

Le sperme « inflammatoire » : ses relations avec la fertilité

“Inflammatory” sperm: relationship with fertility

B. Zorn

© Springer-Verlag 2009

Résumé *Objectifs* : L’inflammation du sperme résulte d’une infection bactérienne ou virale du tractus urogénital mâle (TUGM) ; elle est souvent cliniquement silencieuse. Le dilemme existe quant aux rapports de cause à effet entre leucocytes, marqueurs de l’inflammation et mauvaise qualité du sperme. Nous nous sommes intéressés aux modifications des spermatozoïdes à l’échelon moléculaire en rapport avec l’inflammation. *Matériel et méthodes* : Cette étude repose sur une revue de la littérature et des résultats personnels. Chez 200 hommes, partenaires de couples infertiles au spermogramme normal, nous avons étudié la condensation nucléaire et les dérivés actifs de l’oxygène (DAO) déterminés par cytométrie en flux après marquage à l’acridine orange et au dihydroéthidium en fonction des taux d’élastase du plasma séminal.

Résultats : Dans la littérature, on a décrit une relation positive entre infection et exacerbation de l’apoptose des spermatozoïdes avec augmentation de la nécrose et diminution du potentiel de membrane mitochondriale. Nous avons retrouvé une corrélation positive entre le taux de spermatozoïdes avec ADN dénaturé et celui d’élastase. Ce taux passait de 8,6 % à un taux d’élastase entre 0 et 100 µg/l à 15,7 % pour un taux d’élastase entre 100 et 250 µg/l, cette augmentation ne dépendant pas de la sécrétion de DAO. Le taux de spermatozoïdes avec ADN dénaturé se normalisait pour des taux d’élastase supérieurs à 600 µg/l.

Discussion et conclusion : Les modifications de l’ADN ou des membranes des spermatozoïdes n’influencent pas automatiquement les caractéristiques classiques du sperme ni ne réduisent la fertilité mâle. Elles peuvent cependant retentir négativement sur la capacitation et la réaction acrosomique, avec absence de fécondation ou mauvais développement embryonnaire. Avant de traiter, on tiendra compte du lieu et de la durée de l’inflammation ainsi que des lésions occasionnées sur les spermatozoïdes.

Mots clés ADN · Analyse microbienne · Dérivés actifs de l’oxygène · Élastase · Leucocytes · Mitochondries · Prostatomes · Spermogramme · Tests fonctionnels

Abstract *Objectives*: Sperm inflammation is caused by bacterial or viral infection of the male genitourinary tract; it is often clinically asymptomatic. There is a dilemma about the causal relationship between leukocytes as markers of inflammation and poor semen quality. We were interested in sperm changes at molecular level caused by inflammation.

Material and methods: This study was based on a literature review and personal data. In 200 male partners of infertile couples with normal semen analysis, the percentage of sperm with DNA denaturation and the level of reactive oxygen species (ROS) were determined by flow cytometric analysis, after acridine orange and dihydroethidium stainings, and correlated with seminal plasma elastase levels.

Results: In the literature, a positive relationship between inflammation and increased sperm apoptosis was found with increased necrosis and decreased mitochondrial membrane potential. We found a positive correlation between the percentage of sperm with denatured DNA and elastase levels. The percentage increased from 8.6% at elastase level 0–100 µg/l to 15.7% at elastase level 100–250 µg/l; this increase was not dependent on ROS production. The percentage of sperm with denatured DNA normalized at elastase levels above 600 µg/l.

Discussion and conclusion: Changes in sperm DNA or membranes do not necessarily affect classical semen characteristics or reduce fertility in males. They can, however, have a negative effect on capacitation and acrosomal reaction, resulting in failed fertilization or poor embryo development. Before treatment, we must take into account the location and the duration of the inflammation as well as the damage done to sperm.

Keywords DNA · Elastase · Functional tests · Leucocytes · Microbial analysis · Mitochondria · Prostatomes · Reactive oxygen species · Semen analysis

B. Zorn (✉)

Service de gynécologie-obstétrique, centre d’andrologie,
Centre médical universitaire de Ljubljana, 3, Šljajmerjeva,
1000 Ljubljana, Slovénie
e-mail : branko.zorn@kclj.si

Abréviations utilisées

AMP, assistance médicale à la procréation ; CT, *Chlamydia trachomatis* ; DAO, dérivés actifs de l'oxygène ; FIV, fécondation in vitro ; ICSI, injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde ; IST, infections sexuellement transmissibles ; OMS, Organisation mondiale de la santé ; PMM, potentiel de membrane mitochondriale ; PVH, papilloma virus humain ; TUGM, tractus urogénital mâle ; VHB, virus de l'hépatite B ; VHC, virus de l'hépatite C ; VHS, virus herpès simplex ; VIH, virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Les plus anciennes publications liaient systématiquement l'infection-inflammation du sperme à la présence de germes bactériens [1]. Dans les années 70 du siècle précédent est posée la question de la toxicité de l'inflammation sur la qualité des spermatozoïdes et son rôle dans la stérilité. Auroux [2] liait les valeurs élevées de leucocytes dans le sperme à l'infertilité masculine.

À la suite de Comhaire et al. [3], on a fixé à 1×10^6 leucocytes par millilitre d'éjaculat (leucocytospermie) le seuil de la leucospermie comme aide au diagnostic d'inflammation des glandes accessoires mâles. En 1987, Aitken et Clarkson [4] décrivent les effets délétères des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur le sperme. À la même époque est apparue la volonté de classer les types de leucocytes en cause dans l'infection du tractus urogénital mâle (TUGM) avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux [5], et on préconise l'utilisation de l'élastase [6]. Nombre d'hypothèses sur la nocivité de l'infection sur la qualité du sperme et l'intégrité anatomique du TUGM sont alors émises.

En 20 ans, l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) semble venir à bout de toute stérilité masculine. Ainsi, bien que les infections sexuellement transmissibles (IST) soient aussi fréquentes, et parce que le diagnostic d'inflammation du TUGM, au mode de révélation – entre formes aiguës et chroniques – multiple, est à peine moins délicat, la prise en charge du sperme inflammatoire est loin d'être maximale.

Cependant, les méthodes diagnostiques de l'évaluation de la qualité du sperme se sont affinées. Avec une utilisation élargie de ces dernières, on doit pouvoir préciser la prévalence du sperme inflammatoire, le degré d'atteinte du TUGM et du sperme, sa participation dans la stérilité de l'homme et du couple et les mécanismes pathophysiologiques en jeu pour leur opposer un traitement adapté. Les réflexions exprimées ci-dessous sont celles d'un praticien clinicien impliqué dans l'assistance médicale à la procréation (AMP).

Infections du tractus urogénital mâle et mécanismes de protection contre l'infection : dilemmes sur les rapports entre infection et qualité de sperme

Agents bactériens et viraux et leur nocivité sur le sperme

L'infection du TUGM concerne la vessie, l'urètre, l'épididyme, le canal déférent, les vésicules séminales et la prostate. Elle est engendrée soit par des germes transmis sexuellement, soit par des pathogènes de la sphère urologique.

Chlamydia trachomatis (CT) est le germe IST le plus fréquent. Les publications sur les rapports entre germes microbiens et sperme sont abondantes. Les infestations expérimentales seront distinguées des infections cliniques. Expérimentalement, CT entraîne des altérations de la membrane et de l'ADN de spermatozoïdes, caractéristiques de l'apoptose [7]. *Mycoplasma hominis* s'attache, se lie au spermatozoïde et l'endommage sans le tuer [8].

Par ordre décroissant en fréquence, les bactéries pathogènes de la sphère urologique retrouvées dans le sperme sont : les staphylocoques coagulase à la pathogénicité cependant débattue, les streptocoques des groupes D et B, *Escherichia coli*, les bacilles diphtériques, Proteus et Klebsiella. Classiquement, la concentration des germes dans l'éjaculat (au moins 10^3 bactéries par millilitre d'éjaculat pour les bactéries dites pathogènes et 10^4 pour celles dites saprophytes ou commensales) permet de distinguer les infections vraies des contaminations par des germes présents au niveau de l'urètre. L'urètre est physiologiquement colonisé par les anaérobies.

On pense que les germes sont délétères pour le sperme, essentiellement par l'intermédiaire des DAO. Mais les bactéries peuvent, à elles seules, entraîner une nécrose des spermatozoïdes, indépendamment de l'action des DAO [9]. L'agglutination des spermatozoïdes a été observée après infestation à *E. coli*, CT, mycoplasmes, *Candida albicans* et *Trichomonas vaginalis*.

En pratique clinique, la prévalence de l'infection à CT chez les hommes et chez les couples infertiles est très variable, allant de 3-4 à 40 % selon les populations testées [10,11]. La présence de CT soit n'est pas corrélée aux paramètres classiques du sperme [10,11], soit est liée à une baisse de la concentration, de la mobilité et à une moins bonne morphologie des spermatozoïdes [12]. En présence d'anticorps anti-CT chez l'homme, il y a altération de la qualité du sperme (diminution de la concentration des spermatozoïdes) et de son pouvoir fécondant, un risque accru de stérilité tubaire chez la partenaire [13] avec plus de stérilité de couple [14,15].

La présence de mycoplasmes dans le sperme est liée à une baisse de la concentration des spermatozoïdes et à une morphologie anormale [12]. Le sperme est de moins bonne

qualité en présence de streptocoques du groupe D (*Enterococcus faecalis*) [16].

Pour l'infection virale dans le sperme, nous renvoyons le lecteur à la revue exhaustive faite par Dejuçq et Jégou [17]. Chez l'homme infertile, il est classique de distinguer les infections au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et au virus de l'hépatite C (VHC) de celles des autres virus : papilloma virus humain (PVH), cytomégalovirus, virus herpès simplex (VHS) et virus de l'hépatite B (VHB). Les données concernant le VIH et le VHC sont contradictoires, les uns retrouvant une relation entre VIH et altération des caractéristiques du sperme [18], d'autres non [19]. Il existe une relation négative entre la présence dans le sperme d'ADN des virus PVH, VHS et VHB et la qualité du sperme [20,21].

Leucocytes

Les leucocytes, évalués principalement par la coloration de la peroxydase intracellulaire, ou mieux, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD 45 et anti-CD 53 [22], sont supposés être le principal mécanisme de défense contre les agents bactériens et utilisés comme premier moyen diagnostique de l'infection du TUGM.

Cependant, certains ne leur confèrent qu'un rôle modeste dans le diagnostic et le pronostic de l'infection génitale [23], lorsqu'ils sont utilisés isolément, ne tenant pas compte des DAO et des autres marqueurs. On critique surtout le seuil retenu de 1×10^6 leucocytes par millilitre d'éjaculat. Ce seuil repose sur une publication de Comhaire et al. [3]. Il est en proie à d'incessantes critiques [22,24,25].

Leucocytes et qualité du sperme

Il n'y a pas de corrélation entre la présence de germes et la leucocytospermie, et la qualité du sperme est inconstamment liée à la leucospermie. Il n'y a pas de correspondance nette entre leucospermie et présence de bactéries et virus dans le sperme [16,20,25]. La littérature abonde en travaux sur les rapports entre leucospermie et caractéristiques classiques du sperme. Ceux-ci retrouvent une relation entre leucocytes et qualité de sperme tantôt favorable tantôt défavorable ; ailleurs encore, il n'y aurait aucune relation [16,26] entre les deux.

Marqueurs de l'inflammation dans les infections microbiennes, cytokines et élastase, et leur place dans l'exploration du couple infertile

Les cytokines [23] et l'élastase du liquide séminal, à un taux supérieur à 250 µg/l [6], se sont révélés être de bons marqueurs des prostatites et des infections du TUGM en général.

Dans d'autres circonstances pathologiques, en cas d'infection aiguë comme l'appendicite, on a démontré la formation de pièges extracellulaires de neutrophiles ou NETs [27]. Sous activation, les NETs libèrent des protéines dont l'élastase et la chromatine. Ensemble, ils constituent des fibres extracellulaires qui enserrant les bactéries Gram+ et -. Les NETs apparaissent comme une forme de réponse innée, encerclent les micro-organismes, préviennent leur dispersion, assurent une concentration locale élevée d'agents antimicrobiens qui dégradent les facteurs de virulence et tuent les bactéries.

C'est le stress oxydatif, déclenché par la NADPH-oxydase, qui induit la formation des NETs [28]. L'activité lytique de l'élastase est physiologiquement inhibée par l'inhibiteur de l'alpha-1-protéase.

Il n'y a pas de relation entre les caractéristiques classiques du sperme et les cytokines tumor necrosis factor (TNF-alpha) et interleukin 1-bêta, d'une part, et l'élastase [29,30], d'autre part. Zorn et al. ont rapporté une relation positive entre taux élevés d'élastase et facteur tubaire de stérilité [30]. Outre ces cytokines et l'élastase, d'autres protéines antibactériennes du liquide séminal comme la phospholipase A2, la lactoferrine, le lysozyme, les dérivés de la sémogéline [31] et la chimiokine MIG/CXCL9 [32] ont été décrites.

Recommandations de l'OMS : qu'est-ce que le sperme inflammatoire ?

Description [33]

Selon la définition de l'OMS, le diagnostic d'infection des glandes accessoires mâles ne peut être envisagé que s'il existe au préalable un spermogramme anormal – azoospermie ou oligoasthénotéatozoospermie – selon les critères d'analyse standard du sperme. Une fois cette condition remplie, le diagnostic d'inflammation du TUGM tient compte de la présence de signes cliniques et biologiques urinaires et/ou du sperme (Tableau 1). Ceux-ci concernent les antécédents d'infection urinaire, d'orchépididymite, d'IST, et à l'examen clinique un épидидyme épais et sensible et/ou un toucher rectal anormal (groupe A), une urine anormale après massage prostatique ou la présence de CT dans les urines (groupe B), ou encore dans l'éjaculat un nombre élevé de leucocytes positifs à la peroxydase, une spermoculture positive avec un nombre élevé de germes pathogènes, une viscosité anormale, une composition biochimique anormale, des niveaux élevés de marqueurs de l'inflammation ou des taux élevés de DAO (groupe C). Le diagnostic requiert outre des caractéristiques anormales du sperme, la présence soit de deux signes issus des groupes A,

Tableau 1 Signes cliniques et biologiques permettant de poser le diagnostic d'inflammation des glandes accessoires mâles

Le diagnostic requiert, outre les *paramètres anormaux classiques du sperme* (azoospermie ou oligoasthénospermie), la présence soit de deux signes, chacun issu du groupe A, B ou C, soit d'au moins deux signes du groupe C (éjaculat), constatés sur deux analyses de sperme consécutives.

Groupe A. Anamnèse et signes cliniques :

- antécédent d'infections urinaires, orchépididymite et infection sexuellement transmissible ;
- signes cliniques : épидидyme épais et douloureux, canal déférent épais, toucher rectal anormal.

Groupe B. Urine après massage prostatique :

- urine anormale après massage prostatique ;
- bactériospermie à germes pathogènes ;
- culture positive à *Chlamydia trachomatis*, ou ADN de *Chlamydia trachomatis* détecté par PCR, ou détection par immunofluorescence ou par méthode Elisa.

Groupe C. Signes d'éjaculat :

- élévation du nombre des leucocytes positifs à la peroxydase ;
- culture positive avec présence de bactéries pathogènes ; culture positive à *Chlamydia trachomatis*, ou ADN de *Chlamydia trachomatis* détecté par PCR, ou détection par immunofluorescence ou par méthode Elisa ;
- anomalie de l'apparence et/ou de la viscosité et/ou du pH du sperme et/ou de la biochimie du plasma séminal et/ou des marqueurs inflammatoires et/ou des DAO élevés.

B ou C, soit d'au moins deux signes du groupe C (éjaculat) constatés sur deux analyses de sperme consécutives.

Avantages et inconvénients des recommandations de l'OMS

Ces recommandations ont pour avantage de prendre en compte les conséquences sur la fertilité du panel le plus large d'infections de l'homme jeune incluant les prostatites. Par contre, elle ignore le testicule qui participe pourtant à l'inflammation comme les glandes accessoires.

Surtout, les recommandations de l'OMS subordonnent le diagnostic d'infection à la présence de spermogramme anormal, ce qui est soit faux, soit incomplet si l'on tient compte des données de la littérature ancienne (discordance des auteurs sur la relation qualité de sperme et leucocytes) et récente qui insiste sur des modifications moléculaires des spermatozoïdes en cas d'inflammation, sans obligatoirement retentissement sur le spermocytogramme. Ainsi, cela suppose que les critères actuels soient élargis au risque que les recommandations ne deviennent au moins insuffisantes.

Définition du sperme inflammatoire

Il n'existe pas actuellement de définition satisfaisante du sperme inflammatoire. Le sperme inflammatoire pourrait être l'ensemble des modifications physiques et fonctionnelles du liquide séminal et des spermatozoïdes consécutives à une infection des voies urogénitales mâles (vessie, urètre, testicule et glandes accessoires).

La définition nécessite la présence de facteurs cliniques et biologiques comme le suggère l'OMS (Tableau 1).

Cependant, on ne peut éliminer de vraies inflammations sous prétexte que les caractéristiques classiques du sperme définies par l'analyse standard du sperme sont normales. Des inflammations autres que post-infectieuses ont été décrites. Elles résultent de facteurs environnementaux, toxiques (tabac) et auto-immuns ou dépendent de la fréquence éjaculatoire et d'habitudes sexuelles particulières ; elles exigent un diagnostic et une prise en charge spécifiques qui sortent du cadre de cette présentation.

DAO, prostasomes, élastase et autres

DAO

L'altération de la fonction des spermatozoïdes en lien avec une sécrétion élevée des DAO a été rapportée par Aitken et Clarkson il y a 20 ans [4]. Les DAO – l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle – induisent la peroxydation de la membrane du spermatozoïde, diminuant sa flexibilité. Les membranes des spermatozoïdes sont particulièrement vulnérables à ce genre d'attaque, puisqu'elles contiennent de larges quantités d'acides gras insaturés. Par ailleurs, les DAO peuvent directement endommager les mitochondries des spermatozoïdes, ce qui décroît l'énergie à leur disposition et leur mobilité.

Les DAO sont capables d'induire la fragmentation de l'ADN par deux mécanismes. Ils attaquent directement les bases purine et pyrimidine de l'ADN. Par ailleurs, ils débütent les transformations propres à l'apoptose.

Les leucocytes sont de loin la principale source des DAO encore dénommés DAO extrinsèques. Les spermatozoïdes

de mauvaise qualité ou issus d'une spermiogénèse déficiente secrètent les DAO intrinsèques en quantité bien moindre [24]. Une des principales sources de production des DAO pourrait d'ailleurs être les mitochondries des spermatozoïdes [34].

Inversement, plus les spermatozoïdes et le liquide séminal sont riches en anti-oxydants, meilleures sont la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Les capacités anti-oxydantes des spermatozoïdes et du liquide séminal sont diminuées chez les hommes infertiles.

Ainsi, l'inflammation du TUGM est un phénomène dynamique dans le temps et dans l'espace. Avant d'interpréter des résultats de leucospermie, avec ou sans DAO, et de qualité de sperme, le clinicien doit faire preuve d'imagination : des leucocytes en grand nombre venant de la prostate n'engendreront, lors du court contact avec les spermatozoïdes après éjaculation, que peu ou pas de dommage sur ces derniers, au contraire des leucocytes épидидymaires, en quantité moindre, mais de contact prolongé avec les spermatozoïdes. De grande importance sont aussi les sécrétions de ces glandes.

Prostate et prostasomes

Prostasomes et fertilité

Les prostasomes, vésicules membranaires de 50-500 nm de diamètre, sont présentes dans le sperme humain. Elles sont sécrétées par la prostate et contiennent de grandes quantités de cholestérol et de sphingomyéline. Les prostasomes ont un rôle dans la liquéfaction du sperme, la maturation et l'augmentation de la mobilité des spermatozoïdes, ainsi qu'une action immunologique préparant le sperme à la fécondation. Dans l'infection du TUGM, les prostasomes jouent un rôle important. Ils fusionnent avec les spermatozoïdes et adhèrent aux leucocytes. Ils ont une importante activité antibactérienne [35]. Enfin, ils inhibent le système NADPH-oxydase [36].

Relation élastase-prostasomes du liquide séminal

Dans une étude préliminaire, nous avons mesuré dans le liquide séminal l'élastase, marqueur de l'inflammation, par méthode Elisa et quantifié les prostasomes par deux méthodes : la cytométrie de flux avec utilisation d'antigène CD13 et de phosphatidyléthanolamine, spécifiques de la membrane des prostasomes, et l'extraction des lipides par chromatographie. Nous avons trouvé une corrélation négative entre le cholestérol et l'élastase et une corrélation négative entre la shingomyéline et l'élastase. De plus, on a retrouvé une corrélation négative entre élastase et teneur en lipides des prostasomes. Ce travail, concernant 15 partenaires mâles de couples infertiles, mérite d'être poursuivi.

Interaction élastase-prostasomes : les hypothèses

Le schéma classique suppose que dans l'infection-inflammation, le nombre des leucocytes peroxydases positifs soit augmenté ; les DAO produits changent la composition lipidique de la membrane du spermatozoïde, réduisant sa fluidité et sa capacité à fusionner avec l'ovocyte. Les DAO entraînent également un stress oxydatif de l'ADN du spermatozoïde. Les cytokines ont séparément un effet négatif sur le sperme.

Nos résultats confirment la participation active des prostasomes dans l'inflammation du TGUM et nous font progresser dans la compréhension du phénomène. On peut imaginer que l'état inflammatoire, qui s'accompagne d'une baisse des lipides du liquide séminal – cette baisse des lipides avait été rapportée par Vignon et al. [37] en 1993 – donc de la qualité des prostasomes, entraîne une baisse de leur effet protecteur et l'activation du système NADPH-oxydase qui induirait l'activation des leucocytes, la libération de l'élastase et la formation des NETs.

L'épididyme et ses mécanismes de défense propres

L'épididyme sécrète de la carnitine dont on connaît l'effet dopant sur la mobilité des spermatozoïdes. Dans la tête de l'épididyme de rat se trouve la bêta-défensine Bin 1b. Celle-ci est dotée de propriétés antimicrobiennes. On a montré qu'elle avait aussi un rôle important pour l'acquisition de la mobilité des spermatozoïdes et le début de leur maturation. Les défensines, telles que Bin 1b, pourraient avoir des implications thérapeutiques pour les IST [38].

Rapports entre infection-inflammation et appareil reproducteur mâle, d'hier à aujourd'hui

Classiquement, les processus infectieux peuvent altérer la spermatogénèse et conduire à la formation d'anticorps antispermatozoïdes et à l'obstruction du TUGM.

Les publications récentes ayant trait aux rapports infection/fertilité masculine insistent sur l'influence négative de l'infection sur le sperme au niveau moléculaire.

Mise au point sur les rapports entre inflammation du TUGM et paramètres classiques du spermogramme

L'infection du TUGM est nocive pour les spermatozoïdes : cette relation s'observe même pour des concentrations de leucocytes faibles

Dans un groupe de 200 partenaires mâles de couples infertiles au spermogramme normal selon les normes de

l'OMS [39], nous n'avons retrouvé aucune relation entre le taux de leucocytes et les paramètres classiques du sperme (tant en corrélation bivariée qu'après subdivision des patients entre ceux ayant une leucocytospermie $\geq 1 \times 10^6$ leucocytes par millilitre d'éjaculat – et les autres). Par contre, la subdivision en quatre groupes – les hommes n'ayant pas de leucocytes (groupe 1), ceux ayant entre 0,1 et $0,4 \times 10^6$ (groupe 2), entre 0,5 et $0,9 \times 10^6$ (groupe 3), enfin ceux avec $\geq 1 \times 10^6$ leucocytes par millilitre (groupe 4) – révèle une diminution de la concentration des spermatozoïdes. Celle-ci est concomitante de l'apparition des leucocytes dans le liquide séminal (groupe 2 des patients), persiste dans le groupe 3 et ne revient à la normale que dans le groupe 4.

Ainsi, partant de l'hypothèse que le liquide séminal est normalement stérile et ne renferme pas de leucocytes, point n'est besoin d'atteindre des taux élevés de leucocytes pour observer d'éventuels changements de l'analyse de sperme. L'oligozoospermie en présence de leucocytes peut aussi être en rapport avec une obstruction partielle des voies excrétrices.

Des modifications des paramètres du sperme pour des taux faibles de leucocytes viennent d'être récemment rapportées par Ziyyat et al. [40]. Ces auteurs ont retrouvé, pour des concentrations de leucocytes entre 0,5 et 1×10^6 /ml, une mobilité de grade « b » augmentée.

Absence de corrélation linéaire entre sperme inflammatoire et altérations des caractéristiques classiques du sperme

La relation entre leucocytes-élastase et les modifications de la fonction du sperme ne peut pas être linéaire pour plusieurs raisons.

Cette relation, en effet, dépend de facteurs essentiels tels que la durée d'exposition des spermatozoïdes à l'inflammation et le lieu de contact entre les leucocytes activés (intérêt du dosage de l'élastase qui mesure l'activité des granulocytes), les DAO et les spermatozoïdes.

Certains pensent que les glandes accessoires, en particulier la prostate [41,42] et l'épididyme [40], ont par leurs sécrétions une action directe, enzymatique ou auto-immune [42], sur les paramètres du sperme, en particulier la mobilité, d'où l'intérêt au temps diagnostique de doser les marqueurs biochimiques spécifiques des glandes accessoires et d'identifier l'organe infecté.

L'élastase dont l'action est importante dans la destruction de germes peut voir son action destructrice se propager aux cellules autres que les bactéries, conduisant à une possible atteinte des spermatozoïdes. Cette lyse n'est, cependant, que temporaire du fait de l'intervention d'inhibiteurs de l'élastase.

Sperme inflammatoire et modifications des fonctions nucléaire et mitochondriale des spermatozoïdes

Si la relation « inflammation du sperme-altération des paramètres classiques du sperme » est inconstante dans le temps et dans l'espace, il existe aujourd'hui plusieurs arguments en faveur d'une action délétère de l'inflammation sur le noyau et les mitochondries des spermatozoïdes.

Sperme inflammatoire et ADN des spermatozoïdes

Alvarez et al. [43] ont mis en évidence une augmentation des spermatozoïdes à ADN dénaturé en cas de leucocytospermie. Comme la leucocytospermie s'accompagnait également d'une augmentation des spermatozoïdes immatures, il suggérait que la leucocytospermie était en rapport avec un état inflammatoire du testicule pouvant se traduire par des troubles de la spermatogenèse.

Gallegos et al. [12] ont retrouvé que les hommes de couples infertiles avec infection génito-urinaire à CT ou à mycoplasma avaient des taux élevés de spermatozoïdes à ADN fragmenté par rapport aux hommes non infectés.

Dans la même série de 200 hommes partenaires de couples infertiles au spermogramme normal, nous avons étudié la condensation nucléaire, déterminée en cytométrie en flux après marquage à l'acridine orange, en fonction des taux d'élastase. Les DAO ont été identifiés après marquage au dihydroéthidium et stimulation au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA).

Nous avons retrouvé une corrélation positive entre le taux de spermatozoïdes avec dénaturation de l'ADN et le taux d'élastase. Cette augmentation apparaissait pour des taux d'élastase entre 100 et 600 $\mu\text{g/l}$ et n'était pas liée à la sécrétion de DAO, le taux de spermatozoïdes avec dénaturation de l'ADN se normalisant pour des taux d'élastase supérieurs à 600 $\mu\text{g/l}$ (Tableau 2). Une des explications possibles à ce phénomène de normalisation de la dénaturation de l'ADN, pour des taux d'élastase très élevés, pourrait être l'intervention de l'inhibiteur de l'élastase.

Infection du sperme et potentiel de membrane mitochondriale

En présence de DAO, on observe une diminution du potentiel de membrane mitochondriale (PMM). Le peroxyde d'hydrogène serait le DAO produit par les leucocytes activés, qui causerait l'inhibition du mouvement du spermatozoïde et de la production d'ATP [44]. Le PMM est corrélé négativement à la production de DAO [45].

Tableau 2 Augmentation du pourcentage de spermatozoïdes à ADN dénaturé en cas d'augmentation du taux d'élastase du liquide séminal. Cette augmentation s'observe pour des taux d'élastase moyennement élevés ; elle est relativement modérée, disparaît pour des taux d'élastase fortement élevés et n'est pas liée au taux de DAO

Paramètres	Élastase (µg/l)			
	0-100 (n = 93)	100-250 (n = 28)	250-600 (n = 22)	600 et plus (n = 26)
Leucocytes ($\times 10^6$ /ml)	0,38 \pm 1,10	0,90 \pm 1,80	0,83 \pm 0,79	1,93 \pm 2,44
Spermatozoïdes à ADN dénaturé (%)	8,63 \pm 7,19 ^{a*}	15,72 \pm 14,34 ^{b*}	13,48 \pm 7,70	9,10 \pm 7,47
Index DAO	1,02 \pm 0,13	1,13 \pm 0,16 ^{c*}	1,46 \pm 0,64 ^{d*}	1,05 \pm 0,11

L'index DAO (dérivés actifs de l'oxygène) est le rapport entre l'intensité de fluorescence émise par les spermatozoïdes marqués au dihydroéthidium et stimulés par le PMA et celle émise par les spermatozoïdes marqués non stimulés.

* Il existe une différence statistiquement significative entre les valeurs a et b, et c et d.

L'introduction dans le plasma séminal de la cytokine TNF-alpha entraîne une baisse de la mobilité des spermatozoïdes et de leur PMM [46].

Ainsi, les modifications de l'intégrité de l'ADN et du PMM sont réduites en intensité et n'occasionnent pas automatiquement des altérations des caractéristiques classiques du sperme ni une réduction de la fertilité mâle [47].

Ces modifications s'observent à des taux de leucocytes et d'élastase modérément élevés. À des taux de leucocytes et d'élastase plus élevés, l'intégrité de l'ADN et le PMM se normalisent. On ne connaît pas le mécanisme de ces modifications.

Cependant, on ne peut exclure qu'in vivo, ces modifications négatives du noyau et des mitochondries retentissent sur la capacitation, la maturation, la réaction acrosomique avec perturbation du test de pénétration des ovocytes dépellucidés de hamster [48] et possible absence de fécondation. In vitro, en FIV, des taux de DAO du liquide séminal élevés sont associés à des taux de fécondation et de grossesses moindres [49,50]. Des taux élevés d'élastase du liquide séminal sont associés à un mauvais développement embryonnaire au stade de blastocyste et à un plus grand nombre d'embryons arrêtés dans leur développement [51].

En ICSI, on a retrouvé une association négative entre le taux de DAO du liquide séminal et le développement embryonnaire au stade blastocyste [52]. La démarche diagnostique du sperme inflammatoire de l'homme infertile asymptomatique, proposée par l'auteur, est présentée à la Figure 1.

Applications à la pratique quotidienne

Traitement ambulatoire des différentes formes de sperme inflammatoire

Le sperme inflammatoire peut être la conséquence d'une infection génito-urinaire aiguë, d'une prostatite chronique ou d'une infection cliniquement asymptomatique avec leucospermie isolée.

Nous ne revenons pas sur le traitement d'une infection aiguë dont les protocoles sont codifiés [53]. Selon Gallegos et al. [12], le traitement antibiotique d'une infection génito-urinaire à CT fait chuter le nombre des spermatozoïdes à ADN fragmenté.

Le traitement d'une prostatite chronique repose sur un traitement antibiotique de longue durée (de quatre à six semaines), utilisant en général des fluoroquinolones avec, dans les cas de récurrence, la nécessité d'associer d'autres antibiotiques et de traiter plus longtemps encore. Aux antibiotiques peuvent être adjoints des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des anti-oxydants.

Le traitement d'une leucospermie cliniquement et microbiologiquement asymptomatique, et sans antécédent d'infection génito-urinaire, repose sur un anti-inflammatoire et/ou des anti-oxydants. Vicari et al. [54] ont retrouvé une action favorable des carnitines, lorsque préexistaient une leucospermie et des DAO augmentés et qu'il y avait pas eu de traitement anti-inflammatoire préalable. Le traitement antibiotique, en cas de leucospermie, améliorerait les paramètres du sperme et diminuerait la concentration des leucocytes [55].

Le suivi des patients sous traitement est clinique, microbiologique et spermologique. Quinze jours à trois semaines après l'arrêt du traitement, on contrôle le spermogramme avec spermoculture et dosage de l'élastase. Un taux initial élevé d'élastase qui se normalise après traitement signe l'infection récente guérie. Un taux qui ne se normalise pas peut traduire soit une infection persistante, soit l'existence d'un complexe élastase-inhibiteur encore en action. La mesure des DAO devrait être systématique. Le spermogramme sera répété à trois mois, complété au mieux d'une mesure de la fragmentation de l'ADN et du PMM.

Préparation du sperme inflammatoire en vue d'AMP

Pour la sélection du sperme en vue d'AMP, on adaptera celle-ci en tenant compte de la situation clinicobiologique. Dans le cas d'ADN ou de DAO anormaux, on congèlera le sperme qui se sera le mieux amélioré sous traitement médical.

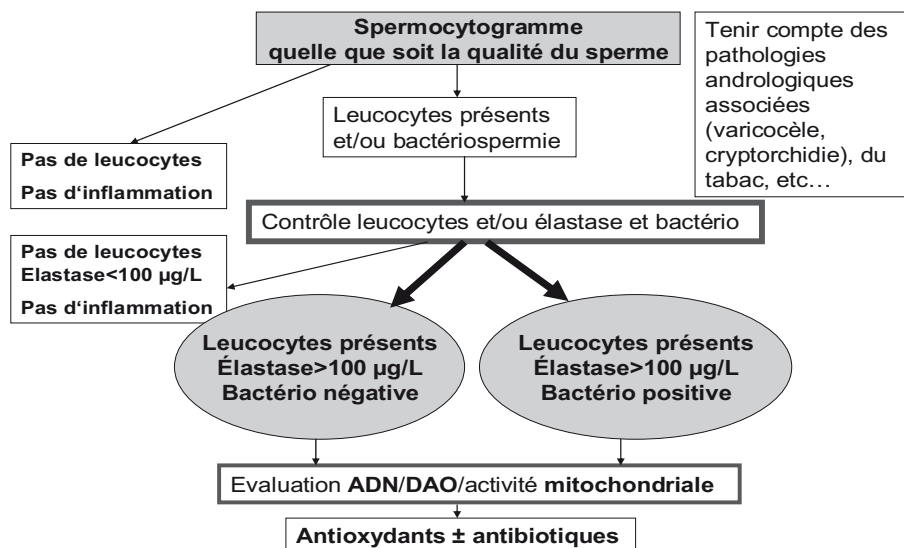


Fig. 1 Le sperme inflammatoire de l'homme infertile asymptomatique. Démarche diagnostique

Il n'existe pas à proprement parler de technique de sélection du sperme inflammatoire. On utilise de préférence la séparation du sperme sur un gradient de densité qui permet d'isoler les spermatozoïdes en diminuant la quantité de germes et en augmentant le nombre des spermatozoïdes normaux. La méthode du *swim-up* avec filtration à la laine de verre [56] serait également intéressante.

Le traitement antibiotique d'une bactériospermie dépistée cinq semaines avant AMP n'améliore pas le taux de grossesse après FIV [57] et pourrait sélectionner des germes [58].

La supplémentation des milieux de FIV et de culture embryonnaire en antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et en anti-oxydants est une pratique courante, si bien qu'en AMP, les contaminations microbiennes des milieux de culture embryonnaire sont relativement exceptionnelles, en particulier lors d'ICSI [59].

D'autres méthodes de préparation du sperme, très prometteuses sur le plan théorique, sont en cours de développement. C'est ainsi que la sélection du sperme non apoptotique entraîne une amélioration de la capacitation et de la réaction acrosomique [60]. Dans des conditions particulières, le traitement du sperme par des anticorps monoclonaux dirigés contre les cytokines améliore la mobilité des spermatozoïdes [61]. De même, lorsqu'on additionne des prostasomes au milieu de préparation, on améliore également la mobilité des spermatozoïdes [62]. La supplémentation du milieu de préparation en EDTA et catalase améliore les paramètres fonctionnels des spermatozoïdes [63]. Enfin, la sélection des spermatozoïdes basée sur la charge électrostatique membranaire [64] isole des spermatozoïdes de meilleure qualité.

Prévention et diagnostic précoce

En raison du risque de stérilité de l'homme et du couple, le sperme inflammatoire doit être au maximum prévenu. Les groupes à risque d'IST sont les hommes jeunes, « voyageurs-migrants », qui, de surcroît, fument et consomment de l'alcool. Le diagnostic précoce passe par le développement et l'utilisation raisonnée de moyens diagnostiques modernes en spermologie.

Conclusion

S'il existe aujourd'hui un faisceau d'arguments en faveur de la participation du sperme inflammatoire dans l'infertilité de l'homme et du couple, les rapports entre les deux sont loin d'être clairs.

À partir d'une revue de la littérature et de résultats personnels, nous proposons une approche pathogénique qui fait intervenir testicule et glandes accessoires, lieu et durée d'exposition des spermatozoïdes aux leucocytes et aux DAO et état physique du spermatozoïde antérieur au stress oxydatif de l'inflammation (importance des pathologies associées).

Munis de méthodes modernes d'investigation de la fonction du spermatozoïde, nous ferons preuve de subtilité pour mettre en évidence la ou les altérations du spermatozoïde souvent non dépistées à l'analyse standard de sperme mais susceptibles d'entraîner des troubles de la fertilité.

Chez tout homme suspect d'infertilité, on devrait, devant toute augmentation, même minime, des leucocytes, ou mieux de l'élastase, faire au minimum doser les DAO,

pratiquer une analyse microbienne – dont l'étendue est à discuter – et estimer l'état de l'ADN. La thérapeutique sera adaptée au mieux aux troubles observés, sachant que, plus que jamais, eu égard aux impératifs de l'AMP, prévaut le dicton « *primum non nocere* ».

Références

- Riley FJ, Masters WH (1956) Problems of male fertility. III. Bacteriology of human semen. *Fertil Steril* 7:128–132
- Auroux M (1984) Non-spermatozoal cells in human semen: a study of 1,243 subfertile and 253 fertile men. *Arch Androl* 12:197–201
- Comhaire F, Verschraegen G, Vermeulen L (1980) Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *Int J Androl* 3:32–45
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:459–469
- Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod* 5:639–648
- Jochum M, Pabst W, Schill WB (1986) Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. *Andrologia* 18:413–419
- Satta A, Stivala A, Garozzo A, et al (2006) Experimental *Chlamydia trachomatis* infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 21:134–137
- Diaz-Garcia FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infanta FM (2006) *Mycoplasma hominis* attaches and locates intracellularly in human spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1591–1598
- Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R (2005) Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 10:105–110
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kunt B, et al (2003) Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples. *Fertil Steril* 80:660–663
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, et al (2008) Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 29:198–206
- Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V (2008) Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril* 90:328–334
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, et al (1997) Chlamydial serology in 1,303 asymptomatic subfertile couples. *Hum Reprod* 12:1464–1475
- Idahl A, Abramsson L, Kumlin U, et al (2007) Male serum *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int J Androl* 30:99–107
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, et al (2008) The role of *Chlamydia trachomatis* infection in male infertility. *Fertil Steril* Aug 13 [Epub ahead of print]
- Rodin DM, Larone D, Goldstein M (2003) Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril* 79(Suppl 3): 1555–1558
- Dejucq N, Jégou B (2001) Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:208–231
- Nicopoulos JD, Almeida PA, Ramsay JW, Gilling-Smith C (2004) The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Hum Reprod* 19:2289–2297
- Garrido N, Meseguer M, Remohi J, et al (2005) Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV) – and hepatitis C (HCV) – seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod* 20:1028–1034
- Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, et al (2007) Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 87:1087–1097
- Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 79(Suppl 3):1566–1570
- Ricci G, Presani G, Guaschino S, et al (2000) Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Hum Reprod* 15:1329–1337
- Sanocka D, Jedrzejczak P, Szumala-Kaekol A, et al (2003) Male genital tract inflammation: the role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 24:448–455
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, et al (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83:635–642
- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, et al (1998) Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril* 70:315–319
- Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, et al (1998) Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4:891–903
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231–241
- Eggert-Kruse W, Kiefer I, Beck C, et al (2007) Role for tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil Steril* 87:810–823
- Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H (2000) Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod* 15:1978–1984
- Bourgeon F, Evrard B, Brillard-Bourdet M, et al (2004) Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biol Reprod* 70:768–774
- Linge HM, Collin M, Giwercman A, et al (2008) The antibacterial chemokine MIG/CXCL9 is constitutively expressed in epithelial cells of the male urogenital tract and is present in seminal plasma. *J Interferon Cytokine Res* 28:191–196
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, et al (2000) Objective criteria for diagnostic categories in the standardized management of male infertility: male accessory gland infection (MAGI). In: Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA (eds), WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. World Health Organization. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 52–54
- Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, et al (2008) Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3199–3207
- Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K (2005) Prostatomes their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update* 12:283–292

36. Saez F, Motta C, Boucher D, Grizard G (2000) Prostatomes inhibit the NADPH-oxidase activity of human neutrophils. *Mol Hum Reprod* 6:883–891
37. Vignon F, Clavert A, Cranz C, et al (1993) Alterations in the lipid composition of seminal plasma in patients with a chronic infection of the urogenital tract. *Urol Int* 50:36–38
38. Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, et al (2004) An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6:458–464
39. World Health Organization, WHO (1999) Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge
40. Ziyat A, Barraud-Lange V, Sifer C, et al (2008) Paradoxical increase of sperm motility and seminal carnitine associated with moderate leukocytospermia in infertile patients. *Fertil Steril* 90:2257–2263
41. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A (2002) The impact of epididymal and accessory gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 17:2904–2911
42. Modrich RD, Maccioni M, Molina R, et al (2005) Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular auto-immune response to prostate antigens. *Hum Reprod* 20:2567–2572
43. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, et al (2002) Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 78:319–329
44. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, et al (1999) Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 26:869–880
45. Wang X, Sharma RK, Gupta A, et al (2003) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80(Suppl 2): 844–850
46. Perdichizzi A, Nicoletti A, La Vignera S, et al (2007) Effects of tumor necrosis factor alpha on human sperm motility and apoptosis. *J Clin Immunol* 27:152–162
47. Krause W (2008) Male accessory gland infection. *Andrologia* 40:113–116
48. Grunewald S, Said TM, Paasch U, et al (2008) Relationship between sperm apoptosis signaling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 31:325–330
49. Agarwal A, Allamaneni SSR, Nallella KP, et al (2005) Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertil Steril* 84:228–231
50. Jedrzejczak P, Fraczek M, Szumala-Kakol A, et al (2005) Consequences of semen inflammation on fertilization capacity of spermatozoa in in vitro conditions. *Int J Androl* 28:275–283
51. Zorn B, Virant-Klun I, Vidmar G, et al (2004) Seminal elastase-inhibitor complex, a marker of genital tract inflammation, and negative IVF outcome measures: a role for a silent inflammation? *Int J Androl* 27:368–374
52. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H (2003) Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 26:279–285
53. Naber KG, Bergman B, Bishop MC, et al (2001) EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). *Eur Urol* 40:576–588
54. Vicari E, La Vignera S, Calogero AE (2002) Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with non-steroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 78:1203–1208
55. Skau PA, Folstad I (2003) Do bacterial infections cause reduced ejaculate quality? A meta-analysis of antibiotic treatment of male infertility. *Behav Ecol* 14:40–47
56. Henkel R, Schill WB (1998) Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* 30(Suppl 1):91–97
57. De Geyter C, De Geyter M, Behre HM, et al (1994) Peroxidase-positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Androl* 17:127–134
58. Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, et al (1996) Antibiotic treatment-based on seminal cultures from asymptomatic male partners in in vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. *Hum Reprod* 11:1227–1231
59. Kastrop PM, de Graaf-Miltenburg LA, Gutknecht DR, Weima SM (2007) Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum Reprod* 22:2243–2248
60. Grunewald S, Baumann T, Paasch U, Glander HJ (2006) Capacitation and acrosome reaction in non-apoptotic spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 1090:138–146
61. Cohen DR, Basu S, Randall JM, et al (2004) Sperm motility in men with spinal cord injuries is enhanced by inactivating cytokines in the seminal plasma. *J Androl* 25:922–925
62. Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O, Ronquist G (1994) Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostatic inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod* 9:1485–1489
63. Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, et al (2008) Protective effect of antioxidant supplementation in sperm preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 23:1023–1028
64. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC (2006) A simple zeta method for sperm selection-based on membrane charge. *Fertil Steril* 85:481–486