

BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION Spermogramme

Le spermogramme : un outil de choix dans l'exploration de l'infertilité masculine et du couple

F. BOITRELLE^{1,2}, P. CLEMENT³

RÉSUMÉ

Le spermogramme est l'examen de première intention dans le bilan de l'homme infertile. Soumis à des variabilités pour un même individu, le spermogramme est difficile à interpréter et nécessite d'être répété en cas d'anomalie. De plus, depuis une dizaine d'années, les valeurs de référence des différents paramètres spermatiques ne cessent d'être revues à la baisse. Ces normes offrent un cadre d'interprétation pour chacun des paramètres étudiés, mais il faut intégrer l'ensemble de ces paramètres pour interpréter un spermogramme et, le cas échéant, proposer des examens complémentaires.

MOTS-CLÉS : spermogramme, infertilité masculine, spermocytogramme.

I. - INTRODUCTION

L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) est une discipline médicale qui tente de diagnostiquer et de remédier à l'infertilité des couples, en utilisant dans certains cas des spermatozoïdes physiologiquement non féconds. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'infertilité d'un couple dont la femme est en âge de procréer (18-45 ans) comme « l'incapacité à concevoir ou à obtenir une grossesse au-delà d'un délai de 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés » (1).

À travers le monde, l'infertilité toucherait des dizaines de millions de personnes, soit 10 à 15 % des couples (2-4). Depuis plusieurs années, la part de l'homme dans les infertilités du couple est en augmentation, et on estime aujourd'hui qu'un facteur causal masculin (identifié ou non) est impliqué dans la moitié des cas (2, 5-6). Pour évaluer la fertilité et l'infertilité masculines, le spermogramme s'avère être un très bon examen de base permettant de poser des diagnostics (en cas d'azoospermie par exemple), mais aussi d'orienter le prescripteur vers des examens complémentaires.

II. - LE SPERME ET LES CONDITIONS PRÉANALYTIQUES DU SPERMOGRAMME

Le sperme est un mélange de sécrétions qui est constitué de liquide séminal, de spermatozoïdes et de cellules rondes issues de la lignée germinale ou sanguine.

Le spermogramme analyse ces différents constituants. C'est un examen non automatisé soumis à une variabilité inter-opérateurs. L'accréditation des laboratoires doit nous permettre de réduire cette variabilité au maximum. Pour conduire à une standardisation du spermogramme, l'OMS a édité dès 1980, un manuel de laboratoire pour l'analyse du sperme humain. Aujourd'hui, en 2014, le spermogramme et le spermocytogramme sont des techniques rigoureusement encadrées par la cinquième édition de ce

¹ Service d'Histologie Embryologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy Saint-Germain-en-Laye, 78300 Poissy.

² EA 2493, Université de Versailles, Saint-Quentin-en-Yvelines, 78000 Versailles.

³ Laboratoire Clément, 93150 Le Blanc-Mesnil.

Tableau - Les seuils de normalité des différents paramètres spermatiques et les pathologies spermatiques qui y sont associées. D'après (7).

Paramètres	Normes OMS 2009	Valeurs anormales	Pathologies
Volume	≥ 1,5 ml et < 6 ml	0 ml < 1,5 ml > 6 ml	Aspermie Hypospermie Hyperspermie
pH	7,2 – 7,4	Acide, basique	
Viscosité	Liquéfaction en 30 min	Augmentée, diminuée	
Numération spermatique	≥ 15 millions/ml ≥ 39 millions par éjaculat	> 200 millions/ml < 15 millions/ml < 5 millions/ml < 1 million/ml Absence de spermatozoïde à l'examen direct, présence après centrifugation Absence de spermatozoïde	Polyzoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie sévère Oligozoospermie extrême Cryptozoospermie Azoospermie
Mobilité à 1 heure	≥ 40 % de a+b+c ≥ 32 % de a+b	a+b+c < 40 % et/ou a+b < 32 %	Asthénozoospermie
Vitalité	≥ 58 %	< 58 %	Nécrozoospermie
Leucocytes	< 1 million leucocytes/ml	≥ 1 million/ml	Leucospermie
Agglutinats	Absence	Présence	
Formes typiques	> 4 %	< 4 %	Tératozoospermie
Autres	Absence de sang	Présence de sang	Hémospémie

Mobilité : a = spermatozoïdes « progressifs rapides » ; b = spermatozoïdes « progressifs lents » ; c = spermatozoïdes « mobiles sur place ».

manuel (7), qui définit les moyens d'étude des paramètres spermatiques, les modes de réalisation, les résultats attendus et les normes, ainsi que les coefficients de variations attendus pour chaque technique (Tableau). De plus, les exigences imposées par l'accréditation et la norme NF EN ISO 15189 devraient conduire la grande majorité des laboratoires à améliorer la standardisation des résultats rendus lors du spermogramme.

Il est important de rappeler que les paramètres spermatiques sont variables pour un même individu d'un prélèvement à l'autre. Ainsi, un spermogramme anormal doit être répété à distance du premier examen. Un intervalle de trois mois, correspondant à un cycle complet de spermatogenèse, permettra alors de confirmer ou d'infirmer les anomalies retrouvées.

De plus, pour pouvoir réaliser et interpréter un spermogramme, les conditions préanalytiques doivent être maîtrisées. Le patient doit avoir un délai d'abstinence sexuelle compris entre 2 à 8 jours, et le recueil doit être effectué au laboratoire. Les paramètres spermatiques sont en effet soumis à de nombreux facteurs de variation pour un individu donné, dont certains sont incontournables pour l'interprétation des résultats. Ainsi, l'interrogatoire notera l'âge, le délai d'abstinence sexuelle et recherchera

la notion d'une maladie intercurrente, d'un épisode de fièvre récent, ou encore par exemple, de la prise d'un traitement antibiotique récent. Le prélèvement à domicile doit rester exceptionnel, non seulement parce qu'un délai d'acheminement trop long au laboratoire peut perturber la mobilité spermatique, mais surtout parce que si une prise en charge en AMP est envisagée, le prélèvement devra impérativement être effectué par masturbation au laboratoire, pour des raisons légales. Un délai d'abstinence sexuelle compris entre 2 et 8 jours doit être respecté. En deçà de 2 jours, le volume de l'éjaculat et la numération spermatique peuvent être diminués et au-delà de 8 jours, les spermatozoïdes piégés dans l'épididyme meurent, ou présentent des altérations de leur mobilité et de leur morphologie, notamment flagellaire, compromettant leur aptitude à féconder. La date de naissance du patient, et donc son âge, sont aussi à prendre en compte, le volume de l'éjaculat comme le nombre total de spermatozoïdes éjaculés tendant à diminuer avec l'âge.

Après le recueil de tous ces éléments à l'interrogatoire, le patient pourra effectuer son prélèvement. Au laboratoire, après vidange de la vessie, le patient se lave les mains, fait une toilette intime avec une solution antiseptique et rince soigneusement à l'eau, puis effectue le recueil par masturbation, dans un récipient évasé.

III. - LE SPERMOGRAMME : UN EXAMEN DE BASE

Le spermogramme comprend différentes analyses détaillées ci-dessous.

A) Évaluation du volume de l'éjaculat, de la viscosité et du pH

1) Le volume de l'éjaculat

Dans la demi-heure suivant le recueil, le volume de l'éjaculat est calculé à partir de son poids (7), en admettant que la densité du sperme est en moyenne de 1 g/ml, même si elle peut varier de 1,043 à 1,102 g/ml (pour revue (7)). Certains laboratoires continuent d'évaluer ce volume à la pipette graduée, mais cette méthodologie sous-estimerait le volume par perte de 0,3 à 0,9 ml dans la pipette d'aspiration (pour revue (7)). Ainsi, avec l'accréditation, de nombreux laboratoires opteront peu à peu pour une mesure calculée du volume de l'éjaculat à partir de la mesure de son poids.

De la mesure de l'éjaculat peuvent découler plusieurs situations pathologiques.

L'absence d'éjaculat, ou aspermie, peut correspondre à :

- une anéjaculation sans sensation orgasmique ;
- une éjaculation rétrograde totale avec sensation orgasmique.

Devant des antécédents évocateurs d'éjaculation rétrograde totale (diabète, prise médicamenteuse, atteinte neurologique, antécédents de chirurgie urétrale...), une recherche de spermatozoïdes dans les urines après leur alcalinisation, s'impose. L'alcalinisation des urines peut se réaliser en demandant au patient de boire deux litres d'eau alcaline (eau de Vichy) la veille du prélèvement (ou au moins dans les 2 heures précédant le prélèvement).

L'hypospermie, définie par un volume de l'éjaculat inférieur à 1,5 ml, peut s'expliquer par :

- une perte de recueil dont il faut préciser le moment ;
- un délai d'abstinence trop court ;
- une éjaculation rétrograde partielle ;
- un hypogonadisme ;
- une agénésie unilatérale ou bilatérale partielle ou totale des canaux déférents, des anomalies de sécrétion des glandes annexes ou des voies génitales masculines ;
- une inflammation ou une infection des glandes annexes masculines (IGAM), notamment des vésicules séminales et de la prostate.

Notons qu'un recueil incomplet risque de poser problème dans l'interprétation des résultats, puisque les spermatozoïdes sont principalement concentrés dans les premières fractions de l'éjaculat avec les sécrétions prostatiques.

Si elle se répète, l'hypospermie doit conduire à réaliser des examens complémentaires. Dans le cadre d'une hypospermie associée à une azoospermie, sera prescrit un bilan

clinique et paraclinique comprenant des dosages hormonaux, des examens d'imagerie uro-génitale et une biochimie séminale (dont les résultats peuvent conduire à rechercher des mutations du gène CFTR devant une agénésie des canaux déférents). Si on suspecte une IGAM, un interrogatoire minutieux, la recherche d'une leucospermie associée et la réalisation d'une spermoculture et d'une échographie des voies uro-génitales, seront alors utiles au diagnostic.

L'hyperspermie, définie par un volume de l'éjaculat supérieur à 6 ml, peut être liée à la réalisation d'un double éjaculat par le patient, et il faut donc bien interroger le patient avant et parfois après le recueil. Tout comme l'hypospermie, elle peut aussi être signe d'une inflammation ou d'une infection des glandes annexes. Enfin, elle peut également être idiopathique.

2) La viscosité

La viscosité du sperme s'évalue par observation de l'écoulement du sperme d'une pipette (« soumise à la gravité »). Elle est dite augmentée si le sperme ne se liquéfie pas dans la demi-heure suivant le recueil, si le sperme n'est pas « aspirable » dans la pipette ou s'écoule par goutte de plus de 2 cm de long (7). Cette hyperviscosité est à noter, car elle peut gêner la correcte évaluation de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes.

3) Le pH

Le pH du sperme est mesuré après liquéfaction, à l'aide de bandelettes pH (6-10). Un pH acide orientera vers un défaut du fonctionnement des vésicules séminales (défaut de fructose), alors qu'un pH basique orientera plutôt vers une insuffisance prostatique ou une infection.

B) Évaluation de la mobilité spermatique et de la présence d'agglutinats

La mobilité spermatique doit être évaluée après liquéfaction et idéalement dans l'heure suivant l'éjaculation. Elle est évaluée par l'observation microscopique d'une goutte de 10 µl de sperme entre lame et lamelle, soit à température ambiante, soit à 37 °C au grossissement x200 ou x400.

Les spermatozoïdes peuvent avoir une mobilité progressive (spermatozoïdes « progressifs rapides » (de type a) et « progressifs lents » (de type b)), une mobilité non progressive (spermatozoïdes « mobiles sur place » (de type c)), ou être immobiles (de type d). Notons que la dernière version du manuel de l'OMS regroupe les mobilités de type a et b.

Parce que la lecture de la mobilité est opérateur-dépendant, des systèmes de lecture automatisée (système CASA, pour *Computer Aided Sperm Analysis*) se sont développés. Ils permettent de voir des anomalies du mouvement non visibles à l'œil et une standardisation de la lecture, mais ces systèmes sont pris en défaut si des débris cellulaires sont présents dans le sperme ou si la numération spermatique est trop faible ou trop élevée.

L'asthénospermie est définie par une mobilité totale inférieure à 40 % et une mobilité progressive inférieure à 32 %. L'asthénospermie secondaire est une asthénospermie ne survenant qu'à la 4^{ème} heure suivant le recueil, cet élément rappelant qu'un spermatozoïde n'est physiologiquement pas censé survivre dans le liquide séminal. L'akinetospermie est l'absence totale de mobilité spermatique.

Les différentes causes d'asthénospermie sont les suivantes :

- observation trop tardive du sperme (recueil à domicile) ou sur une lame froide ;
- délai d'abstinence trop long ;
- viscosité spermatique augmentée ;
- présence de germes (spermoculture positive) ;
- présence d'agglutinats (rechercher la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes par le MAR-test (*Mixed Antiglobulin Reaction - test*)) ;
- nécrospermie (un spermatozoïde mort ne bouge pas !) ;
- dyskinésie flagellaire.

Dans tous les cas, l'asthénospermie doit être corrélée à la vitalité spermatique. L'évaluation de la vitalité spermatique présente d'autant plus d'intérêt que la mobilité est altérée ; en effet, un spermatozoïde mobile est obligatoirement vivant, il faut alors déterminer si les spermatozoïdes immobiles le sont.

Enfin, l'examen microscopique peut aussi mentionner la présence d'agrégats ou d'agglutinats. Il s'agit là de deux phénomènes bien distincts. L'agrégation concerne un grand nombre de spermatozoïdes qui sont immobiles et qui s'agrègent « naturellement » entre eux, sur des débris cellulaires ou des cellules épithéliales. L'agglutination consiste elle, en l'accrochage de quelques spermatozoïdes mobiles les uns aux autres, entre 3 et 50, soit par la flagelle, soit par la tête. Le compte rendu doit préciser leur fréquence, leur taille, ainsi que leur mode d'accrochage. À l'inverse de l'agrégation, l'agglutination, si elle est confirmée (présence d'anticorps anti-spermatozoïdes au MAR-test et au test aux immunobilles) a une valeur pathologique, la première conséquence étant l'incapacité des spermatozoïdes, même de ceux qui sont libres du phénomène d'agglutination, à traverser la glaire cervicale et donc à remonter dans le tractus génital après un rapport sexuel.

C) Évaluation de la concentration spermatique et de la concentration en cellules rondes

Après fixation et sédimentation de quelques microlitres de sperme dans un hémacytomètre (cellule de Neubauer modifiée, ou cellule de Malassez par exemple), les spermatozoïdes sont dénombrés et une extrapolation permet de déterminer la concentration spermatique.

La polyzoospermie (concentration supérieure à 200 x 10⁶ spermatozoïdes/ml) n'a que peu de valeur pathologique, mais incite à rechercher des signes d'infection.

Les seuils inférieurs de normalité ont été revus à la baisse en 2010 (15 x 10⁶ spermatozoïdes/ml et 39 x 10⁶

spermatozoïdes/éjaculat). Si la concentration spermatique est inférieure à ces seuils, on parle d'oligospermie. La cryptozoospermie se définit comme la présence de spermatozoïdes « cachés » (observation de quelques spermatozoïdes uniquement après centrifugation du sperme). L'azoospermie est l'absence de spermatozoïdes à l'examen direct du sperme et après centrifugation. Ces anomalies de nombre doivent être confirmées sur d'autres recueils et nécessiteront un bilan clinique et paraclinique complet, pour essayer d'en comprendre l'origine. Le bilan comportera en particulier un bilan hormonal, la recherche de microdélétions du chromosome Y et un bilan génétique pré-ICSI (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*) (caryotype, consultation génétique) si on envisage une ICSI et, *a fortiori*, une biopsie testiculaire.

Dans le même temps, les cellules rondes sont dénombrées. Le test à la peroxydase identifie les polynucléaires neutrophiles (cellules brunes peroxydase-positives). Une concentration en polynucléaires neutrophiles supérieure à 1 x 10⁶/ml définit la leucospermie, nécessitant la réalisation d'une spermoculture. Si les cellules observées sont peroxydase-négatives, il peut s'agir de cellules germinales qui seront identifiées lors du spermocytogramme. Si la concentration en cellules germinales est supérieure à 10 % de la concentration en spermatozoïdes, cela oriente vers un trouble de la spermatogenèse.

D) Évaluation de la vitalité spermatique

La lecture d'un frottis de sperme coloré à l'éosine-nigrosine évalue la vitalité spermatique. Seuls les spermatozoïdes morts se laisseront pénétrer par l'éosine et seront colorés en rose. D'après le manuel de l'OMS (2), si moins de 58 % de spermatozoïdes sont vivants, on parle de nécrospermie, dont les causes sont les suivantes :

- un problème de recueil (contamination du sperme dans le réceptacle par la solution antiseptique) ;
- un délai d'abstinence trop long ;
- une infection des glandes annexes masculines ;
- une immunisation (anticorps anti-spermatozoïdes cytotoxiques).

Cette nécrospermie est parfois associée à une polykystose rénale, sans qu'on ne connaisse aujourd'hui le substratum physiopathologique de cette association.

E) Évaluation de la morphologie spermatique

Complétant le spermogramme de base, le spermocytogramme consiste en une évaluation de la morphologie des spermatozoïdes fixés et colorés avec la coloration de Schorr ou de Papanicolaou.

Le spermologiste doit la définition d'un spermatozoïde normal en microscopie optique aux équipes de David (1975), puis de Kruger (1986), qui sont les pères des deux classifications utilisées aujourd'hui pour l'évaluation de la térazoospermie.

La classification de David a été modifiée en 2000 (8) et demeure aujourd'hui un outil diagnostique clé de l'infer-

tilité masculine, puisqu'elle permet de définir la tératozoospermie, c'est-à-dire d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes typiques et atypiques d'un sperme et de décrire le type et le nombre d'anomalies portées par chaque spermatozoïde (index d'anomalies multiples ou IAM). La classification de David modifiée évalue les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

Sont ainsi décrites :

- 7 anomalies de la tête : allongée, amincie, microcéphale, macrocéphale, multiple, anomalie de la région acrosomique, anomalies de la base ;
- 3 anomalies de la pièce intermédiaire : reste cytoplasmique, pièce intermédiaire grêle, pièce intermédiaire angulée ;
- 5 anomalies du flagelle (ou pièce principale) : absent, écourté, de calibre irrégulier, enroulé et multiple.

La **figure** détaille quelques-unes de ces anomalies.

La norme est placée à 30 % de spermatozoïdes typiques.

Dans notre laboratoire, nous sommes restés fidèles à la classification de David et au principe de l'IAM, tout en appliquant une lecture plus sévère des anomalies. De ce fait, notre norme de pourcentage de formes typiques est de 15 %. Mais d'après le dernier manuel de l'OMS, la tératozoospermie est définie comme un pourcentage de spermatozoïdes typiques inférieur à 4 % ; il est probable que ces nouvelles recommandations ne seront pas généralisées à l'ensemble des laboratoires avant quelques années.

Quoi qu'il en soit, en matière de morphologie, le typage des anomalies et leurs associations sont au moins aussi importants que le pourcentage de formes typiques. D'une façon générale, si les anomalies morphologiques sont variables pour un sperme donné, il existe des cas où une anomalie va se retrouver de façon homogène sur l'ensemble des spermatozoïdes. Certaines anomalies sont en effet plus volontiers associées à des pathologies particulières. Des flagelles enroulés peuvent être observés si des germes sont présents dans le sperme. Des têtes allongées ou amincies peuvent suggérer une varicocèle. L'association d'anomalies flagellaires (flagelles de calibre irrégulier, courts ou écourtés, enroulés et pièces intermédiaires grêles) incite à suspecter une dyskinésie flagellaire.

Le diagnostic formel de dyskinésie flagellaire est fait par la microscopie électronique, qui permet d'analyser l'axosome et les structures péri-axonémales du flagelle. Mais étant donné la difficulté de cette technique, le diagnostic

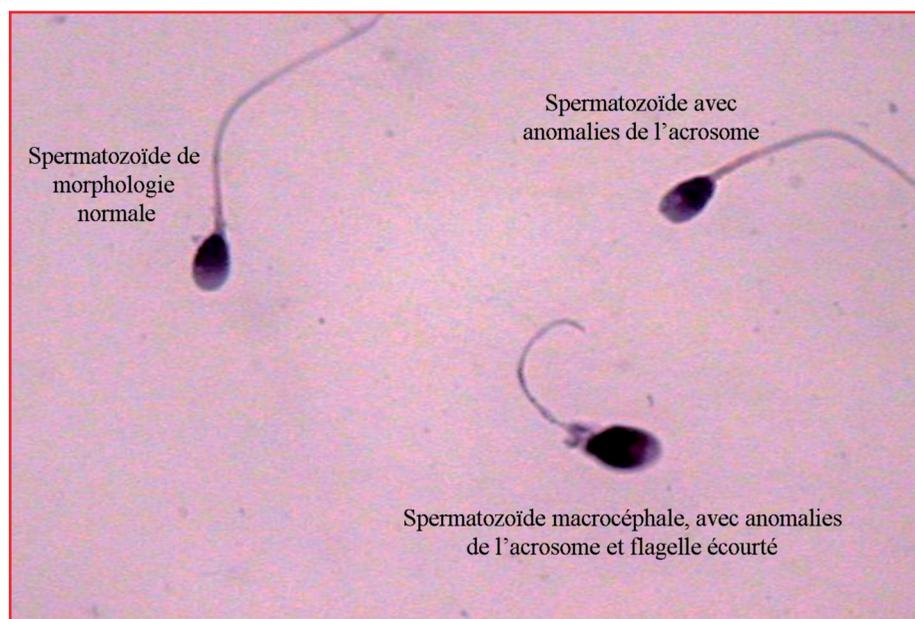


Fig. - Exemples de morphologies spermatisques (spermocytogramme).

est souvent posé sur l'association d'un terrain particulier (origine du patient, notion de consanguinité), de signes cliniques respiratoires (allergies mal étiquetées, dyspnée dues à des anomalies ultra-structurales des cils qui présentent la même ultra-structure que le flagelle), d'une asthénospermie et d'une tératospermie touchant le flagelle. Un test de Hühner analysera l'aptitude des spermatozoïdes à progresser dans la glaire en période péri-ovulatoire. Si ce test est négatif, malgré une glaire de bonne qualité, une dyskinésie flagellaire est suspectée. La dyskinésie flagellaire est une indication d'ICSI. L'enquête familiale est indispensable et on réalise un bilan pré-ICSI avec notamment une consultation génétique.

Finalement, dans un autre contexte, un spermocytogramme retrouvant des anomalies monomorphes de la tête avec 40 % de spermatozoïdes microcéphales ou macrocéphales devra aussi nous faire douter de la normalité de la tête des autres 60 % !

IV. - CONCLUSION

Le spermogramme est un examen simple, qui nécessite un laboratoire et des locaux adaptés répondant aux règles de bonnes pratiques, mais aussi et surtout des opérateurs entraînés, qualifiés, habilités et soucieux du respect des normes de qualité, qui sont seules garantes du rendu au praticien prescripteur d'un spermogramme interprétable et interprété.

Le spermogramme permet de faire (ou d'aider à faire) des diagnostics essentiels, comme l'azoospermie ou une dyskinésie flagellaire, mais il ne permet pas de s'affranchir de l'examen clinique et ne suffit pas toujours à diagnostiquer l'infertilité masculine. En effet, certaines autres anomalies peuvent être retrouvées, y compris chez un patient dont le spermogramme est normal. Il s'agit, par exemple,

de la mise en évidence d'une mauvaise qualité de l'ADN spermatique : fragmentation de l'ADN, décondensation de la chromatine ou encore présence de vacuoles céphaliques spermatiques au fort grossissement en MSOME (*Motile Sperm Organellar Morphology Examination*).

Le spermogramme est aussi très souvent répété et complété par un test qu'on appelle le test de migration-survie (TMS). Ce TMS permet de connaître la numération, la mobilité et la morphologie de spermatozoïdes qu'on aura sélectionnés par migration sur un gradient de densité et

centrifugation. Cette préparation de spermatozoïdes dits « migrés » est la préparation de base de toute AMP, et permet en amont de déterminer la technique envisageable entre insémination intra-utérine, fécondation *in vitro* ou ICSI. Il est donc important de répéter un spermogramme et de le compléter par des examens complémentaires, pour connaître les qualités intrinsèques du spermatozoïde et adapter au mieux la prise en charge des couples infertiles en AMP.

Conflit d'intérêt

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) World Health Organisation. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple, Cambridge University Press, 2000, Cambridge, UK.
- (2) World Health Organisation. Mother or nothing: the agony of infertility. *WHO Bulletin* 2010 ; **88** : 877-953.
- (3) Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007 ; **22** : 1506-12.
- (4) Louis JF, Thoma ME, Sorensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, Keiding N, Buck Louis GM. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology* 2013 ; **1** : 741-8.
- (5) Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991 ; **6** : 811-6.
- (6) Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012 ; **62** : 324-32.
- (7) World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition, Cambridge University Press, 2010, Cambridge, UK.
- (8) Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001 ; **16** : 2710-7.