personas.

D6. ¿El dormitorio de su domicilio tiene ventana exterior?

- Sí
- No

D7. ¿Se han realizado obras en su domicilio durante los últimos 6 meses?

- Sí
- No

Aire acondicionado / Calefacción

D8. ¿Dispone de aire acondicionado?

- Sí
- No

D9. ¿Dispone de calefacción central?

- Sí

↳ D9a. Especifique tipo de calefacción central y la cobertura en su domicilio

	Salón-comedor	Dormitorio	Resto habitaciones
Gas natural	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eléctrico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- No

Agua

D10. Indique la cantidad de agua bebe al día (*SUBRAYE 'vasos' o 'litros' según corresponda*): |__|__| vasos/litros

D11. ¿Cuál es la procedencia del agua de grifo de su domicilio?

- Agua de la red municipal
- Otros

D12. ¿Cuál es la procedencia del agua que bebe en casa? (*indique la más habitual*)

- Agua de grifo
 - ↳ D12a. Utiliza algún filtro?
 - Si. Qué marca?
 - No
- Agua embotellada
- Otro tipo

D13. ¿Cuál es la procedencia del agua que utiliza fuera de casa? (indique la más habitual)

- Agua de grifo
 - ↳ D13a. Utiliza algún filtro?
 - Si. Qué marca?
 - No
- Agua embotellada
- Otro tipo

D14. ¿Cuál es la procedencia del agua que utiliza para cocinar? (indique la más habitual)

- Agua de grifo
 - ↳ D14a. Utiliza algún filtro?
 - Si. Qué marca?
 - No
- Agua embotellada
- Otro tipo

D15. ¿Como se asea habitualmente, y con qué frecuencia a la semana? (Puede marcar ambas opciones)

- Duchas: |__|__| a la semana / mes
- Baños: |__|__| a la semana / mes

D16. ¿Se baña en piscinas públicas o privadas?

- Si
 - ↳ D16a. ¿Qué tipo de piscina y qué se utiliza como desinfectante? (Puede señalar ambas columnas)

	Pública	Privada
Nada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cloro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ozono	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
No sabe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- No, nunca o casi nunca me baño en piscinas

D17. ¿Cuántas veces al mes se baña en una piscina? |__|__| veces al mes

D18. ¿Utiliza saunas o baños calientes? |__|__| veces al mes

Cocina

D19. ¿Qué tipo de cocina utiliza?

- Gas natural
- Eléctrica
- Otras

D20. ¿Utiliza el extractor de humo cuando cocina?

- Sí
- No

Limpieza

D21. ¿Con qué frecuencia se limpia su domicilio?

- Menos de una vez por semana
- Una vez por semana
- Más de una vez por semana

D22. ¿Utiliza alguno de los siguientes productos para la limpieza al menos una vez por semana?

	Si	No	No sabe
Lejía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amoniaco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Salfumán	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spray Madera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Limpiacristales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spray hornos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Perfumes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

D23. ¿Habitualmente realiza usted la limpieza de su domicilio?

- Sí
- No

D24. ¿Les ayuda alguien en la limpieza del domicilio?

- Sí, mucho
- Sí, poco
- Sí, suficiente
- No

D25. ¿Usa guantes cuando lava los platos?

- Sí, siempre
- Ocasionalmente
- Nunca uso guantes
- No, no lavo los platos a mano

5. EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES

E1. Indique cuál de los siguientes productos ha utilizado durante el último año. ¿Con qué frecuencia?

(Señale el producto que utiliza, y **SUBRAYE** 'al día' o 'a la semana' o 'al mes' según si el uso hace referencia al día, semana o mes)

- | | | |
|---|-------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> Colonia | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Lavado de cabello (champú, suavizante) | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Moldeado de cabello (laca, gomina, espuma) | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Lociones para cara (crema hidratante, after-shave) | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Crema hidratante para el cuerpo | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Otro tipo de cremas y lociones para el cuerpo | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Crema hidratante para manos o pies | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Desodorante roll-on | _ _ _ | al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> Desodorante en spray | _ _ _ | al día / semana / mes |

E2. ¿Usa insecticidas o repelentes para mosquitos, cucarachas y/o hormigas?

Si.

↳ E3a. ¿Podría especificar el producto, qué zona del domicilio abarca y la frecuencia de uso?

(Puede señalar más de una opción)

	Dormitorio	Toda la casa	Cuántas veces		
Spray	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _	a	la
semana/mes					
Dispositivo enchufe (Pastilla/líquido)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _	a	la
semana/mes					
Loción repelente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _	a	la
semana/mes					
Otros.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _	a	la
semana/mes					
Otros.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _	a	la
semana/mes					

No

E3. ¿Utiliza el teléfono móvil de forma regular?

- Si
 No

E4. ¿Cuántos minutos de media emite o recibe llamadas? |_|_|_|_|_| al día / a la semana.

(SUBRAYE 'al día' o 'a la semana' según si se refiere al número de minutos al día o a la semana)

E5. ¿Qué modelo de teléfono tiene?

E6. ¿Tiene activada la conexión a internet?

Sí

↳ E7a. ¿Qué tipo de conexión a internet tiene?

- Internet 2G
- Internet 3G
- Internet 4G
- Otro

No dispongo de conexión a internet / No tengo internet activado

E7. ¿Dónde guarda habitualmente el teléfono móvil cuando NO lo usa?

- Bolsillo superior de la chaqueta o camisa
- Bolsillo delantero del pantalón
- Bolsillo trasero del pantalón
- Bolso o mochila

E8. ¿Dónde tiene habitualmente el teléfono móvil cuando lo está utilizando?

- En la mano
- Utilizo auriculares bluetooth / manos libres

↳ E9a. Indique donde lo guarda mientras lo utiliza:

- Bolsillo superior de la chaqueta o camisa
- Bolsillo delantero del pantalón
- Bolsillo trasero del pantalón
- Bolso o mochila

6. ACTIVIDAD FISICA Y TRANSPORTE

Actividad física VIGOROSA Aquel ejercicio que requiere gran esfuerzo, provoca una respiración rápida y un

incremento sustancial de la frecuencia cardíaca. Incluye squash, correr, hacer pesas, natación, ciclismo rápido, deportes de competición.

Actividad física MODERADA Aquel ejercicio que acelera de forma perceptible el ritmo cardíaco. Incluye carpintería, aerobic, jogging, natación (no de competición), básquet, tenis etc.

F1. ¿Cuántas veces por semana realiza actividad física vigorosa?

- Nunca
- |__|__| veces a la semana.

↳ F1a. ¿Cuánto tiempo destina?

- |__|__| minutos al día
- |__|__| horas al día
- No sabe

F2. ¿Cuántas veces por semana realiza actividad física moderada?

- Nunca
- |__|__| veces a la semana.

↳ F2a. ¿Cuánto tiempo destina?

- |__|__| minutos al día
- |__|__| horas al día
- No sabe

F3. ¿Cuánto tiempo dedica a caminar? (*Incluye trabajo y casa, como transporte, deporte o placer*)

- Nunca
- |__|__| veces a la semana.

↳ F3a. ¿Cuánto tiempo destina?

- |__|__| minutos al día
- |__|__| horas al día
- No sabe

F4. ¿Cuánto tiempo dedica a estar sentado en días laborables? (*Incluye en el trabajo, en casa, mirando la TV, leyendo, etc.*)

- _____ minutos al día
- _____ horas al día
- No sabe

F5. ¿Cuánto tiempo pasa en los siguientes sitios? (*Horas / minutos al día*)

	Días laborables	Fin de semana	No sabe
En casa/...../.....	<input type="checkbox"/>
En el trabajo/...../.....	<input type="checkbox"/>
Espacios públicos cerrados (centro comercial...)/...../.....	<input type="checkbox"/>
Al aire libre (parque, calle)/...../.....	<input type="checkbox"/>
Medio de transporte/...../.....	<input type="checkbox"/>

F6. ¿Cuánto tiempo pasa en los distintos medios de transporte al día? (Horas / minutos al día)

	Días laborables	Fin de semana	No sabe	No lo utiliza
A pie/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En bicicleta/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En ciclomotor/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Coche o taxi/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bus o tranvía/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tren o metro/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7. HÁBITOS DIETÉTICOS

G1. ¿Come productos biológicos, ecológicos u orgánicos? Con qué frecuencia?

- Nunca o 1 vez al mes
- 1-3 veces al mes
- 1 vez por semana
- Varias veces por semana
- Cada día

G2. ¿Toma algún suplemento vitamínico de forma regular?

- No
- Vitamina C
- Vitamina E
- β -caroteno
- Complejo multivitamínico. ¿Qué marca?

G3. Por favor especifique la frecuencia de consumo para cada grupo de alimentos:

Alimento		Nunca < 1 mes	1-3 veces al mes	1 vez semana	2-4 veces semana	5-6 veces semana	1 vez al día	2-3 veces al día	4 o más al día
Legumbres (guisantes, garbanzos, lentejas)	1 porción								
Verduras de hoja verde y hoja tipo col (lechuga, brócoli, endivias, espinacas...)	1 porción								
Otras verduras	1 porción								
Carne roja, salchicha, carnes frías, embutidos (puerco, vaca, ternera, cordero, salami)	1 porción								
Carne blanca (pollo, conejo)	1 porción								
Pescado azul (atún, sardina, salmón...)	1 porción								
Otros pescados (bacalao, lenguado, rape...)	1 porción								
Productos lácteos (queso, leche, yogurts...)	1 porción								
Cítricos y frutos del bosque (naranja, limón, Kiwi, fresa, fresón...)	1 pieza o porción								
Otras frutas	1 pieza o porción								
Productos integrales (de grano entero)	1 porción								
Aceite de oliva	1 cucharada								
Nueces o frutos secos (almendras, avellana, cacahuetes, pasas...)	1 porción								
Zumos (envasados y naturales)	1 vaso								

Comida enlatada	1 lata								
Bebidas y soda enlatada	1 lata								
Vino tinto	1 copa								

FIN DEL CUESTIONARIO

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN EN ESTE ESTUDIO

BIBLIOGRAPHIE

1. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Who.int. Publié 2022. Consulté 6 septembre 2022.
<https://icd.who.int/browse11/lm/en#/http://id.who.int/icd/entity/1237004558>
2. ART fact sheet. Archive.org. Publié 2013. Consulté 6 septembre 2022.
<https://web.archive.org/web/20160304060954/https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>
3. Sharma M, Kumar A. The Sperm. Basics of Human Andrology. Publié en ligne 2017:171-204. doi:10.1007/978-981-10-3695-8_12
4. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1546):1663-1678. doi:10.1098/rstb.2010.0026
5. Creasy DM, Chapin RE. Fundamentals of Toxicologic Pathology (third ed.), Chapter 17 - Male Reproductive System. pp. 459-516. Bolon B. Academic Press. Publié en 2018. Consulté le 7 novembre 2022. doi:10.1016/B978-0-12-809841-7.00017-4
6. Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. Int J Androl. 2011;34(4 Pt 2):e296-e305. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01199.x
7. de Kretser DM, Loveland K, O'Bryan M. Spermatogenesis. In J. L. Jameson, L. J. De Groot, D. M. de Kretser, L. C. Giudice, A. B. Grossman, S. Melmed, J. T. Potts Jr., & G. C. Weir (Eds.). Endocrinology: Adult and Pediatric . 7th ed., Vol. 2, pp. 2325-2353.e9. Elsevier. Publié 2016 Consulté le 7 novembre 2022.
<https://doi.org/10.1016/B978-0->
8. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. Int J Gen Med. 2020;13:29-41. Publié 2020 Feb 5. doi:10.2147/IJGM.S241099
9. Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. Spermatogenesis. 2011;1(2):95-98. doi:10.4161/spmg.1.2.16820

10. Castillo J, Estanyol JM, Ballescá JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl.* 2015;17(4):601-609. doi:10.4103/1008-682X.153302
11. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007;8(9):227. doi:10.1186/gb-2007-8-9-227
12. Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, et al. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biol Reprod.* 2013;89(3):60. Publié 2013 Sep 19. doi:10.1095/biolreprod.113.111682
13. O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis.* 2015;4(2):e979623. Publié 2015 Jan 26. doi:10.4161/21565562.2014.979623
14. Dalia K, Ali K, Ghina G. The Developmental Process of Spermatogenesis. *J Androl Gynaecol.* 2019;7(1):3.
15. Bergmann M. Physiology of Spermatogenesis. Dans Schill, WB., Comhaire, F., Hargreave, T.B. (eds) *Andrology for the Clinician.* 2006. doi:10.1007/3-540-33713-x_58
16. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;59:10-26. doi:10.1016/j.semcd.2016.04.009
17. Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction.* 2013;147(2):R27-R42. doi:10.1530/REP-13-0420
18. Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:453-475. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153258
19. Zhou W, De Iuliis GN, Dun MD, Nixon B. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:59. Publié 2018 Feb 28. doi:10.3389/fendo.2018.00059
20. James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian

- Reproduction. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5377. Publié 2020 Jul 29. doi:10.3390/ijms21155377
21. Björkgren I, Sipilä P. The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction.* 2019;158(5):R155-R167. doi:10.1530/REP-18-0589
 22. Toshimori K. Biologie de la maturation des spermatozoïdes : un aperçu avec une introduction à ce numéro. *Microsc Res Tech* 2003;61(1):1–6.
 23. Wu H, Hauser R, Krawetz SA, Pilsner JR. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. *Current Environmental Health Reports.* 2015;2(4):356-366. doi:10.1007/s40572-015-0067-7
 24. Yu B, Qi Y, Liu D, et al. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertility and Sterility.* 2014;101(1):51-57.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.09.001
 25. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2008;109(3-5):323-330. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.03.004
 26. Munkelwitz R, Gilbert BR. Are boxer shorts really better? A critical analysis of the role of underwear type in male subfertility. *J Urol.* 1998;160(4):1329-1333.
 27. Sengul G, Ertekin C. Human cremaster muscle and cremasteric reflex: A comprehensive review. *Clinical Neurophysiology.* 2020;131(6):1354-1364. doi:10.1016/j.clinph.2020.03.011
 28. Nanayakkara SDI, Gihan MC, Nanayakkara PSK. A review of scrotal temperature regulation and its importance for male fertility. *Sri Lanka Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2021;43(4):308. doi:10.4038/sljog.v43i4.7982
 29. Gallup GG. On the Origin of Descended Scrotal Testicles: The Activation Hypothesis. *Evolutionary Psychology.* 2009;7(4), 517–526. doi/10.1177/147470490900700402
 30. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive BioMedicine En ligne.* 2015;30(1):14-27. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.018

31. Dimitriadis, F., Adonakis, G., Kaponis, A., Mamoulakis, C., Takenaka, A., Sofikitis, N. (2017). Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility. In: Simoni, M., Huhtaniemi, I. (eds) Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Endocrinology. 2017. doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3_33
32. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. Publié 2010. Consulté le 2 juillet 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
33. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000;21(1):145-153.
34. Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, et al. Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. *Fertil Steril.* 2014;101(2):453-462. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.022
35. Slama R, Eustache F, Ducot B, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17(2):503-515. doi:10.1093/humrep/17.2.503
36. Nelson CM, Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril.* 1974;25(6):503-507. doi:10.1016/s0015-0282(16)40454-1
37. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol.* 1951;66(3):436-449. doi:10.1016/s0022-5347(17)74358-3
38. Gold RZ, MacLeod J. The male factor in fertility and infertility. VIII. A study of variation in semen quality. *Fertil Steril.* 1956;7(5):387-410. doi:10.1016/s0015-0282(16)32460-8
39. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305(6854):609-613. doi:10.1136/bmj.305.6854.609
40. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281-285. doi:10.1056/NEJM199502023320501

41. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):646- 659. doi:10.1093/humupd/dmx022
42. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl*. 2010;12(1):47-58. doi:10.1038/aja.2009.14
43. World Health Organization. WHO laboratory manual for human semen and sperm cervical mucus interaction, 4th ed. World Health Organization. Publié 1999. Consulté le 2 juillet 2022.
<https://www.aab.org/images/WHO%204th%20manual.pdf>
44. World Health Organization . WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. WHO Press; Geneva, Switzerland. Publié 2021. Consulté le 2 juillet 2022.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
45. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril*. 1996;65(5):1009-1014. doi:10.1016/s0015-0282(16)58278-8
46. Pacey AA. Are sperm counts declining? Or did we just change our spectacles? *Asian J Androl*. 2013;15(2):187-190. doi:10.1038/aja.2012.165
47. Smith K.D and Steinberger E. What is oligozoospermia? In Troen P. and Nankin H.R. (eds), *The Testis in Normal and Infertile Men*. Raven Press, New York, 1977 ; 489- 503.
48. Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertil Steril*. 1996;65(5):1044-1046. doi:10.1016/s0015-0282(16)58284-3
49. Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. *Fédération Française des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod*. 1997;12(4):740-745. doi:10.1093/humrep/12.4.740

50. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod.* 2001;16(5):1012-1019.
doi:10.1093/humrep/16.5.1012
51. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2003;111(4):414-420.
doi:10.1289/ehp.5927
52. Palani A, Sengupta P, Agarwal A, Henkel R. Geographical differences in semen characteristics: Comparing semen parameters of infertile men of the United States and Iraq. *Andrologia.* 2020;52(3):e13519. doi:10.1111/and.13519
53. Feferkorn I, Azani L, Kadour-Peero E, et al. Geographic variation in semen parameters from data used for the World Health Organization semen analysis reference ranges [Publié online avant impression, 2022 Jun 22]. *Fertil Steril.* 2022;S0015-0282(22)00376-4. doi:10.1016/j.fertnstert.2022.05.037
54. Gilpin A. *Dictionary of Environment and Sustainable Development.* Wiley. Publié 1996. Consulté le 9 septembre 2022. <https://www.wiley.com/enus/Dictionary+of+Environmental+and+Sustainable+Development-p-9780471962205>
55. Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):360-365. doi:10.1289/ehp.8232
56. Guven A, Kayikci A, Cam K, Arbak P, Balbay O, Cam M. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia.* 2008;40(6):346-351.
doi:10.1111/j.1439-0272.2008.00867.x
57. Hauser R, Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertility and Sterility.* 2008;89(2):e59-e65. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.033
58. Gallo A. Reprotoxic Impact of Environment, Diet, and Behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022;19(3):1303.
doi:10.3390/ijerph19031303

59. Talbi A, Kerchich Y, Kerbachi R, Boughedaoui M. Assessment of annual air pollution levels with PM1, PM2.5, PM10 and associated heavy metals in Algiers, Algeria. *Environ Pollut.* 2018;232:252-263. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.041
60. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Outdoor Air Pollution. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2016;109:9-444.
61. Marco G, Bo X. Air Quality Legislation and Standards in the European Union: Background, Status and Public Participation. *Advances in Climate Change Research.* 2013;4(1):50-59. doi:10.3724/sp.j.1248.2013.050
62. Revision EU ambient air quality legislation. *Environment.* Publié October 26, 2022. Consulté December 8, 2022.
https://environment.ec.europa.eu/publications/revision-eu-ambient-air-quality-legislation_en
63. World Health Organization. WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. World Health Organization. Publié 20 septembre 2021. Consulté 9 septembre 2022. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345329/9789240034228-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
64. Wolf K, Hoffmann B, Andersen ZJ, et al. Long-term exposure to low-level ambient air pollution and incidence of stroke and coronary heart disease: a pooled analysis of six European cohorts within the ELAPSE project. *Lancet Planet Health.* 2021;5(9):e620- e632. doi:10.1016/S2542-5196(21)00195-9
65. Fino A. Air Quality Legislation. *Encyclopedia of Environmental Health.* 2018. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.11045-0
66. Morakinyo OM, Mokgobu MI, Mukhola MS, Hunter RP. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6):592. doi:10.3390/ijerph13060592
67. Durant JL, Beelen R, Eeftens M, et al. Comparison of ambient airborne PM2.5 PM2.5 absorbance and nitrogen dioxide ratios measured in 1999 and 2009 in three areas in Europe. *Sci Total Environ.* 2014;487:290-298. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.019

68. Han B, Hu LW, Bai Z. Human Exposure Assessment for Air Pollution. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1017:27-57. doi:10.1007/978-981-10-5657-4_3
69. Castillo F. Distribución Espacial: Interpolación Espacial.; 2013. Consulté 20 septembre 2022.
<https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/29116/1/presentaD2.pdf>
70. Ryan PH, LeMasters GK. A review of land-use regression models for characterizing intraurban air pollution exposure. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1(Suppl 1):127-133. doi:10.1080/08958370701495998).
71. Sanchez M, Ambros A, Milà C, et al. Development of land-use regression models for fine particles and black carbon in peri-urban South India. *Sci Total Environ.* 2018;634:77-86. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.308)
72. Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss SH, Genc K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J Toxicol.* 2012;2012:782462. doi: 10.1155/2012/782462. Epub 2012 Feb 19. PMID: 22523490; PMCID: PMC3317189.
73. Lertxundi A, Andiarena A, Martínez MD, et al. Prenatal exposure to PM_{2.5} and NO₂ and sex-dependent infant cognitive and motor development. *Environ Res.* 2019;174:114-121. doi:10.1016/j.envres.2019.04.001
74. Khomenko S, Cirach M, Pereira-Barboza E, et al. Premature mortality due to air pollution in European cities: a health impact assessment. *The Lancet Planetary Health.* 2021;5(3):e121-e134. doi:10.1016/s2542-5196(20)30272-2
75. Traversi D. Mutagenicity of PM_{2.5}. *Encyclopedia of Environmental Health.* 2019:497-504. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10938-8
76. Chen J, Hoek G. Long-term exposure to PM and all-cause and cause-specific mortality: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int.* 2020;143:105974. doi:10.1016/j.envint.2020.105974
77. Rouadi PW, Idriss SA, Naclerio RM, et al. Immunopathological features of air pollution and its impact on inflammatory airway diseases (IAD). *World Allergy Organization Journal.* 2020;13(10):100467. doi:10.1016/j.waojou.2020.100467
78. Iwasaki N, Terawaki S, Shimizu K, et al. Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling. Olszewski MA, ed. *PLOS ONE.* 2021;16(3):e0248158. doi:10.1371/journal.pone.0248158

79. Glencross DA, Ho TR, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med.* 2020;151:56-68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179
80. Helmin KA, Morales-Nebreda L, Acosta MAT, et al. Maintenance DNA methylation is essential for regulatory T cell development and stability of suppressive function. *Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(12):6571-6587. doi:10.1172/jci137712
81. Ziegler K, Kunert AT, Reinmuth-Selzle K, et al. Chemical modification of pro-inflammatory proteins by peroxynitrite increases activation of TLR4 and NF-κB: Implications for the health effects of air pollution and oxidative stress. *Redox Biology.* 2020;37:101581. doi:10.1016/j.redox.2020.101581
82. Mehta M, Chen LC, Gordon T, Rom W, Tang M. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2008;657(2):116-121. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.08.015
83. Zhang J, Cai Z, Ma C, Xiong J, Li H. Impacts of Outdoor Air Pollution on Human Semen Quality: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2020;2020:7528901. Publié 2020 Apr 28. doi:10.1155/2020/7528901
84. Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000;108(9):887-894. doi:10.1289/ehp.00108887
85. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction.* 2005;20(10):2776-2783. doi:10.1093/humrep/dei122
86. Bosco L, Notari T, Ruvolo G, et al. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;58:243-249. doi:10.1016/j.etap.2018.02.001
87. Wang X, Tian X, Ye B, et al. Gaseous pollutant exposure affects semen quality in central China: a cross-sectional study. *Andrology.* 2020;8(1):117-124. doi:10.1111/andr.12655

88. Wu W, Chen Y, Cheng Y, et al. Association between ambient particulate matter exposure and semen quality in fertile men. *Environ Health*. 2022;21(1):16. Publié 2022 Jan 16. doi:10.1186/s12940-022-00831-5
89. Somers CM. Ambient air pollution exposure and damage to male gametes: human studies and in situ 'sentinel' animal experiments. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1-2):63- 80. doi:10.3109/19396368.2010.500440
90. Krzastek SC, Farhi J, Gray M, Smith RP. Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Transl Androl Urol*. 2020;9(6):2797-2813. doi:10.21037/tau-20- 685
91. Bulletin de l'OMM – Température moyenne mondiale : probabilité de 50 % d'un dépassement du seuil de 1,5 °C au cours des cinq prochaines années. Organisation météorologique mondiale. Publié 9 mai 2022. Consulté 9 septembre 2022. <https://public.wmo.int/fr/medias/communiqu%C3%A9s-de-presse/bulletin-del%E2%80%99omm-%E2%80%93-temp%C3%A9rature-moyenne-mondialeprobabilit%C3%A9-de-50-d%E2%80%99un>
92. Chan EY, Goggins WB, Yue JS, Lee P. Hospital admissions as a function of temperature, other weather phenomena and pollution levels in an urban setting in China. *Bull World Health Organ*. 2013;91(8):576-584. doi:10.2471/BLT.12.113035
93. Ivell R (2007) Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol* 5:15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-15>
94. Hamilton TR, Mendes CM, de Castro LS, et al. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1687657. doi:10.1155/2016/1687657
95. Fisch H, Andrews HF, Fisch KS, Golden R, Liberson G, Olsson CA. The relationship of long-term global temperature change and human fertility. *Medical Hypotheses*. 2003;61(1):21-28. doi:10.1016/s0306-9877(03)00061-6
96. Levine RJ, Mathew RM, Chenault CB, et al. Differences in the Quality of Semen in Outdoor Workers during Summer and Winter. *New England Journal of Medicine*. 1990;323(1):12-16. doi:10.1056/nejm199007053230103

97. Gyllenborg, Skakkebaek, Nielsen, Keiding, Giwercman. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *International Journal of Andrology*. 1999;22(1):28-36. doi:10.1046/j.1365-2605.1999.00137.x
98. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*. 2001;16(5):1012-1019. doi:10.1093/humrep/16.5.1012
99. De Giorgi A, Volpi R, Tiseo R, Pala M, Manfredini R, Fabbian F. Seasonal variation of human semen parameters: A retrospective study in Italy. *Chronobiol Int*. 2015;32(5):711-716. doi:10.3109/07420528.2015.1024315
100. Tang WH, Deng CY, Gao JM, et al. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2022;54(4):658-662. doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2022.04.01
101. Sharqawi M, Hantisteanu S, Bilgory A, et al. The Impact of Lifestyle on Sperm Function, Telomere Length, and IVF Outcomes. *American Journal of Men's Health*. 2022;16(5):155798832211199. doi:10.1177/15579883221119931
102. Huang G, Zhang Q, Wu H, et al. Sperm quality and ambient air pollution exposure: A retrospective, cohort study in a Southern province of China. *Environ Res*. 2020;188:109756. doi:10.1016/j.envres.2020.109756
103. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016;169:56-75. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.01.017
104. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility*. 2000;73(1):43-50. doi:10.1016/s0015-0282(99)00462-8
105. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007;22(1):174-179. doi:10.1093/humrep/del326
106. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a

- case–control study. *Int J Androl*. 2010;33(1):e221–e7. doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x
107. Lu R, Chen X, Yu W, et al. Analysis of age-associated alternation of SCSA sperm DNA fragmentation index and semen characteristics of 1790 subfertile males in China. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020;34(12). doi:10.1002/jcla.23548
 108. Zhang F, Li J, Liang Z, et al. Sperm DNA fragmentation and male fertility: a retrospective study of 5114 men attending a reproductive center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(5):1133-1141. doi:10.1007/s10815-021-02120-5
 109. Yang T, Deng L, Sun B, et al. Semen quality and windows of susceptibility: A case study during COVID-19 outbreak in China. *Environ Res*. 2021;197:111085. doi:10.1016/j.envres.2021.111085
 110. Beelen R, Hoek G, Vienneau D, et al. Development of NO₂ and NO_x land use regression models for estimating air pollution exposure in 36 study areas in Europe – The ESCAPE project. *Atmospheric Environment*. 2013;72:10-23. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.02.037
 111. Cyrus J, Eeftens M, Heinrich J, et al. Variation of NO₂ and NO_x concentrations between and within 36 European study areas: Results from the ESCAPE study. *Atmospheric Environment*. 2012;62:374-390. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.080
 112. Eeftens M, Beelen R, de Hoogh K, et al. Development of Land Use Regression models for PM_{2.5}, PM_{2.5} absorbance, PM₁₀ and PM_{coarse} in 20 European study areas; results of the ESCAPE project. *Environ Sci Technol*. 2012;46(20):11195-11205. doi:10.1021/es301948k
 113. Conceptos clave. *Medio Ambiente y Sostenibilidad*. Publié 2019. Consulté Novembre 17, 2022.
https://mediambient.gencat.cat/es/05_ambits_dactuacio/atmosfera/qualitat_de_laire/avaluacio/xarxa_de_vigilancia_i_previsio_de_la_contaminacio_atmosferica_xvpc/ca/conceptes_clau/
 114. Ma Y, Zhang J, Cai G, et al. Inverse association between ambient particulate matter and semen quality in Central China: Evidence from a prospective cohort

- study of 15,112 participants. *Sci Total Environ.* 2022;833:155252. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155252
115. Yu X, Wang Q, Wei J, et al. Impacts of traffic-related particulate matter pollution on semen quality: A retrospective cohort study relying on the random forest model in a megacity of South China. *Science of The Total Environment.* 2022;851:158387. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158387
116. Wu H, Yu X, Wang Q, et al. Beyond the mean: Quantile regression to differentiate the distributional effects of ambient PM2.5 constituents on sperm quality among men. *Chemosphere.* 2021;285:131496. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131496
117. Wang X, Tian X, Ye B, et al. Gaseous pollutant exposure affects semen quality in central China: a cross-sectional study. *Andrology.* 2019;8(1):117-124. doi:10.1111/andr.12655
118. Huang LP, Lee CC, Hsu PC, Shih TS. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertility and Sterility.*
119. Sun S, Zhao J, Cao W, Lu W, Zheng T, Zeng Q. Identifying critical exposure windows for ambient air pollution and semen quality in Chinese men. *Environ Res.* 2020;189:109894. doi:10.1016/j.envres.2020.109894.
120. Zhao Y, Zhu Q, Lin J, Cai J. Association of exposure to particulate matter air pollution with semen quality among men in China. *JAMA Network Open.* 2022;5(2):e2148684. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.48684
121. Guan Q, Chen S, Wang B, et al. Effects of particulate matter exposure on semen quality: A retrospective cohort study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;193:110319. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110319
122. Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut.* 2014;187:145-152. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.030
123. Belladelli F, Corsini C, Pozzi E, et al. Does Air Pollution Impact on Semen Parameters? Findings from a Real-Life, Cross-Sectional Study in Italian Infertile Men. *World J Mens Health.* 2022;10.5534/wjmh.210240. doi:10.5534/wjmh.210240

124. Chang HC, Chen Y, Liao CH, Chiang BJ, Chang YK. The impact of the fine ambient particle on infertile male's sperm quality. *Urological Science*. 2019;30(4):177. doi:10.4103/uros.uros_6_19
125. Huang J, Liu Q, Guo X. Short-Term Effects of Particulate Air Pollution on Human Health. *Encyclopedia of Environmental Health*. Publié online 2019:655-662. . Consulté Novembre 17, 2022. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10991-1
126. Lao XQ, Zhang Z, Lau AKH, et al. Exposure to ambient fine particulate matter and semen quality in Taiwan. *Occupational and Environmental Medicine*. 2017;75(2):148- 154. doi:10.1136/oemed-2017-104529
127. Tomei G, Tomao E, Ciarrocca M, et al. Follicle-stimulating hormone levels in male workers exposed to urban chemical, physical, and psychosocial stressors. *Toxicol Ind Health*. 2009;25(6):395-402. doi:10.1177/0748233709106466

Titre : Facteurs environnementaux et qualité séminale

Mots clés : Qualité séminale, Pollution de l'air, Fertilité masculine, Température ambiante,

Analyse de sperme

Résumé : Actuellement les problèmes de fertilité touchent jusqu'à 15% de la population en âge de procréer dans les pays occidentaux et la qualité séminale a diminué ces dernières années. L'augmentation des problèmes d'infertilité masculine suggère un rôle important des facteurs environnementaux. L'objectif principal de cette thèse doctorale est d'évaluer s'il existe une association entre certains facteurs environnementaux et la qualité séminale. Dans un premier temps nous avons évalué les effets de l'exposition aux NO₂, NO_x, et aux matières particulaires, pour différentes fenêtres d'exposition sur la qualité séminale dans une cohorte d'hommes issus de couples ayant consulté un centre de Procréation Médicalement Assistée entre 2014 et 2018 à Barcelone.

Les résultats de cette analyse ont montré une diminution de la motilité progressive associée à l'exposition aux PM₁₀, une diminution du volume séminale et une augmentation de la fragmentation de l'ADN associée à l'exposition aux PM_{2.5}.

Dans une deuxième étude, l'objectif consistait à évaluer les effets de la température ambiante sur la qualité séminale d'individus sains de moins de 30 ans, qui se sont présentés volontairement dans un centre de procréation médicalement assistée comme candidats au don de sperme entre les 2007 et 2012. Nos résultats montrent que l'augmentation de la température ambiante était significativement associée à une diminution de la concentration spermatique et de la motilité progressive. Ces résultats encouragent l'élaboration de stratégies de contrôle des facteurs environnementaux en vue de promouvoir une meilleure Santé reproductive masculine.

Title : Environmental factors and seminal quality

Keywords : Seminal quality, Air pollution, Male fertility, Ambient temperature, Semen analysis

Abstract : Currently fertility problems affect up to 15% of the population of reproductive age in Western countries and seminal quality has declined in recent years. Male infertility problems have increased in the last decades, suggesting an important role of environmental factors. The main objective of this doctoral thesis is to assess whether there is an association between several environmental factors and seminal quality. First, we evaluated the effects of exposure to NO₂, NO_x, and particulate matter, for different exposure windows on seminal quality in a cohort of men from couples who consulted a center for Assisted Reproduction between 2014 and 2018 in Barcelona.

The results of this analysis showed a decrease in progressive motility associated with PM₁₀ exposure, a decrease in seminal volume and an increase in DNA fragmentation associated with PM_{2.5} exposure. In a second study, the objective was to assess the effects of ambient temperature on the seminal quality of healthy individuals under the age of 30, who attended a medically assisted procreation center as candidates for sperm donation between 2007 and 2012. Our results show that the increase in ambient temperature was significantly associated with a decrease in sperm concentration and progressive motility. These results encourage the development of strategies to control environmental factors in order to promote a better quality of male reproductive health.