



**HAL**  
open science

# Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles

Aurore Perrin

► **To cite this version:**

Aurore Perrin. Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles. Génétique humaine. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2009. Français. NNT: . tel-00819172

**HAL Id: tel-00819172**

**<https://theses.hal.science/tel-00819172>**

Submitted on 30 Apr 2013

**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.

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES DE LA SANTE DE  
BREST

Ecole Doctorale de la Santé, Information-Communications,  
Mathématiques, Matière (ED SICMA 0373)

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE**

En vue d'obtenir le grade de Docteur ès Sciences

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présenté et soutenu publiquement le 15 octobre 2009 par **Aurore PERRIN**

**Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de  
l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles**

Sous la direction du Professeur Marc DE BRAEKELEER

**Membres du Jury :**

M. Le Professeur René FRYDMAN	Président
M. Le Professeur Christophe ROUX	Rapporteur
M. Le Docteur Franck PELLESTOR	Rapporteur
M. Le Professeur Jean-Luc BRESSON	Examineur
M. Le Docteur François VIALARD	Examineur
M. Le Docteur Frédéric MOREL	Examineur
M. Le Professeur Marc DE BRAEKELEER	Directeur de thèse

## Résumé :

Parmi les 10 à 15% de couples confrontés à des problèmes d'infertilité, l'étiologie est masculine dans la moitié des cas. La présence d'une anomalie chromosomique constitutionnelle, ou d'une anomalie génique (microdélétions du chromosome Y, mutations dans *Aurora Kinase c -AURKc-*) ou encore un ADN spermatique fragmenté peuvent être une des causes d'infertilité masculine.

Ce travail a consisté à étudier, par FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization), l'équipement chromosomique des gamètes d'hommes infertiles que le caryotype lymphocytaire soit normal ou non et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez ces patients, par la méthode TUNEL (Terminal Uridine Nick-end Labeling). Par ailleurs, nous avons mis en place des techniques permettant de rechercher la présence de microdélétions sur le chromosome Y et de mutations sur *AURKc*.

Chez des patients présentant une tératozoospermie, le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés s'échelonne de 0,47% à 100%. De plus, leur taux de fragmentation est 12 fois supérieur à celui des témoins (14,6% *versus* 1,2%). Chez les patients porteurs d'une anomalie de structure constitutionnelle, l'analyse de la ségrégation méiotique révèle des taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés de 0% à 65,60% selon l'anomalie de structure (translocation réciproque équilibrée, translocation robertsonienne ou inversion péricentrique). Leur taux de fragmentation de l'ADN spermatique est compris entre 1% et 27%. Les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que les normaux/équilibrés.

L'étude de la ségrégation méiotique et de la fragmentation sont complémentaires dans l'exploration de l'infertilité masculine.

Mots-clés : Infertilité, spermatozoides, anomalies chromosomiques, ségrégation méiotique, fragmentation

Abstract:

Among 10 to 15% of couples with infertility problems, etiology is masculine in half of the cases. The presence of a constitutional chromosomal abnormality, or a genetic abnormality (microdeletions of chromosome Y, mutations in *Aurora Kinase c - AURKc*-) or DNA sperm fragmentation could be one of the causes of infertility.

This work has consisted in studying, by FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization), the chromosomal equipment of gametes of infertile men having a normal lymphocytic karyotype or not and the rate of sperm DNA fragmentation in these patients, by TUNEL (Terminal Uridine Nick-end Labeling). Otherwise, we have developed techniques to detect the presence of microdeletions on chromosome Y and mutations of *AURKc*.

In patients with teratozoospermia, the rate of unbalanced gametes ranges from 0.47% to 100%. Moreover, they have a fragmentation rate 12 times higher than controls (14.6% *versus* 1.2%). In patients with a constitutional structural abnormality, the analysis of meiotic segregation indicates that the rate of chromosomal unbalanced gametes varies from 0% to 65.60% in function of the structural abnormality (balanced reciprocal translocation, robertsonian translocation or pericentric inversion). Their percentage of fragmentation DNA sperm is between 1% and 27%. The unbalanced gametes have more fragmented DNA than normal/balanced gametes.

The studies of meiotic segregation and DNA fragmentation are complementary in exploration of male infertility.

Title of thesis: Analysis of chromosomal equipment and DNA fragmentation in spermatozoa of infertile men.

Key words: Infertility, spermatozoa, chromosomal abnormalities, meiotic segregation, fragmentation

Ce travail a été réalisé dans le service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, au sein de l'unité Inserm U613 de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest.

# REMERCIEMENTS



Je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Monsieur le Professeur Christophe ROUX** qui me fait l'honneur d'avoir accepté d'être l'un des deux rapporteurs de cette thèse.

Qu'il soit assuré de ma très haute considération.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Monsieur le Docteur Franck PELLESTOR** qui me fait l'honneur d'avoir accepté d'être l'un des deux rapporteurs de cette thèse.

Qu'il soit assuré de ma très haute considération.

Je remercie **Monsieur le Professeur René FRYDMAN** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail et d'être le président de ce jury.

Qu'il soit assuré de ma plus haute estime.

Je remercie **Monsieur le Professeur Jean-Luc BRESSON** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Qu'il soit assuré de ma plus haute estime.

Je remercie **Monsieur le Docteur François VIALARD** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Qu'il soit également assuré de ma plus haute estime.

Je remercie **Monsieur le Professeur Claude FEREC**, directeur de l'unité INSERM U613, pour m'avoir accueillie au sein de son unité.

Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Marc DE BRAEKELEER** pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant au sein de son service, pour la disponibilité dont il a toujours fait preuve, pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de ces trois années et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Qu'il soit assuré de ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à **Monsieur le Docteur Frédéric MOREL** pour m'avoir encadrée pendant ces trois années, pour sa disponibilité de tous les jours, pour son dynamisme et sa motivation qu'il sait parfaitement transmettre, pour m'avoir encouragée particulièrement dans la rédaction d'articles dès que cela était possible.

Je lui adresse mes plus sincères remerciements pour ses conseils avisés tout au long de mon parcours, pour les connaissances scientifiques qu'il a partagées, ainsi que pour son implication et son intérêt constants aussi bien pendant ces trois années que lors de la rédaction de ce manuscrit, tout en m'autorisant la liberté nécessaire pour progresser. J'espère que mon travail aura été à la hauteur de ses attentes.

Enfin, j'ai pu apprécier son contact humain chaleureux, sa gentillesse (qui s'y frotte ne s'y pique pas toujours...!) ainsi que son humour, entraînant fous rires, ou parfois son grain de folie (" j'aime pas qu'les gens soient heureux ") !!!

Qu'il reçoive le témoignage de ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes vifs remerciements à **Madame le Docteur Nathalie DOUET-GUILBERT** pour son enthousiasme, ses conseils et son aide notamment lors de la lecture de ce manuscrit et toutes les commandes d'articles qu'elle a bien voulu me faire. J'ai également apprécié sa gentillesse, la bonne humeur qu'elle installe dans le bureau, nos fous rires et son humour, tout particulièrement développé les vendredis après-midi !

Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier vivement **Madame le Docteur Marie-Josée LE BRIS** pour ses conseils, pour son aide dans le choix des caryotypes, pour la relecture de mon manuscrit et pour sa bonne humeur.

Qu'elle soit également assurée de ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à **Madame le Docteur Véronique AMICE** pour le matériel biologique fourni, ses conseils et la relecture de ce manuscrit.

Qu'elle soit assurée de toute ma reconnaissance.

J'adresse également mes chaleureux remerciements à **Madame le Docteur Audrey BASINKO** pour son aide (Ikaros, exportation d'images et autres), ses commandes d'articles, ainsi que pour sa gentillesse, sa bonne humeur et ses conseils en matière de restaurants ou autres ... !

Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier très sincèrement tous les membres du service de Cytogénétique à savoir **Angèle, Catherine, Christine, Clément, Corinne, Delphine, Etienne, Françoise, Gisèle, Jeanine, Maëla, Marie-Cécile, Marie-Françoise, Matthieu, Nadia, Nicole LH, Nicole P, Philippe, Pierre, Véronique** et **Yvonne** pour leur sympathie et la bonne humeur qu'ils font régner dans ce laboratoire. Je les remercie également pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter lors de ces trois années et notamment **Clément** pour l'aide sur les études des pools de BACs, **Delphine** pour le caryotype, **Etienne** pour l'aide en biologie moléculaire, **Gisèle** pour avoir libéré le microscope autant que faire ce peut et **Nadia** pour son aide dans l'analyse de la ségrégation méiotique.

J'adresse également mes sincères remerciements à **Claire**, en Biologie de la Reproduction, pour son aide, tous ses étalements, les analyses des paramètres spermatiques et pour sa gentillesse.

Je tiens à remercier **Matthieu T** pour le temps qu'il m'a consacré pour les prises de photos en MGG.

Je tiens à sincèrement remercier **Madame le Docteur Isabelle AKNIN** pour son aide précieuse dans la mise en place de la recherche de microdélétions du chromosome Y.

Je remercie les personnes de différents laboratoires qui nous ont donné du matériel biologique et fourni les données dont nous avons besoin, à savoir **Madame le Docteur Guichet** du Service de Génétique, CHU Angers, **Mesdames les Docteur May-Panloup et Pinson** du laboratoire de Fécondation *in vitro*, CHU Angers, **Messieurs les Professeurs Bresson et Roux** du laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction, Besançon, **Monsieur le Docteur Louanjli** du laboratoire de Biologie Médicale et Biologie de la Reproduction, LABOMAC, Casablanca, Maroc, **Monsieur le Professeur Delobel** du Centre de Génétique Chromosomique de l'Hôpital St-Vincent de Paul, Lille, **Monsieur le Docteur Marchetti** du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHRU, Lille, **Messieurs les Docteurs Barrière et Langlois** du service de Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction, CHU Nantes, **Monsieur le Professeur Le Lannou** de l'Unité de Biologie de la Reproduction, Rennes, **Madame le Docteur Bernard-Beufe** du laboratoire de Cytogénétique, St-Herblain, **Messieurs les Docteurs Emard et Martigny** de la Polyclinique de l'Atlantique, St-Herblain, **Monsieur le Professeur Royère** et **Madame le Docteur Laudier** du laboratoire de Génétique et Biologie de la Reproduction, Tours et **Madame le Docteur Keromnes et Monsieur le Docteur Michéz** du laboratoire de Kerlann, Vannes.

Je tiens à adresser mes remerciements aux **patients** qui ont été intégrés dans les différentes études sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu.

La réalisation de cette thèse a également été rendue possible grâce au financement octroyé par la **Région Bretagne**.

Qu'elle soit vivement remerciée pour le support financier de ces trois années.

Je remercie **Tristan** pour m'avoir permis d'imprimer et **Nathalie** pour son implication et le temps consacré à m'aider à l'impression des manuscrits.

Je remercie **Etienne** qui partage ma vie, pour son aide que ce soit au niveau technique (écriture des petits bâtons .... !), de l'anglais, pour la relecture du manuscrit, pour ses encouragements, son soutien dans les moments de joie mais aussi les moins drôles..., pour m'avoir supportée pendant cette période de rédaction (pelouse, ménage, courses, repas, pas de fête du cinéma, sorties très tardives du labo !); l'année prochaine, ce sera l'inverse, j'espère être à la hauteur !

Qu'il soit assuré de ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie **ma famille** pour leur soutien tout au long de mes études, pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée, pour leurs efforts afin de m'avoir permis d'être toujours dans les meilleures conditions possibles (que de déménagements avec uniquement des choses légères et peu encombrantes, les divers travaux...!!!), j'espère que mon travail aura été à la hauteur de leur espérance. Merci **Maman** et **Isabelle** pour avoir eu le courage de lire ce manuscrit.

Merci à tous mes amis (**Bertrand**, **Izabel**, **Julien**, **Magalie**, **Manue** - *alias* Emma ou Manouch'-, **Marzieh**, **Mathieu**, **Nathalie** -*alias* Titi-, **Tony**, **Ulysse** et **Vincent** -*alias* Vicente-) pour leur soutien de tous les jours et notamment au cours de cette période de rédaction, leur aide, leur conseil, les très bons moments passés ensemble, les fous-rires, et toutes les bonnes choses encore à venir, j'espère !!!

Un merci supplémentaire à **Mathieu** pour l'anglais, ton aide et tes conseils, à **Tony** pour tes conseils et avoir lu ce manuscrit, **Ulysse** pour ton aide et tes conseils (tout particulièrement pour récupérer des données ou pour certaines reformulations et bien sûr pour ta participation en tant que témoin !!).



# TABLE DES MATIERES



<b>Abréviations</b> .....	21
<b>Introduction</b> .....	27
<b>Partie 1 : GENERALITES SUR L'INFERTILITE MASCULINE</b> .....	34
I- <b>Définitions</b> .....	35
II- <b>Principales étiologies</b> .....	36
II.A- Etiologies pré-testiculaires .....	36
II.B- Etiologies testiculaires .....	36
II.C- Etiologies post-testiculaires .....	37
III- <b>Techniques d'aide médicale à la procréation (AMP)</b> .....	37
III.A- Insémination artificielle (IA) .....	37
III.B- Fécondation <i>in vitro</i> (FIV) .....	38
III.C- Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) .....	38
IV- <b>Indications de la FIV / ICSI</b> .....	40
<b>Partie 2 : EXPLORATION DE L'INFERTILITE MASCULINE</b> .....	43
I- <b>Exploration clinico-biologique de l'infertilité masculine</b> .....	44
I.A- Examen clinique .....	44
I.B- Analyse du sperme .....	44
1- Conditions de recueil .....	44
2- Spermogramme et spermocytogramme .....	45
3- Principales anomalies du sperme et définitions .....	46
II- <b>Exploration cytogénétique de l'infertilité masculine</b> .....	47
II.A- Sur sang .....	47
1- Cytogénétique conventionnelle : le caryotype sanguin .....	48
2- Anomalies chromosomiques et infertilité masculine .....	49
2.1- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre .....	49
2.2- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure .....	50
✚ Translocations robertsoniennes .....	50
✚ Translocations réciproques équilibrées .....	52
✚ Réarrangements chromosomiques complexes (CCR) .....	52

✚ Inversions paracentriques et péricentriques .....	54
II.B- Sur spermatozoïdes .....	55
1- Patients avec un caryotype normal .....	55
1.1- Formation des spermatozoïdes : la spermatogenèse .....	55
✚ La spermatocytogenèse .....	56
✚ La spermiogenèse .....	58
1.2- Spermatogenèse et tératozoospermie .....	60
2- Patients avec un caryotype anormal et ségrégation méiotique .....	61
2.1- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre .....	61
2.2- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure .....	65
✚ Translocations robertsoniennes .....	65
✚ Translocations réciproques équilibrées .....	68
✚ Réarrangements chromosomiques complexes .....	73
✚ Inversions paracentriques .....	73
✚ Inversions péricentriques .....	75
3- Analyse de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes .....	77
<b>III- Exploration génétique de l'infertilité masculine .....</b>	<b>80</b>
III.A- Le chromosome Y et AZF .....	80
1- Constitution du chromosome Y et origine des microdélétions .....	80
2- Types de microdélétions, prévalence et impacts sur la fertilité .....	82
III.B- Le chromosome 3 et <i>SPATA16</i> .....	86
III.C- Le chromosome 19 et <i>AURKc</i> .....	87
<b>IV- Qualité de l'ADN spermatique et infertilité masculine .....</b>	<b>87</b>
IV.A- Structure de l'ADN des gamètes mâles .....	88
IV.B- Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique .....	91
IV.C- Techniques d'évaluation de l'intégrité des gamètes .....	98
1- Evaluation de l'intégrité membranaire .....	98
2- Evaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique .....	99
2.1- Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) .....	99
2.2- Test à l'Acridine Orange (AO) .....	100
2.3- Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) dite COMET .....	100
2.4- Sperm Chromatin Dispersion test (SCD) .....	101
2.5- <i>in situ</i> Nick Translation assay (NT) .....	102
2.6- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay (TUNEL) .....	102

V- Exposé des objectifs .....	104
<b>Méthodes, mises au point et validations de techniques</b> .....	<b>107</b>
I- Spermogramme et spermocytogramme .....	109
II- Cytogénétique .....	110
II.A- Cytogénétique conventionnelle sur sang .....	110
1- Mise en culture et synchronisation .....	110
2- Blocage en métaphase .....	111
3- Choc hypotonique .....	111
4- Préfixation .....	111
5- Fixation .....	111
6- Etalements .....	111
7- Marquage chromatidien .....	111
8- Analyse des métaphases .....	112
II.B- Cytogénétique moléculaire sur sang et spermatozoïdes .....	112
1- Types de sondes d'ADN utilisées .....	113
1.1- Sondes commercialisées .....	113
1.2- Sondes BACs .....	114
2- Préparation des sondes .....	115
2.1- Sondes commercialisées .....	115
2.2- Sondes BACs .....	115
✚ Pools de BACs .....	115
✚ Mise en culture .....	116
✚ Extraction de l'ADN .....	117
✚ Marquage par Nick-Translation .....	119
✚ Précipitation des sondes .....	119
3- Hybridation <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	120
3.1- Sur sang .....	120
✚ Pré-traitement des cellules des patients et hybridation .....	120
✚ Lavages post-hybridation .....	121
✚ Contre-coloration de l'ADN .....	121
✚ Analyse au microscope à fluorescence et interprétation .....	121
3.2- Sur sperme .....	121
✚ Etape de décondensation .....	122
✚ Analyse au microscope à fluorescence et interprétation .....	122
II.C- Validations des BACs .....	123
1- Pools de BACs sur spermatozoïdes .....	123

2-	Pools de BACs <i>versus</i> sondes commerciales .....	123
<b>III-</b>	<b>Génétique</b> .....	127
III.A-	Microdélétions du chromosome Y .....	127
1-	Extraction de l'ADN à partir de sang et de cellules buccales .....	127
1.1-	Sang .....	127
1.2-	Cellules buccales .....	128
2-	Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex .....	129
1.1-	Sur témoins .....	129
1.2-	Sur patients .....	129
1.3-	Mise au point .....	130
3-	Validation de la technique sur témoins .....	133
4-	Validation de la technique sur patients .....	137
III.B-	Mutation du chromosome 19 .....	144
1-	Extraction de l'ADN à partir de sang .....	144
2-	PCR .....	145
3-	Séquençage .....	146
4-	Validation de la technique sur un témoin .....	148
5-	Validation de la technique sur deux patients .....	151
<b>IV-</b>	<b>ADN spermatique</b> .....	153
IV.A-	Fragmentation de l'ADN spermatique .....	153
1-	Technique TUNEL .....	153
2-	Etablissement d'un groupe témoin et validation de la technique .....	154
IV.B-	Stratégie employée pour l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de l'équipement chromosomique des gamètes .....	155
<b>Travaux réalisés</b>	.....	159
<b>Chapitre de livre 1</b>	: Chromosomal abnormalities in male infertility .....	167
<b>Partie 1</b>	: <b>Ségrégation méiotique chez des patients avec un caryotype lymphocytaire normal mais une très sévère tératozoospermie</b> .....	182
<b>Article 1</b>	: Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature .....	187

**Article 2** : Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia ..... 193

**Partie 2 : Ségrégation méiotique chez des patients avec un caryotype lymphocytaire anormal** ..... 220

A- Translocations réciproques équilibrées entre autosomes et ségrégation méiotique chez des patients infertiles ..... 220

**Article 3** : A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridisation ..... 224

**Article 4** : Characterization of a t(2;6) by array-CGH in a couple with recurrent miscarriage: meiotic segregation analysis and implications for assisted reproduction ..... 233

**Chapitre de livre 2** : Chromosomal abnormalities in spermatozoa ..... 245

**Chapitre de livre 3** : Meiotic segregation of structural chromosomal abnormalities during male gametogenesis using fluorescent *in situ* hybridization ..... 277

B- Translocations réciproques équilibrées entre autosomes et gonosome et ségrégation méiotique chez des patients infertiles ..... 290

**Article 5** : Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: Case report ..... 293

**Article 6** : Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction ..... 298

C- Translocations robertsoniennes et ségrégation méiotique chez des patients infertiles ..... 305

D- Translocation non réciproque et ségrégation méiotique chez un patient infertile ...307

**Article 7** : Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: A case report ..... 309

E- Translocation réciproque équilibrée chez un fœtus après fécondation par un spermatozoïde recombinant d'un homme porteur d'un CCR ..... 314

**Article 8** : Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18 ..... 317

F- Inversions péricentriques et ségrégation méiotique chez des patients infertiles .	323
<b>Article 9</b> : Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8 .....	325
<b>Article 10</b> : DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality .....	330
G- Anomalie de nombre et ségrégation méiotique chez un patient infertile .....	338
<b>Article 11</b> : Increased aneuploidy rates in spermatozoa of a male carrier of a trisomy 18 mosaicism .....	340
H- Fragmentation de l'ADN spermatique et ségrégation méiotique chez des hommes porteurs d'anomalies chromosomiques constitutionnelles .....	345
<b>Travaux en cours</b> .....	349
Recherche d'une éventuelle relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique des gamètes .....	351
<b>Conclusions - Perspectives</b> .....	369
<b>Annexes</b> .....	385
Annexe 1 : Caryotypes et cytogénétique moléculaire sur sang et sur spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure .....	387
Annexe 2 : Solutions .....	393
<b>Bibliographie</b> .....	399

# ABBREVIATIONS



ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AMP : Aide Médicale à la Procréation  
AO : Acridine Orange  
ARN : Acide RiboNucléique  
AURKc : Aurora Kinase C  
AZF : AZoospermia Factor  
BAC : Bacterial Artificial Chromosomes  
BET : Bromure d'ETHidium  
BPY2 : Basic Protein Y2  
C : Cytosine  
CCR : Complex Chromosome Rearrangement  
CDY : ChromoDomaine protein Y chromosome  
CEP : Chromosome Enumeration Probe  
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator  
CGH : Comparative Genomic Hybrization  
DAPI : 4'-6-DiAmidino-2-PhenylIndol  
DAZ : Deleted in AZoospermia  
DBY : Dead Box Y chromosome  
ddNTP : DiDeoxyriboNucleotide Triphosphate  
der : dérivé  
DFFY : Drosophila Fat Facet Y-linked  
DFI : DNA Fragmentation Index  
dNTP : DeoxyriboNucleotide Triphosphate  
DO : Densité Optique  
DPC : Diagnostic préconceptionnel  
DPI : Diagnostic PréImplantatoire  
dUTP : DeoxyUridine Triphosphate  
EAA : European Academy of Andrology  
EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid  
EIF1AY : Eucaryotic translation Initiation Factor 1A Y chromosome

ELSI : ELongated Spermatid Injection  
ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology  
FISH : Fluorescent *in situ* Hybridization  
FITC : Fluoresceine IsoThioCyanate  
FIV : Fécondation *in vitro*  
FUdR : 5-FIUoro-2'-deoxyuRidine  
G : Guanine  
GTE : Glucose Tris EDTA  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HIS : Hybridation *in situ*  
HS : Harris-Schorr  
IA : Insémination Artificielle  
IACIU : Insémination Avec sperme du Conjoint Intra-Utérine  
IADIU : Insémination Avec sperme de Donneur Intra-Utérine  
ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection  
IIC : Insémination Intra-Cervicale  
IIU : Insémination Intra-Utérine  
IMSI : Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection  
ISIS : *in situ* Imaging System  
LB : Luria Bertani  
LINE : Long Interspersed Nuclear Elements  
LSI : Locus Specific Identifier  
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionosation  
MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration  
MGG : May-Grünwald-Giemsa  
MSOME : Motile Sperm Organellar Morphology Examination  
MSY : Male Specific Y chromosome  
NOR : Nucleolar Organizer Region  
NP40 : Nonidet P40  
NT : *in situ* Nick Translation assay

OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAR : Pseudo-Autosomal Region  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PCP : Partial Chromosome Paint  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PNA : Peptide Nucleic Acids  
PRINS : Primed *in situ* labeling  
PRM1 : Protamine de type 1  
PRM2 : Protamine de type 2  
PRY : PTP-BL Related Y chromosome  
PS : PhosphatidylSerine  
QSP : Quantité Suffisante Pour  
RBMV : RNA-Binding Motif Y chromosome  
RHG : Reverse bands by Heating using Giemsa  
ROSI : ROund Spermatid Injection  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute  
SCD : Sperm Chromatin Dispersion test  
SCGE : Single Cell Gel Electrophoresis  
SCOS : Sertoli Cell-Only Syndrome  
SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay  
SDS : Sodium DodecylSulfate  
SMCY : Selected Mouse cDNA Y chromosome  
SOR : Substances Oxygénées Réactives  
SRY : Sex-determining Region of Y chromosome  
SSC : Sodium Saline Citrate  
STS : Sequence-Tagged Sites  
SUZI : SUBzonal Insemination  
TDF : Testis Determining Factor  
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase  
TE : Tris-HCl EDTA

TESE : TEsticular Sperm Extraction

TNP1 : Transition Nuclear Protein 1

TNP2 : Transition Nuclear Protein 2

TOF : Time-Of-Flight mass spectrometry

TPR : Tetratrico Peptide Repeat

TSPY : Testis-Specific Protein Y-encoded

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay

UTY : Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat Y chromosome

UV : Ultra-Violet

WCP : Whole Chromosome Paint

WHO : World Health Organization

XKRY : XK-related protein Y chromosome

ZFY : Zinc Finger Y-linked gene

# INTRODUCTION



Dans les pays industrialisés, environ 10 à 15% des couples en âge de procréer connaissent des difficultés à concevoir un enfant. Quinze à vingt pour cent des grossesses cliniques finissent en fausses couches avant la 20<sup>ème</sup> semaine (Miller *et al.*, 1980). Les embryons perdus représentent 65% des conceptions (Santolo *et al.*, 1987).

Les raisons de ce trouble de la fertilité peuvent être d'origine féminine (un tiers), masculine (un tiers) ou mixte (un tiers). Plusieurs causes existent. Elles peuvent être endocriniennes, infectieuses, immunologiques, toxiques, psychologiques... L'environnement, l'industrie chimique et le mode de vie ont également un impact sur la qualité spermatique. La concentration en spermatozoïdes tend à diminuer dans les régions les plus industrialisées (Lopez-Teijon *et al.*, 2008). L'équipe de Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 1997) observe une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculat dans la population d'hommes danois nés après 1950 par rapport à ceux nés avant cette date, suggérant une plus grande exposition à des facteurs environnementaux toxiques.

La demande des couples et les possibilités thérapeutiques offertes se sont accrues au fil du temps. Différentes techniques permettent maintenant aux couples infertiles d'avoir un enfant.

L'exploration de l'infertilité masculine débute toujours par un examen clinique et une analyse du sperme. L'établissement d'un caryotype peut permettre la mise en évidence d'anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre ou de structure. Ces anomalies peuvent concerner des autosomes comme des gonosomes. Elles sont homogènes (concernent toutes les cellules de l'individu) ou en mosaïque (concernent une partie des cellules de l'individu) et l'étude de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes des patients ainsi que de l'intégrité de l'ADN des gamètes peuvent venir compléter le bilan d'infertilité dans certains cas.

Depuis quelques décennies, l'essor de la cytogénétique a permis de montrer que les anomalies chromosomiques constituent une cause majeure de l'infertilité masculine (Martin, 2008). En 1991, une étude a rapporté un taux d'anomalies chromosomiques de 0,85% dans l'espèce humaine (Nielsen & Wohlert, 1991). En effet, plusieurs équipes ont démontré que les hommes infertiles présentent 10 à 15 fois plus d'anomalies chromosomiques que la population générale (De Braekeleer & Dao, 1991; Morel *et al.*,

2004a). Il a été montré que 10% à 20% des hommes azoospermiques (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat) et 5% à 7% des hommes oligozoospermiques (moins de  $20 \times 10^6$ /mL de spermatozoïdes) ont une anomalie du caryotype (Jalbert *et al.*, 1989; De Braekeleer & Dao, 1991; Van Assche *et al.*, 1996; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). Les anomalies de nombre des chromosomes sexuels (aneuploïdies des gonosomes) et les translocations réciproques sont des anomalies chromosomiques fréquemment associées à une infertilité masculine (Duzcan *et al.*, 2006); des translocations robertsoniennes, des inversions paracentriques, péricentriques ou des anomalies chromosomiques complexes sont également rapportées chez les hommes infertiles (De Braekeleer *et al.*, 2006). Ces différents remaniements sont des anomalies de structure équilibrées, c'est-à-dire sans perte ni gain de matériel chromosomique. Leur taux est supérieur chez les hommes infertiles que la population générale.

Dans la population générale, les anomalies de nombre sont trouvées à hauteur de 3,48‰. L'incidence des anomalies de nombre des gonosomes est de 2,03‰ contre 1,45‰ pour les autosomes (Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, 2004). Le syndrome de Klinefelter (47,XXY) fait partie des aneuploïdies des gonosomes les plus fréquentes (1,72‰ des nouveau-nés) (Morris *et al.*, 2008). Cette aneuploïdie gonosomique est retrouvée dans plus de 3% de la population d'hommes infertiles (Guichaoua *et al.*, 1993; Van Assche *et al.*, 1996; Tachdjian *et al.*, 2003; De Braekeleer *et al.*, 2006). Dans 80% des cas, cette anomalie est homogène et dans 20% des cas, elle est en mosaïque (47,XXY/46,XY). La constitution chromosomique 47,XXY fait également partie des aneuploïdies gonosomiques les plus fréquentes dont l'incidence chez les nouveau-nés de sexe masculin est de 1‰ (Jacobs *et al.*, 1974) (Figure 1). La plupart des hommes 47,XXY est cependant fertile.

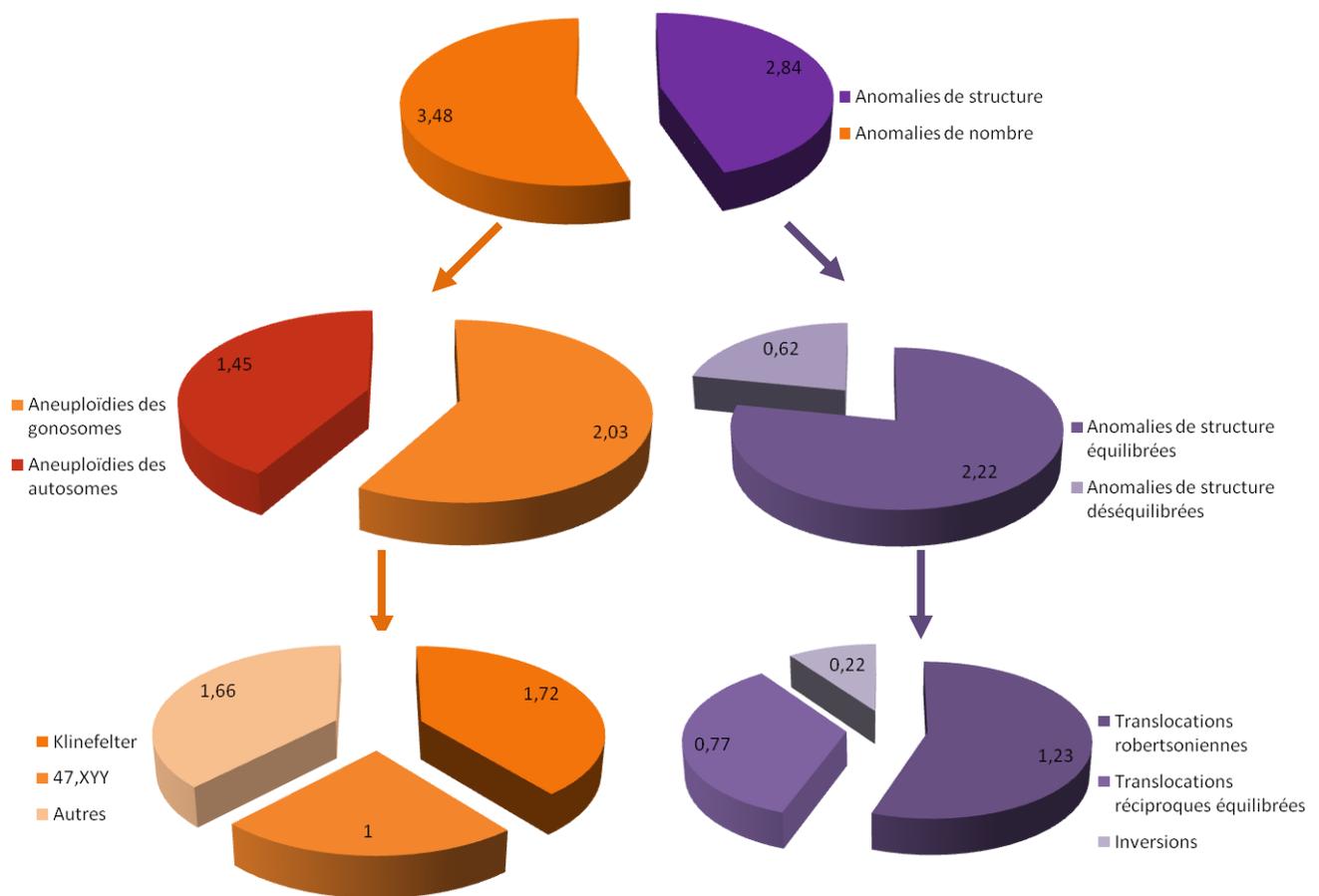


Figure 1 : Fréquences des anomalies chromosomiques constitutionnelles trouvées pour 1000 nouveau-nés ; les estimations sont faites d'après les sources citées ci-dessus.

Les anomalies chromosomiques de structure sont estimées à 2,84% dans la population générale. Elles peuvent être déséquilibrées (0,62%) et avoir des conséquences importantes sur le phénotype et le développement mental. D'autres, en revanche, sont équilibrées (2,22%). Parmi celles-ci, les translocations robertsoniennes et les translocations réciproques sont les plus fréquemment observées, avec respectivement une incidence de 1,23% et 0,77% des nouveau-nés (Nielsen & Wohlert, 1991). Les inversions sont retrouvées chez 0,22% des nouveau-nés (Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, 2004). Les inversions péricentriques peuvent être estimées à 1 à 2% des nouveau-nés lorsque les formes de polymorphisme sont intégrées dans l'estimation (Kaiser, 1984). L'incidence des inversions paracentriques est quant à elle très faible, mais elle est probablement sous-estimée du fait de la difficulté à les identifier ou par le fait que les hommes porteurs ne consultent pas

nécessairement pour infertilité. Elle serait évaluée entre 0,09‰ et 0,49‰ (Pettenati *et al.*, 1995).

Les réarrangements chromosomiques de structure complexes (CCR : complex chromosomal rearrangement) définis par la présence d'au moins 3 points de cassure et un échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes ou plus sont rares. Ils sont souvent associés à des retards mentaux, des anomalies congénitales, des fausses couches à répétition et une infertilité. Plus de 130 CCRs différents sont rapportés dans la littérature (Karadeniz *et al.*, 2008). D'après certains auteurs, le risque pour la descendance d'être polymalformée avec un retard mental est estimé empiriquement à 3,5% pour chaque point de cassure au sein de régions d'euchromatine, tandis que des points de cassure dans des régions d'hétérochromatine diminueraient ce risque (Warburton, 1991; Cotter *et al.*, 1996). Le risque de produire des gamètes chromosomiquement déséquilibrés peut être augmenté par rapport à celui engendré par une translocation réciproque équilibrée simple.

Dans la population d'hommes fertiles, il a été estimé que la fréquence d'anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes serait d'environ 10% (HAS, 2006). Les patients porteurs d'anomalies chromosomiques équilibrées peuvent quant à eux produire des gamètes chromosomiquement déséquilibrés dans des proportions beaucoup plus importantes pouvant expliquer, au moins en partie, leur infertilité.

En dehors de la formation de gamètes chromosomiquement anormaux liée à la présence d'une anomalie constitutionnelle, il est rapporté dans la littérature une corrélation entre le taux d'aneuploïdie et certaines anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Ainsi, dans le syndrome des têtes spermatiques macrocéphales (Achard *et al.*, 2007), caractérisé par la présence de spermatozoïdes à grosses têtes et avec de multiples flagelles, le pourcentage de gamètes chromosomiquement normaux est très faible, pour ne pas dire inexistant.

D'autre part, en 1976, Tiepolo et Zuffardi ont été les premiers à avoir suggéré une corrélation entre la région AZF (AZoospermia Factor) présente sur le chromosome Y et la spermatogenèse. Le recours à la biologie moléculaire a permis de détecter une microdélétion d'une partie de la région AZF chez plus de 15% des hommes ayant à la fois des perturbations importantes de la spermatogenèse et moins de 5 millions/mL de spermatozoïdes (oligozoospermie sévère) (Foresta *et al.*, 2001). La prévalence des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles est estimée à 7,6% en se basant sur plus de 80 publications. Cela concernerait environ 10% des patients avec une azoospermie non obstructive (absence de production de spermatozoïdes par les testicules) et 6% des patients avec une oligozoospermie sévère (Reijo *et al.*, 1995; Simoni *et al.*, 1998; Stouffs *et al.*, 2008). Aucune microdélétion n'a été mise en évidence chez les normospermes (paramètres spermatiques normaux) (Kent-First *et al.*, 1996). Les fausses couches à répétition, définies par l'interruption spontanée d'au moins 3 grossesses consécutives, concernent entre 0,5 et 3% des couples (Stirrat, 1990; Li *et al.*, 2002), au moins la moitié des cas est idiopathique. Différentes équipes ont récemment suggéré que certaines fausses couches à répétition pourraient être corrélées à la présence de microdélétions du chromosome Y (Dewan *et al.*, 2006; Karaer *et al.*, 2008).

Enfin, des études ont montré que l'ADN des spermatozoïdes est plus fragmenté chez les hommes infertiles que dans la population générale (Sakkas *et al.*, 2002; Brugnon *et al.*, 2006). Des cassures de l'ADN spermatique peuvent avoir des répercussions importantes sur le taux de fécondation et le développement embryonnaire (Benchaib *et al.*, 2007). Les origines de ce phénomène sont diverses et restent controversées.

# **Partie 1 : GENERALITES SUR L'INFERTILITE MASCULINE**

## I- Définitions

La mesure de l'infertilité se fait en fonction de la fécondabilité, qui est la probabilité pour un couple de concevoir un enfant vivant à terme. Dans la population fertile, cette probabilité est estimée entre 21 et 28% par cycle pour les femmes âgées de 20 à 30 ans (Miller *et al.*, 1980). La fertilité féminine diminue peu jusqu'à 30 ans et rapidement après 35 ans (HAS, 2006). Il est aujourd'hui estimé qu'après un an d'infécondité, la fécondabilité moyenne est de 12%. Elle n'est plus que de 7,9% après deux ans et seulement de 4% après cinq ans. Ainsi, au vu de la diminution des chances de grossesses spontanées au bout de deux années, il est important qu'une prise en charge médicale soit réalisée si aucune grossesse spontanée ne survient après deux années de rapports sexuels réguliers sans contraception.

En pratique, le diagnostic d'infertilité est parfois évoqué comme l'incapacité d'un couple à concevoir un enfant après une à deux années infructueuses. Cependant, la Haute Autorité de Santé (HAS) indique que celui-ci ne devrait pas être considéré comme tel avant deux ans de rapports sexuels afin d'éviter de surestimer les risques d'infertilité, 50% des femmes ne concevant pas la première année mais la deuxième (HAS, 2006).

Une enquête nationale de 1978 (Leridon, 1982) a estimé que 15% des couples ont des difficultés à concevoir un enfant et une deuxième réalisée entre les années 1988 et 1989 a retrouvé une prévalence de l'infertilité de 14,1% (Thonneau *et al.*, 1992). Dans le monde, environ 80 millions de personnes seraient concernées par des problèmes d'infertilité (Vayena *et al.*, 2002). Quant à la notion de stérilité (incapacité totale et définitive à procréer), elle a largement évolué ces dernières années. Par exemple, les hommes azoospermes étaient considérés comme stériles jusqu'à l'apparition de méthodes de fécondation comme l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes intratesticulaires ou intraépididymaires (Silber *et al.*, 1994) voire de spermatides dans l'ovocyte (Tesarik *et al.*, 1995), toutefois celles-ci sont très peu utilisées en France.

Les facteurs masculins d'infertilité comprennent principalement des altérations quantitatives et/ou qualitatives du sperme.

## II- Principales étiologies

Les étiologies peuvent être pré-testiculaires, testiculaires ou post-testiculaires. Mais l'infertilité masculine peut également être inexplicée, elle est alors dite idiopathique.

### II.A- Etiologies pré-testiculaires

Elles sont très rares. Ces troubles endocriniens touchent l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (ex : hypogonadisme : dysfonctionnement des gonades).

### II.B- Etiologies testiculaires

Ce sont les causes les plus fréquentes. Les signes cliniques, l'analyse du sperme, le caryotype, les études géniques et/ou la biopsie testiculaire peuvent permettre d'établir le diagnostic.

L'anomalie concerne le testicule et se caractérise par une diminution de la production de spermatozoïdes. Cette altération quantitative de la spermatogenèse se traduit par une azoospermie ou une oligozoospermie. A ces anomalies de numération peuvent être associées des anomalies de la mobilité (asthénospermie), de la morphologie (tératospermie) et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'origine testiculaire de l'infertilité peut être en rapport avec des anomalies génétiques.

La spermatogenèse peut également être altérée à cause d'une cryptorchidie (absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum). Le ou les testicules en position intra-abdominale sont en effet altérés par une condition thermique défavorable.

La varicocèle peut également avoir un impact négatif sur la spermatogenèse. Il s'agit d'une dilatation des veines du cordon spermatique. Cette dilatation provoque un ralentissement de la circulation sanguine de retour. La pathologie concerne les veines spermatiques situées à l'intérieur des bourses. Elle est souvent asymptomatique et peut éventuellement s'accompagner d'une altération de la spermatogenèse. Cette anomalie est retrouvée fréquemment dans la population générale (15-20%) et chez environ 40% des hommes infertiles (White *et al.*, 2007).

La spermatogenèse peut également être altérée par des atteintes testiculaires bactériennes ou virales (orchite ourlienne...), des traumatismes (chirurgicaux...), une torsion testiculaire, certaines pathologies (diabète, hémochromatose...), une exposition à des facteurs physiques (radiations ionisantes, chaleur) ou chimiques (métaux lourds, herbicides, pesticides etc...) (Lopez-Teijon *et al.*, 2008). Des causes iatrogènes (chimiothérapies anticancéreuses, stéroïdes anabolisants, médicaments hyperprolactinémisants, nitrofurantoïne, cimetidine, dapsonne, anticonvulsivants...) et toxicologiques (alcool, tabac, cocaïne, marijuana...) sont enfin rapportées (Vendrely *et al.*, 1998). Avant un traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie, il est recommandé de conserver le sperme du patient et de préserver ainsi une fécondité ultérieure.

## II.C- Etiologies post-testiculaires

Les étiologies post-testiculaires sont infectieuses (infections spermatiques ou des voies génitales) et concernent des anomalies de l'éjaculation (hypospadias, éjaculation rétrograde...) ou des anomalies canalaire (agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents : A B C D, souvent associées à des mutations du *CFTR* - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

## III- Techniques d'aide médicale à la procréation (AMP)

Si un simple traitement hormonal, une antibiothérapie ou une intervention chirurgicale ne suffit pas à rétablir la fécondité au sein du couple, des techniques d'aide médicale à la procréation (AMP) peuvent être mises en place. Ces techniques sont l'insémination artificielle (IA), la fécondation *in vitro* (FIV) et l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans un ovocyte (ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection).

### III.A- Insémination artificielle (IA)

La technique d'insémination artificielle, dans un premier temps intra-cervicale, a tenté de répondre aux problèmes d'infertilité dès les années 1790, notamment avec les

travaux du docteur John Hunter. Mais cette pratique étant restée longtemps secrète, l'historique en est difficile. D'après un article de Poynter, les travaux du docteur Hunter auraient été publiés après sa mort par Sir Everard Home en 1799 (Poynter, 1968). La première preuve certaine du succès de cette technique est attribuée à un médecin français, le docteur Girault, avec la naissance d'un petit garçon le 1<sup>er</sup> mars 1839 (L'Abeille Médicale, vol. 25, p. 409-17, cité dans Poynter, 1968).

Cette méthode simple est couramment utilisée lorsque les spermatozoïdes ne parviennent pas à atteindre l'ovocyte, lors d'une infertilité inexplicée. Des spermatozoïdes mobiles, de morphologie normale, sont préparés et concentrés dans un petit volume, puis sont placés au niveau du col de l'utérus (insémination intra-cervicale : IIC) ou directement dans l'utérus à l'aide d'un cathéter (insémination intra-utérine : IIU). Dans ce cas, la barrière qu'est la glaire cervicale est dépassée. Le sperme utilisé est souvent celui du conjoint s'il est de bonne qualité (insémination intra-utérine avec sperme du conjoint : IACIU) ou le sperme en paillettes d'un donneur dans le cas contraire (insémination intra-utérine avec sperme de donneur : IADIU).

### III.B- Fécondation *in vitro* (FIV)

Louise Brown, le premier bébé issu de la conception dans une éprouvette en laboratoire, est née le 25 juillet 1978 à l'hôpital d'Oldham au Royaume-Uni (Steptoe & Edwards, 1978). Amandine, quant à elle, premier bébé français conçu par fécondation *in vitro* (FIV), a vu le jour le 24 février 1982 à l'hôpital Antoine-Béclère de Clamart (Testart & Frydman, 1982). Cette technique s'est ensuite rapidement développée et son utilisation répandue (Frydman & Olivennes, 1992).

Les techniques de FIV se sont diversifiées. L'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) a été rapportée en 1992 (Palermo *et al.*, 1992).

### III.C- Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI)

Cette technique a pour origine une erreur de manipulation. Une équipe belge du Centre Néerlandophone de Médecine de la Reproduction de l'Université libre de Bruxelles

effectuait une technique SUZI (subzonal insemination), technique qui consiste à injecter des spermatozoïdes dans l'espace périvitellin de l'ovocyte. La pipette aurait été poussée trop loin, perforant la membrane de l'ovocyte et introduisant alors, dans le cytoplasme de celui-ci, un spermatozoïde. Par la suite, après avoir mis à profit leur erreur, cette équipe belge (Palermo *et al.*, 1992) a annoncé la naissance de quatre bébés (dont des jumeaux) conçus par une nouvelle technique de FIV. Normalement, lors d'une FIV, le spermatozoïde doit pénétrer naturellement l'ovocyte. Cette nouvelle technique, qui consiste à injecter directement un spermatozoïde dans l'ovocyte à l'aide d'une micropipette, permet ainsi d'éliminer la phase de pénétration nécessitant certaines capacités de la part du spermatozoïde. L'ICSI a rapidement connu un grand succès (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Ainsi, des stérilités masculines comme l'akinésie (absence totale de mobilité des spermatozoïdes), ont pu être reclassées dans la catégorie des infertilités. Les années 1990 ont montré que l'ICSI pouvait également être réalisée en récupérant des spermatozoïdes par aspiration épидидymaire (MESA : microsurgical epididymal sperm aspiration) (Silber *et al.*, 1994) ou directement dans le tissu testiculaire par réalisation d'une biopsie (TESE : testicular sperm extraction) (Craft *et al.*, 1993; Schoysman *et al.*, 1993) ; cela permet d'obtenir des spermatozoïdes dans 100% des cas lors d'une azoospermie obstructive et seulement dans environ 50% des cas lors d'une azoospermie non obstructive (Tournaye *et al.*, 1997a; Tournaye *et al.*, 1997b). Enfin, l'ICSI a été tentée avec l'injection d'une spermatide ronde (ROSI : round spermatid injection) (Tesarik *et al.*, 1995; Vanderzwalmen *et al.*, 1997) ou allongée (ELSI : elongated spermatid injection) (Fishel *et al.*, 1995). Mais généralement, le taux de fécondation obtenu lors d'une ICSI avec spermatide est moins élevé que lors de l'utilisation d'un spermatozoïde (Fishel *et al.*, 1997).

Lors de cette technique de fécondation, le choix du spermatozoïde, crucial pour le succès de l'ICSI, se fait uniquement selon des critères morphologiques et de mobilité. Les examens consistant à évaluer la qualité d'un spermatozoïde n'apportent pas certaines informations pourtant essentielles, comme la qualité nucléaire du spermatozoïde ou encore l'équipement chromosomique. Jusqu'en 2002, la sélection d'un spermatozoïde n'était possible qu'à un grossissement de x200/400. Pour améliorer ce

type d'analyse, des équipes ont essayé de mettre au point un système d'analyse de la morphologie des spermatozoïdes (Davis *et al.*, 1992; Kruger *et al.*, 1995) en définissant des critères stricts à prendre en compte. Puis en 2002, un nouveau procédé, permettant un grossissement de x6600, le MSOME (motile sperm organellar morphology examination) a été publié (Bartoov *et al.*, 2002). Ce procédé a été appliqué pour le choix d'un spermatozoïde lors d'une technique d'ICSI. Ce nouveau type d'ICSI a été appelé IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection). En 2003, cette équipe a montré que l'utilisation de l'IMSI par rapport à l'ICSI permettait une augmentation de la fréquence des grossesses (respectivement 66,0% *versus* 30,0%) chez des couples ayant eu préalablement au moins deux échecs d'ICSI (Bartoov *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés par une équipe italienne qui a obtenu un taux de grossesses cliniques significativement augmenté avec l'IMSI (39,2%) par rapport à l'ICSI (26,5%). L'étude a porté sur 446 couples (Antinori *et al.*, 2008).

#### **IV- Indications de la FIV / ICSI**

D'après l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), "l'absence bilatérale de perméabilité tubaire représente une indication absolue pour la FIV. D'autres indications sont représentées par une perméabilité tubaire douteuse, une endométriose, des altérations modérées des caractéristiques du sperme, une infertilité inexplicée ou l'échec de plusieurs cycles d'induction de l'ovulation ou d'inséminations artificielles. La FIV devrait être proposée comme un traitement de première intention chez des femmes qui ont un âge avancé, quelle que soit la cause de l'infertilité. La FIV ne devrait pas être proposée si les caractéristiques du sperme sont très altérées, ou après plusieurs échecs de fécondation lors de tentatives antérieures" (ESHRE, 2008).

La probabilité de recueillir et de féconder un seul ovocyte est généralement diminuée par rapport à la population fertile. Ainsi, préalablement à la méthode de fécondation *in vitro* proprement dite, il y a réalisation d'une hyperstimulation ovarienne. Ceci augmente les chances de recueillir plusieurs ovocytes et accroît le nombre d'embryons potentiellement transférables. La ponction des follicules se fait juste avant l'ovulation. Les ovocytes ainsi récupérés sont mis en culture avec les spermatozoïdes du conjoint.

Après 48 heures, des embryons à deux ou quatre cellules sont obtenus. Un ou deux embryons sont alors transférés dans l'utérus où ils ont la possibilité de s'implanter et d'effectuer leur nidation. Les spermatozoïdes sont ainsi rapprochés de leur cible et les trompes de Fallope, peu perméables ou absentes, sont court-circuitées.

D'après la Haute Autorité de Santé (HAS, 2006), les indications de l'ICSI en première intention sont une azoospermie non obstructive, une azoospermie due à l'absence bilatérale des canaux déférents et une oligoasthénotérazoospermie modérée ou sévère. Les critères de diagnostic à partir desquels la décision de choix entre FIV et ICSI est prise varient en fonction des centres. Des experts ont proposé que l'ICSI soit réalisée lorsqu'il y a moins de 500 000 spermatozoïdes progressants au total ou après préparation ou plus de 500 000 spermatozoïdes progressants au total après préparation en cas de morphologie et/ou de survie anormale.

Par ordre de préférence, les spermatozoïdes utilisés en ICSI doivent être les spermatozoïdes éjaculés, puis épидидymaires et testiculaires. Certaines études indiquent que les embryons issus de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde testiculaire ont un meilleur potentiel de développement que ceux issus d'une fécondation par un spermatozoïde épидидymaire (Steele *et al.*, 1999; Dozortsev *et al.*, 2006). D'autres présentent des résultats qui montrent le contraire (Brugnon *et al.*, 2008). Le recours à l'ICSI en cas de paucifécondation (nombre faible d'embryons par rapport au nombre d'ovocytes fécondables, inférieur ou égal à 20%) est justifié même sans cause masculine. De plus, si le taux d'anticorps anti-spermatozoïdes est égal ou supérieur à 80%, l'ICSI peut être réalisée d'emblée.

D'autres indications techniques impliquent le recours à l'ICSI : si une FIV ou une IAC ne peuvent être réalisées pour des raisons techniques indépendantes de la fertilité comme une disponibilité limitée des paillettes, s'il y a une altération de la qualité des spermatozoïdes en cas d'autoconservation après décongélation, si un diagnostic préimplantatoire (DPI) est envisagé ou encore un contexte viral particulier.

Le recours à l'ICSI est indiqué en seconde intention lors d'une azoospermie obstructive acquise post-vasectomie dans un délai minimum de six mois, d'un hypogonadisme hypogonadotrope, si, après un traitement médical hormonal, le sperme continue à être de mauvaise qualité et ne permet pas de conception naturelle, ni d'IAC, ni de FIV. Une varicocèle spermatique pourrait conduire à un recours de 2ème intention à l'ICSI, mais le traitement de la varicocèle, si celle-ci est invalidante, doit être réalisé en première intention. Une azoospermie obstructive acquise des voies séminales doit faire l'objet d'un prélèvement chirurgical des spermatozoïdes avec autoconservation. Après traitement, l'ICSI ne sera réalisée qu'en cas de persistance d'une mauvaise qualité du sperme ne permettant pas de conception naturelle, ni d'IAC, ni de FIV. Dans certaines conditions, les pathologies de l'éjaculation peuvent conduire à l'utilisation de l'ICSI.

## **Partie 2 : EXPLORATION DE L'INFERTILITE MASCULINE**

## **I- Exploration clinico-biologique de l'infertilité masculine**

Lors d'une suspicion d'infertilité masculine, un examen clinique est réalisé ainsi que deux spermogrammes à trois mois d'intervalle.

### **I.A- Examen clinique**

Un examen général est effectué (pouls, tension artérielle, poids, taille) afin d'examiner la pilosité axillaire et pubienne et de rechercher une gynécomastie. La taille de la verge est notée ainsi que l'emplacement du méat urétral (hypospadias). Le scrotum est examiné (recherche d'hydrocèle ou de varicocèle), le volume, la consistance et la sensibilité des testicules sont notés. L'épididyme est palpé à la recherche de séquelles d'épididymite, d'une sténose déférentielle, d'une agénésie épидидymaire, déférentielle et/ou des vésicules séminales. Enfin, la prostate est appréciée par un toucher rectal.

### **I.B- Analyse du sperme**

Le bilan de sperme fournit des informations sur la fonction testiculaire et l'intégrité du tractus génital masculin. Des fluctuations des paramètres spermatiques peuvent parfois être importantes au cours du temps. La saison, la fièvre, l'absorption de médicaments sont susceptibles d'avoir un impact sur ces caractéristiques. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de réaliser deux bilans spermatiques espacés de trois mois étant donné que la spermatogenèse dure 74 jours et que le transit épидидymaire se fait en 3 à 12 jours.

#### **1- Conditions de recueil**

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, cf WHO) (World Health Organization, 1999) recommande :

- une abstinence sexuelle de 2 à 5 jours avant le recueil ;
- un recueil au laboratoire ;
- un réceptacle adapté, stérile, non toxique ;

- un délai d'acheminement au laboratoire inférieur à 1 heure si le prélèvement a été effectué à domicile par suite d'un échec au laboratoire.

## 2- Spermogramme et spermocytogramme

Le spermogramme évalue la viscosité, le volume et le pH de l'éjaculat. La vitalité, la mobilité et la numération spermatique sont également analysées. La vitalité évalue le pourcentage de spermatozoïdes vivants par une coloration à l'éosine-négresine. Les gamètes sont classés en 3 catégories en fonction de leur mobilité à 1 heure puis à 4 heures : ils sont progressants, oscillants ou immobiles. Leur vitesse est aussi mesurée. Les spermatozoïdes sont dénombrés ainsi que les leucocytes et les cellules rondes (cellules de la lignée germinale n'ayant pas terminé le processus de spermatogenèse). Enfin, l'index de maturité nucléaire peut être évalué, par le bleu d'aniline, afin de déterminer le pourcentage de gamètes immatures (chromatine peu condensée).

Le spermocytogramme (classification de David) (David, 1975) recherche la présence d'anomalies morphologiques de la tête et/ou de la pièce intermédiaire et/ou du flagelle. Les deux types de coloration utilisés sont le May-Grünwald-Giemsa (MGG) et le Harris-Shorr (HS). Le bilan peut être complété par une spermoculture (si excès de leucocytes ou si une FIV est prévue), par une recherche d'anticorps (si présence d'agglutinats : MAR-test, test par immunobilles), par une biochimie séminale (si absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat : dosage des phosphatases acides, du citrate, du zinc, du fructose, de l' $\alpha$ -glucosidase et de la carnitine). Afin de déterminer si l'azoospermie est sécrétoire ou excrétoire, des dosages hormonaux (FSH, testostérone) sont effectués. Les principaux paramètres spermatiques sont indiqués dans le tableau 1.

Paramètres spermatiques analysés	Normalité
Volume (mL)	2 à 6
pH	7,2 à 8
Concentration (millions/mL)	> 20 et < 200
Numération (millions/éjaculat)	> 40
Mobilité à 1 heure	> 25% de progressants > 50% de mobiles
Mobilité à 4 heures	Chute de mobilité < 50% par rapport aux résultats de la 1ère heure
Morphologie (% de formes typiques)	> 30
Vitalité (% de spermatozoïdes vivants)	> 75
Leucocytes (million/mL)	< 1

Tableau 1 : Paramètres spermatiques normaux selon l'OMS (World Health Organization, 1999).

### 3- Principales anomalies du sperme et définitions

- **Aspermie** : absence d'éjaculat (éjaculation rétrograde ou anéjaculation)
- **Hypospermie** : volume de l'éjaculat inférieur à 2 mL (déficit de sécrétion des glandes annexes ou éjaculation rétrograde)
- **Hyperspermie** : volume de l'éjaculat supérieur à 6 mL (lésions infectieuses des glandes annexes ou abstinence trop longue)
- **pH** : inférieur à 6,5 : défaut de fonctionnement des vésicules séminales  
supérieur à 8 : insuffisance prostatique ou infection
- **Azoospermie** : absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat
  - o Sécrétoire (ou non obstructive) : pas de spermatogenèse ou incomplète
  - o Excrétoire (ou obstructive) : spermatogenèse conservée mais spermatozoïdes non excrétés dans le sperme à cause d'un obstacle dans les voies excrétoires (épididyme, canaux déférents, canaux éjaculateurs)
- **Cryptozoospermie** : moins de 100 000 spermatozoïdes dans l'éjaculat
- **Oligozoospermie** : moins de 20 millions de spermatozoïdes par millilitre ou moins de 40 millions par éjaculat

- **Polyzoospermie** : plus de 200 millions par millilitre
- **Asthénozoospermie** : mobilité réduite
  - o Primaire : moins de 50% de spermatozoïdes mobiles ou moins de 25% de spermatozoïdes progressants une heure après l'éjaculation
  - o Secondaire : chute de mobilité supérieure à 50% quatre heures après l'éjaculation par rapport à la première heure
- **Akinétospermie** : absence de mouvements
- **Nécrozoospermie** : moins de 75% de spermatozoïdes vivants
- **Immaturité nucléaire** : plus de 30% de spermatozoïdes colorés par le bleu d'Aniline
- **Tératozoospermie** : moins de 30% de spermatozoïdes avec une morphologie normale
- **Leucospermie** : plus de 1 million de leucocytes par millilitre de sperme

## II- Exploration cytogénétique de l'infertilité masculine

### II.A- Sur sang

Le terme de chromosome a été inventé par Waldeyer en 1888 pour nommer des éléments nucléaires connus pour migrer de façon longitudinale lors de la méiose (rapporté dans Cremer & Cremer, 1988). La naissance de la cytogénétique peut être située à la fin du 19ème siècle, où l'étude se limitait à des cellules en division spontanée. Avec Kemp, en 1929, la cytogénétique a été réalisée sur des cellules issues de culture cellulaire (rapporté dans Hungerford, 1978). Malgré tout, il était difficile d'observer correctement les chromosomes et l'espèce humaine fut alors définie par la présence de 48 chromosomes. En 1952, le choc hypotonique est découvert (Hsu, 1952) et le nombre de chromosomes de l'espèce humaine a été établi à 46 en 1956 (Tjio & Levan, 1956). C'est ensuite en 1959 que Lejeune *et al.* ont montré la première aberration chromosomique responsable d'un état pathologique, la présence d'un chromosome 21 surnuméraire (syndrome de Down) (Lejeune *et al.*, 1959).

La relation entre anomalie chromosomique et infertilité est suggérée dans les années 1950. Un corpuscule de Barr (chromatine sexuelle dans les cellules somatiques de la femme représentant un chromosome X inactif) a été mis en évidence chez plusieurs hommes (10/91) ayant une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (Ferguson-Smith *et al.*, 1957). Normalement, un seul chromosome X est actif dans la cellule indépendamment du nombre de chromosomes X présents. Le nombre de corpuscules de Barr permet de connaître le nombre de chromosomes X dans une cellule (égal au nombre de corpuscules plus un). En 1959, Jacobs et Strong (Jacobs & Strong, 1959) associent, chez un homme, la dysgénésie gonadique, la gynécomastie et les petits testicules au caryotype 47,XXY (syndrome de Klinefelter).

Très tôt, une corrélation a été notée entre le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et la présence d'anomalies chromosomiques (Kjessler, 1966). D'autres études ont rapporté que les translocations pouvaient être associées à une altération de la spermatogenèse (Plymate *et al.*, 1976).

La fin des années 1960 et le début des années 1970 sont marqués par la mise en évidence de bandes sur les chromosomes métaphasiques grâce à la coloration par la moutarde de quinacrine (Caspersson *et al.*, 1968). Ce sont les bandes Q. Les années suivantes ont permis l'obtention de nouvelles techniques de marquage chromatidien ou "banding" : bandes C (Yunis *et al.*, 1971), bandes R (Dutrillaux & Lejeune, 1971) et bandes G (Evans *et al.*, 1971; Sumner *et al.*, 1971).

### 1- Cytogénétique conventionnelle : le caryotype sanguin

Cet examen a pour but de dépister des anomalies chromosomiques. Le classement des chromosomes métaphasiques par paires d'homologues se fait en fonction de leur taille, de l'indice centromérique et de l'alternance de bandes sombres et de bandes claires. La limite de résolution est de 5 à 10 Mb. Chez l'espèce humaine, nous trouvons normalement 46 chromosomes répartis en 22 paires d'autosomes et 2 gonosomes (XX pour les femmes, XY pour les hommes). Chez les couples infertiles, le caryotype est réalisé, après l'examen clinique et spermiologique révélant une altération importante des paramètres spermatiques et/ou lors de fausses couches spontanées à répétition. Il est réalisé systématiquement lors d'un bilan pré-ICSI.

## 2- Anomalies chromosomiques et infertilité masculine

Une anomalie chromosomique peut être homogène ou en mosaïque. Dans ce cas, l'individu possède au moins deux populations cellulaires différentes dont la proportion varie souvent en fonction du tissu. D'autre part, un chromosome entier peut être absent ou en excès, ou au contraire, seule une région d'un chromosome peut être absente ou en excès, il s'agit alors d'une trisomie ou monosomie partielle. L'incidence des anomalies chromosomiques est plus importante chez les hommes que chez les femmes infertiles (Jalbert, 2004). La spermatogenèse est plus sensible aux anomalies chromosomiques que ne l'est l'ovogenèse. Par exemple, une disomie homogène du X chez l'homme (47,XXY) entraîne fréquemment une azoospermie, alors qu'un X surnuméraire chez une femme (47,XXX) n'entraîne pas de troubles particuliers de l'ovogenèse (Jalbert, 2004).

La fréquence d'anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles est 10 à 15 fois supérieure (environ 4% à 6%) à celle de la population de nouveau-nés (0,39%). Il y a 5 fois plus d'anomalies observées au niveau des autosomes et 27 fois plus au niveau des gonosomes (Van Steirteghem *et al.*, 1999).

### 2.1-Anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre

Dès 1963, Carr a indiqué que la présence d'anomalies chromosomiques pouvait être à l'origine d'avortements spontanés ou de naissances d'enfants mort-nés (Carr, 1963). Elles peuvent également être à l'origine d'infertilité. Ainsi, les hommes présentant le syndrome de Klinefelter (47,XXY) ont, pour la majorité, une azoospermie ou une oligoasthénozoospermie sévère. Cette formule chromosomique est présente chez 11% à 47% des hommes azoospermes et chez 0,7% des oligozoospermes (<10 millions/mL) (Bourrouillou *et al.*, 1985).

Des caryotypes 47,XYX sont observés chez 0,04% des hommes étudiés pour fausses couches à répétition chez leur partenaire. La plupart de ces hommes est fertile mais quelques cas d'enfants au caryotype anormal sont rapportés (Sandberg *et al.*, 1961; Sundquist & Hellstrom, 1969).

Des anomalies de nombre gonosomiques ou autosomiques en mosaïque peuvent s'observer chez des hommes infertiles sans anomalie du phénotype.

Les hommes infertiles peuvent également être porteurs d'anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure. Lorsqu'elles sont équilibrées, les hommes porteurs ont généralement un phénotype normal mais ils peuvent être confrontés à des troubles de la reproduction, des fausses couches chez la conjointe et/ou à la naissance d'enfants malformés et/ou avec retard mental.

## 2.2- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure

Chez l'homme, les premières anomalies chromosomiques constitutionnelles ont été découvertes à partir de 1959. Plusieurs types d'anomalies de structure sont rencontrés, seules les translocations robertsoniennes, les translocations réciproques (qui peuvent être simples ou complexes) et les inversions seront développées dans ce manuscrit.

### Translocations robertsoniennes

En 1916, la première translocation robertsonienne a été décrite par Robertson chez un insecte de l'ordre des orthoptères (Robertson, 1916).

La fréquence des translocations robertsoniennes est estimée à 0,8% chez les hommes infertiles (De Braekeleer & Dao, 1991). Cette anomalie concerne uniquement les chromosomes dits acrocentriques. Dans l'espèce humaine, ces chromosomes sont au nombre de 5 (13, 14, 15, 21 et 22) et ils se distinguent par la présence de bras courts (bras p) de très petite taille. Ces derniers sont constitués de séquences répétées en tandem, les NOR (Nucleolar Organizer Region). Ce sont des gènes d'ARN ribosomiaux. Ces translocations peuvent se produire entre deux chromosomes acrocentriques homologues ou non homologues (Figure 2), soit par une fusion des centromères, soit par une cassure dans les régions juxtacentromériques, pour former un chromosome dérivé (der). Si une fusion centromérique a lieu, les bras courts sont entièrement perdus. Si les cassures se produisent sur les bras courts, il se forme un chromosome dicentrique (présence de deux centromères). Généralement, l'un des deux centromères est inactivé évitant ainsi des problèmes de ségrégation lors de l'anaphase. Le chromosome résultant

de la fusion des bras courts d'acrocentriques est acrocentrique et est donc perdu d'où un caryotype à 45 chromosomes. Cette anomalie est dite équilibrée malgré la perte de tout ou partie des bras courts car les séquences qu'ils portent sont présentes sur tous les acrocentriques et leur perte n'a pas de conséquence phénotypique pour le porteur. C'est donc par abus de langage que cette anomalie est considérée comme équilibrée.

En revanche, cette anomalie peut avoir un impact sur le contenu chromosomique des spermatozoïdes des hommes porteurs.

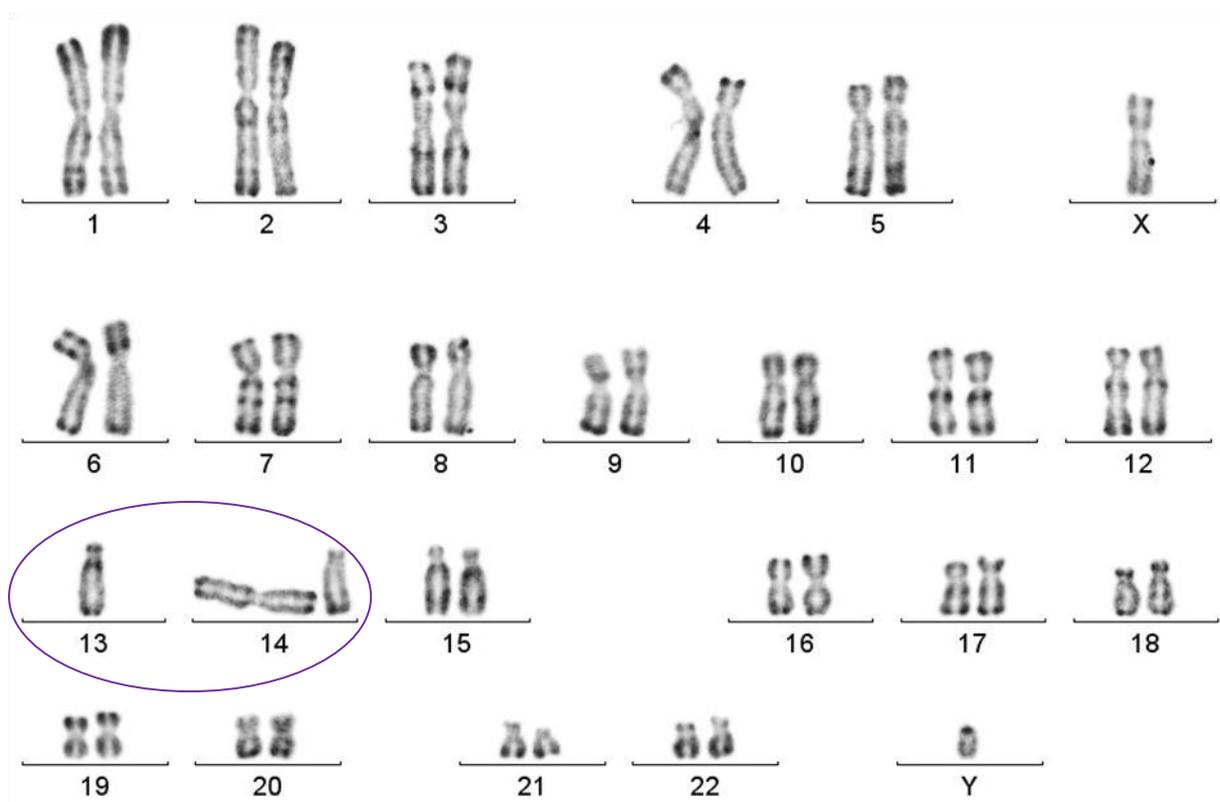


Figure 2 : Caryotype d'un patient porteur d'une translocation robertsonienne entre les chromosomes 13 et 14 : 45,XY,rob(13;14)(q10;q10).

### ✚ Translocations réciproques équilibrées

Il est difficile de dater les premières mises en évidence de translocations réciproques équilibrées. Toutefois, des publications rapportent la présence de telles translocations dans des végétaux dès les années 1930 (McClintock, 1930; Cooper & Brink, 1931; Rhoades, 1933).

Cette anomalie consiste en l'échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes sans perte ni gain de matériel (Figure 3). Généralement, elle est sans conséquence phénotypique pour le porteur mais peut entraîner des anomalies lors de la formation des gamètes.

Chez les nouveau-nés, la fréquence de translocations réciproques équilibrées est de 1 pour 625 (Van Dyke *et al.*, 1983) et de 0,6% dans la population d'hommes infertiles (De Braekeleer & Dao, 1991). Les translocations réciproques équilibrées affectent tous les chromosomes.

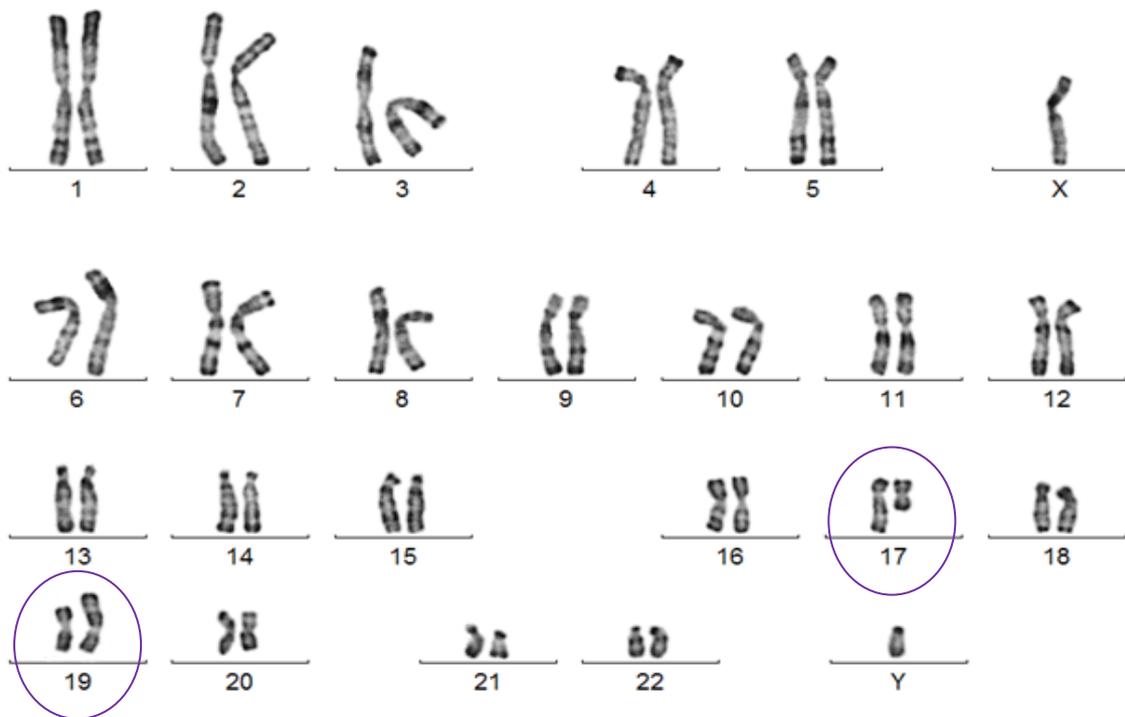


Figure 3 : Caryotype d'un patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée entre les chromosomes 17 et 19 : 46,XY,t(17;19)(q21;p11.3).

### ✚ Réarrangements chromosomiques complexes (CCR)

Comme indiqué précédemment, les réarrangements chromosomiques complexes (CCR : complex chromosome rearrangement) se définissent par l'implication d'au moins 3 chromosomes ou d'au moins 3 points de cassure avec un échange de matériel chromosomique entre au moins 2 chromosomes. De façon générale, les CCR sont rares et

peuvent être familiaux ou bien *de novo*, équilibrés ou déséquilibrés, avec un phénotype normal ou anormal. Lorsqu'un porteur de CCR a un phénotype normal, alors le CCR est *a priori* équilibré et est le plus souvent d'origine familiale. A l'inverse, lorsqu'un porteur de CCR a un phénotype anormal, le CCR est *a priori* chromosomiquement déséquilibré et serait le plus souvent *de novo* (Patsalis, 2007). Il semblerait que, plus il y a de points de cassure, plus le risque d'un phénotype anormal est important (Madan *et al.*, 1997). La présence d'un CCR est souvent associée à un retard mental, des anomalies congénitales, des fausses couches spontanées répétées ou une infertilité masculine. Jusqu'à aujourd'hui, plus de 130 CCR ont été rapportés (Goumy *et al.*, 2006) dont 12 cas concernent des hommes fertiles (Karadeniz *et al.*, 2008).

Il existe plusieurs classements pour les CCR mais ils peuvent notamment être répartis en 3 groupes selon la structure :

- Type 1 : "The three-way"

Ce type représente l'implication, dans le réarrangement, de 3 segments issus de 3 points de cassure sur 3 chromosomes, puis translocation de ces segments et recollement. Ce type de CCR est le plus commun et son origine est souvent familiale.

- Type 2 : "CCR exceptionnels"

Ce type est constitué des CCRs pour lesquels au moins un des chromosomes impliqués dans le réarrangement a plus d'un point de cassure. La plupart de ces CCRs sont *de novo*.

- Type 3 : "The double two-way CCRs"

Ce type est constitué de patients ayant au moins deux translocations réciproques simples indépendantes.

La transmission des CCRs est surtout d'origine féminine puisque majoritairement, les femmes porteuses d'un CCR restent fertiles contrairement aux hommes.

D'après Gorski, au sein des familles porteuses de CCR, le risque de fausses couches spontanées est de 48,3%, celui d'avoir une descendance anormale est de 18,4% et celui d'avoir une descendance chromosomiquement normale est de 31,6% (Gorski *et al.*, 1988).

### ✚ Inversions paracentriques et péricentriques

Enfin, un autre type d'anomalie de structure équilibrée est l'inversion. Ce réarrangement ne concerne qu'un seul chromosome. Il existe deux types d'inversions : paracentrique ou péricentrique.

L'inversion paracentrique aurait une fréquence comprise entre 1/2000 et 1/3500 dans la population générale (Fryns & Van den Berghe, 1980; Van Dyke *et al.*, 1983; Hook *et al.*, 1984; Worsham *et al.*, 1989). Elle est d'origine familiale dans 90% des cas (Vialard *et al.*, 2007). Une inversion est dite paracentrique lorsque les deux points de cassure se situent sur le même bras. Le segment cassé subit une rotation de 180° avant d'être réinséré dans le chromosome, l'indice centromérique n'est alors pas modifié.

Une inversion est dite péricentrique lorsqu'il y a un point de cassure de part et d'autre du centromère d'un chromosome. Ce segment subit une rotation de 180° avant d'être "recollé" au sein de ce même chromosome. En dehors de la configuration particulière où les points de cassure sur les bras p et q (bras longs) sont à égale distance du centromère, une inversion péricentrique entraîne une modification de l'indice centromérique (Figure 4). Tous les chromosomes peuvent être concernés, mais les chromosomes 1, 2, 8, 9, 16 et Y le sont plus fréquemment (Jaarola *et al.*, 1998; Chantot-Bastarud *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008). Toutefois, quelques inversions péricentriques concernant l'hétérochromatine sont en fait considérées comme de simples polymorphismes (Hsu *et al.*, 1987; Hysert *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008).

Les porteurs d'inversions paracentriques ou péricentriques n'ont généralement pas d'anomalies phénotypiques mais ces remaniements peuvent perturber la méiose et entraîner la formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

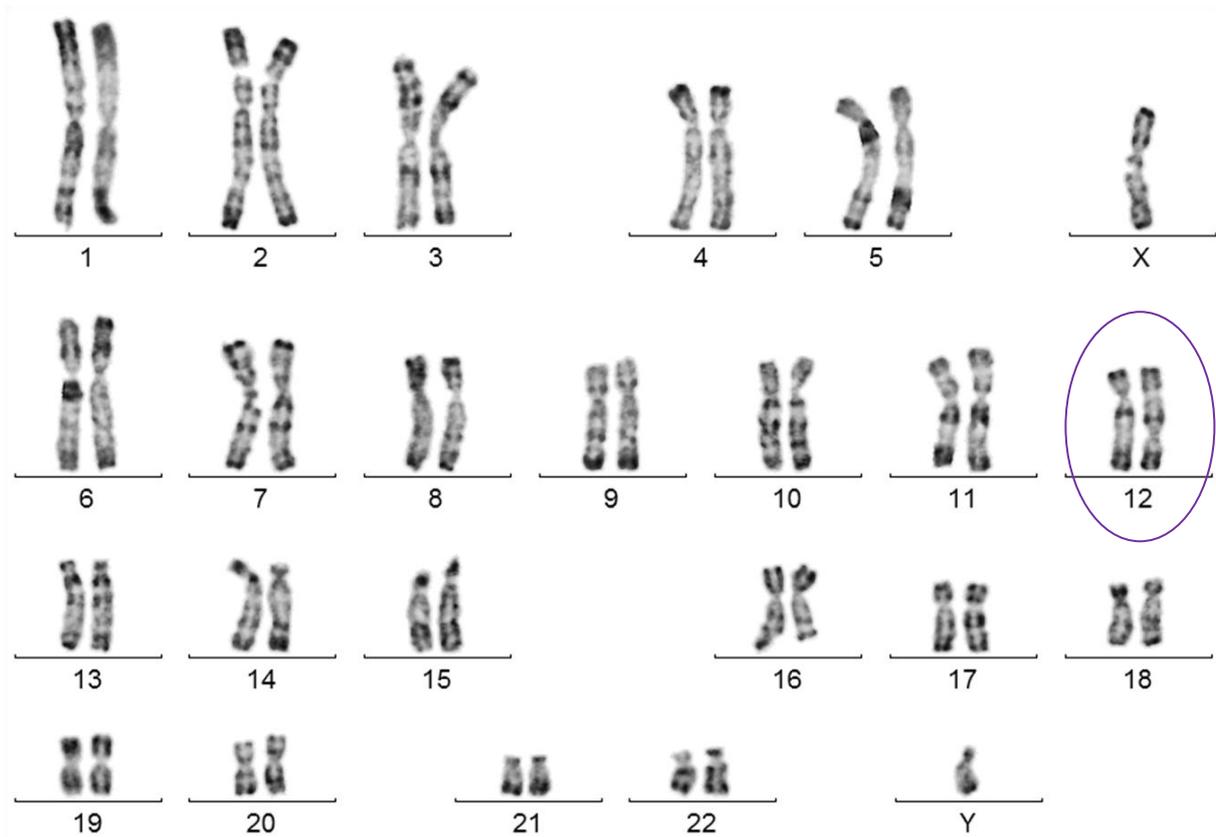


Figure 4 : Caryotype d'un patient porteur d'une inversion péricentrique du chromosome 12 : 46,XY,inv(12)(p11q23).

## II.B- Sur spermatozoïdes

### 1- Patients avec un caryotype normal

Chez les patients dont le caryotype est normal, la formation des spermatozoïdes et la répartition des chromosomes au sein des gamètes va se faire de façon à obtenir des cellules haploïdes (23 chromosomes) avec un équipement chromosomique normal.

#### 1.1- Formation des spermatozoïdes : la spermatogenèse

La spermatogenèse est un ensemble d'étapes qui permet la formation de spermatozoïdes, cellules haploïdes ( $n$  chromosomes) à partir de spermatogonies, cellules diploïdes ( $2n$  chromosomes). La spermatogenèse débute à la puberté, atteint son maximum vers 20-30 ans puis ralentit progressivement vers la quarantaine, mais peut se poursuivre jusqu'à un âge avancé. La spermatogenèse est un processus lent et continu

demandant 74 jours environ chez l'homme et qui se déroule par poussées ou vagues successives le long du tube séminifère.

La spermatogenèse se déroule en deux étapes successives :

- la spermatocytogenèse (du stade spermatogonie jusqu'au stade spermatocyte secondaire)
- la spermiogenèse (du stade spermatide jusqu'au spermatozoïde)

### ✚ La spermatocytogenèse

Elle débute par une étape de prolifération (mitoses) des cellules souches diploïdes (46,XY) (spermatogonies à  $2n$  chromosomes/ $2n$  ADN), comme les cellules somatiques. Deux types de spermatogonies Ad (dark) et Ap (pâle) sont formées : le premier type correspond à une réserve, ce sont de véritables cellules souches. Le deuxième type correspond aux spermatogonies qui vont ensuite donner les spermatocytes de 1er ordre. Une spermatogonie Ap a une durée de vie de 18 jours avant de se diviser en deux spermatogonies B. Celles-ci ont une durée de vie de 9 jours et vont donner, chacune, deux spermatocytes primaires. Ces derniers dupliquent leur ADN durant la phase d'accroissement aboutissant à des cellules à  $2n$  chromosomes et  $4n$  ADN. L'évolution des spermatogonies en spermatocytes primaires dure 27 jours.

Se met alors en place la méiose, succession de deux divisions cellulaires aboutissant à la formation de cellules haploïdes (23,X ou 23,Y) avec une étape de maturation.

La première division méiotique (Figure 5), phase réductionnelle, permet la formation des spermatocytes secondaires ( $n$  chromosomes/ $2n$  ADN). L'évolution des spermatocytes primaires en secondaires s'effectue en 23 jours. Cette première division méiotique est constituée de 4 étapes : prophase I - métaphase I - anaphase I - télophase I (Figure 5). La prophase I dure 16 jours et comprend le stade leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et la diacinèse. L'appariement des chromosomes homologues, formant des bivalents, commence par les télomères au stade zygotène, et se termine au stade pachytène. C'est à ce stade que, par des crossing-over, s'effectue le brassage intrachromosomique. La séparation des bivalents commence au diplotène et lors de la

diacinèse. Les phases suivantes se déroulent plus rapidement (7 jours). La métaphase I permet le positionnement des chromosomes au niveau du fuseau équatorial (brassage interchromosomique). L'anaphase I permet une séparation des 23 paires de chromosomes homologues par une ascension polaire avant de terminer par la télophase I au cours de laquelle s'effectue une segmentation du cytoplasme. Ainsi deux spermatocytes II à  $n$  chromosomes/ $2n$  ADN sont obtenus à partir d'un spermatocyte I à  $2n$  chromosomes/ $4n$  ADN.

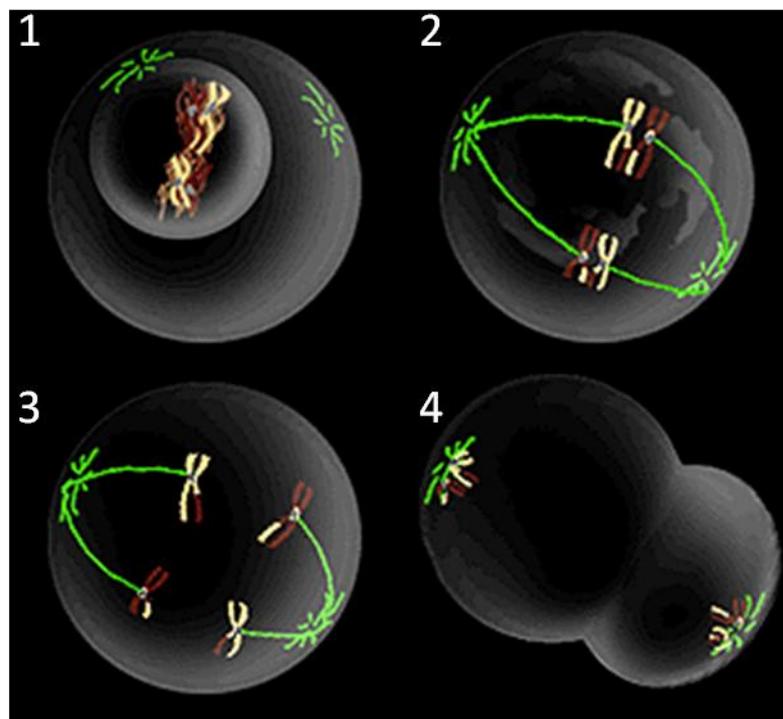


Figure 5 : Principe de la méiose I avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase)<sup>1</sup>.

La deuxième division méiotique (Figure 6), phase équationnelle, permet la formation de spermatides à  $n$  chromosomes/ $n$  ADN à partir des spermatocytes II et dure 5 heures. Elle survient 24 heures après la première. Il n'y a aucune synthèse d'ADN donc la phase intercinétique est très brève. Chaque spermatocyte II entre en prophase II, suivie de la métaphase II puis de l'anaphase II qui permet la séparation des chromatides sœurs. Enfin la télophase II aboutit à la formation de 2 spermatides à  $n$  chromosomes/ $n$  ADN.

<sup>1</sup>: d'après <http://www.biologia.arizona.edu/cell/tutor/meiosis/page3.html>

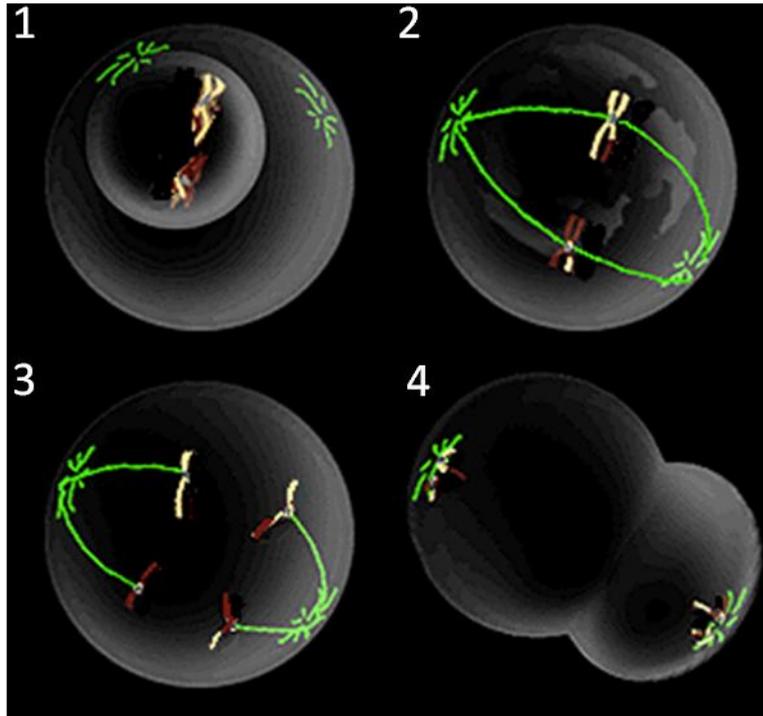


Figure 6 : Principe de la méiose II avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase)<sup>2</sup>.

### ✚ La spermiogenèse

La dernière étape est la spermiogenèse (Figure 7) qui consiste en une différenciation des spermatides en spermatozoïdes. Cette étape se poursuit pendant 23 jours et se termine par la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminipare (spermiation). Lors de ce processus, l'acrosome se forme à partir de l'appareil de Golgi. La vésicule acrosomiale recouvre les deux tiers du noyau et prend le nom d'acrosome céphalique ou de capuchon acrosomial. Son contenu enzymatique a un rôle clé dans la traversée des enveloppes de l'ovocyte lors de la fécondation. Le centriole distal s'allonge pour former l'axonème du flagelle. Le noyau s'allonge et la chromatine se condense. Lors de ce processus, les histones sont remplacées par des nucléoprotéines de transition puis par des protamines riches en arginine et cystéine. Ce sont les ponts disulfures qui permettent la stabilité et la compaction de la chromatine.

<sup>2</sup> : d'après <http://www.biologia.arizona.edu/cell/tutor/meiosis/page3.html>

Le manchon mitochondrial se forme grâce aux mitochondries qui se disposent en spirale autour de la portion initiale de l'axonème. Le cytoplasme cellulaire est éliminé en glissant le long du flagelle grâce à un réseau de microtubules. La plus grande partie du cytoplasme se détache ou est phagocytée par les cellules de Sertoli. Le spermatozoïde est une cellule allongée d'environ 60  $\mu\text{m}$ . La tête mesure 5  $\mu\text{m}$  de longueur, 3  $\mu\text{m}$  de largeur et 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, la zone de jonction entre la tête et le flagelle (col) mesure 2 x 2  $\mu\text{m}$  et le flagelle, 55  $\mu\text{m}$  (Humeau & Arnal, 2007).

A ce stade, les spermatozoïdes n'ont pas encore acquis leur mobilité. C'est au cours de la migration des spermatozoïdes dans l'épididyme que les spermatozoïdes terminent leur maturation en particulier sur les plans de la morphologie et de la mobilité. C'est également pendant cette migration que les spermatozoïdes acquièrent des sites d'ancrage à la zone pellucide et à la membrane ovocytaire. Un facteur de décapacitation se fixe sur la membrane des gamètes les rendant ainsi inaptes à toute pénétration cellulaire. Cette aptitude ne sera acquise que dans les voies génitales féminines.

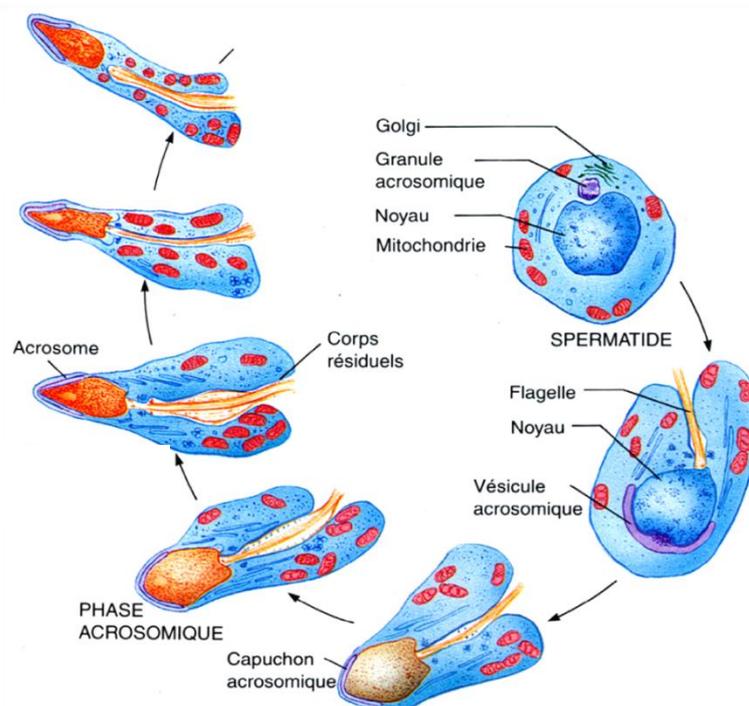


Figure 7 : Schéma de la spermiogenèse, adaptée de M. Mark<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> : [http://udsmmed.u-strasbg.fr/emed/courses/MODULE5B/document/Chapitre\\_1.pdf?cidReq=MODULE5B](http://udsmmed.u-strasbg.fr/emed/courses/MODULE5B/document/Chapitre_1.pdf?cidReq=MODULE5B)

Chez l'homme, le rendement de la spermatogenèse est relativement faible (16 spermatozoïdes à partir d'une spermatogonie Ad) contrairement à d'autres mammifères (singes : 256, rat : 112) (Huckins, 1971).

Les étapes de la spermatogenèse chez un homme avec un caryotype normal sont représentées dans la figure 8.

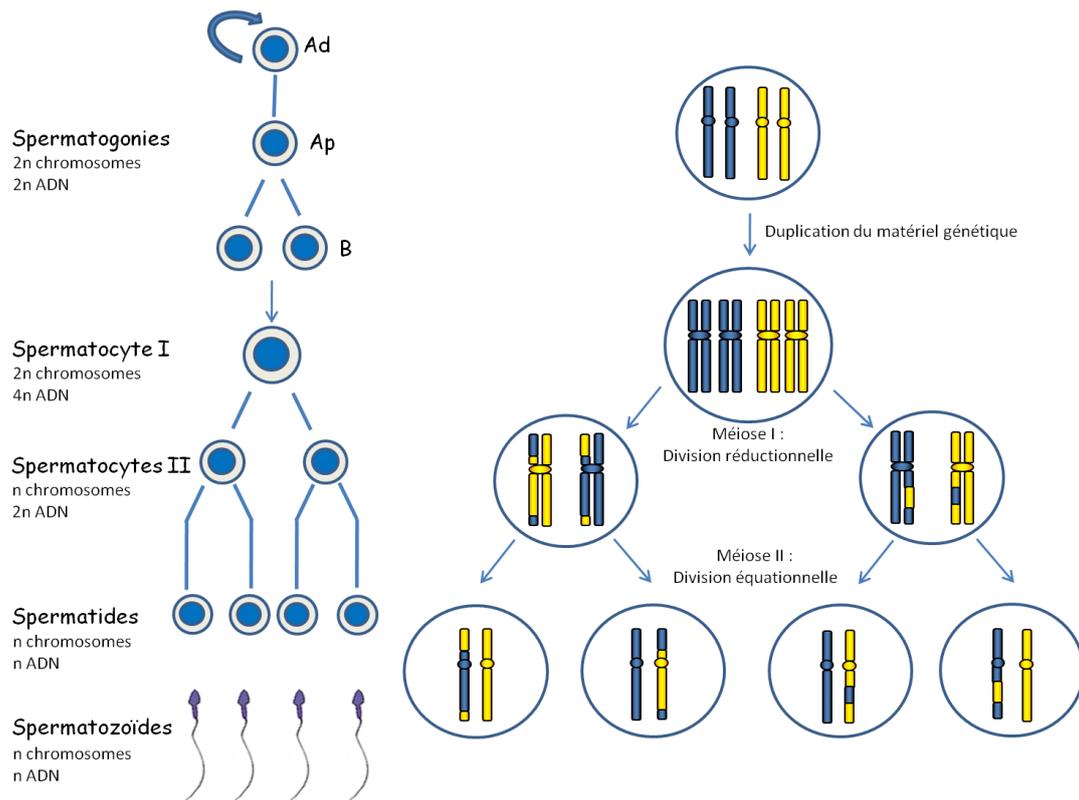


Figure 8 : Schématisation de la spermatogenèse chez l'homme et du contenu chromosomique des cellules au cours des différentes étapes.

## 1.2- Spermatogenèse et tératozoospermie

Une morphologie anormale d'un spermatozoïde peut concerner la tête, la pièce intermédiaire et/ou le flagelle. L'information génétique étant contenu dans les têtes de spermatozoïdes, il ne serait pas étonnant de trouver une corrélation entre la morphologie des têtes et leur équipement chromosomique et ce, malgré un caryotype lymphocytaire normal.

Certains considéraient qu'une tératozoospermie sévère pouvait être une contre-indication à l'ICSI puisque les gamètes concernés pouvaient avoir un taux d'aneuploïdie

plus important (Lee *et al.*, 1996; Calogero *et al.*, 2001). D'autres, au contraire, ont montré que la morphologie des gamètes ne semblait pas avoir d'impact sur les résultats d'ICSI (Nagy *et al.*, 1995; Vegetti *et al.*, 2000). Ainsi, une ICSI serait réalisable en l'absence de spermatozoïdes de morphologie normale dans l'éjaculat. Cette notion reste controversée. Il est évident que l'ICSI ignore les barrières naturelles telles que les voies génitales féminines, les cellules de la *corona radiata* ou encore la zone pellucide et la membrane cytoplasmique. En 2000, Viville *et al.* n'ont pas constaté d'augmentation significative du taux d'aneuploïdie chez trois patients ayant différentes anomalies de la morphologie de leurs gamètes telles qu'une globozoospermie, des flagelles courts ou encore des acrosomes anormaux. En revanche, un taux supérieur d'aneuploïdie a été rapporté chez un patient avec des gamètes macrocéphales (Viville *et al.*, 2000). En 2006, Sun *et al.* ont montré que les taux d'aneuploïdies sont augmentés dans les gamètes avec des flagelles anormaux (Sun *et al.*, 2006). Ainsi, la spermatogenèse apparaît comme pouvant être perturbée malgré un caryotype lymphocytaire normal.

Lorsqu'un caryotype lymphocytaire est anormal, il y a généralement des conséquences sur la ségrégation méiotique dans les gamètes.

## 2- Patients avec un caryotype anormal et ségrégation méiotique

### 2.1- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre

Les patients au caryotype 47,XXY homogène ont très souvent une azoospermie sécrétoire, cependant, des patients avec quelques spermatozoïdes dans l'éjaculat et quelques cas de fertilité chez ces derniers ont été rapportés (Terzoli *et al.*, 1992; Greco *et al.*, 2008).

En théorie, la ségrégation méiotique chez un patient Klinefelter se produit comme indiqué dans la figure 9.

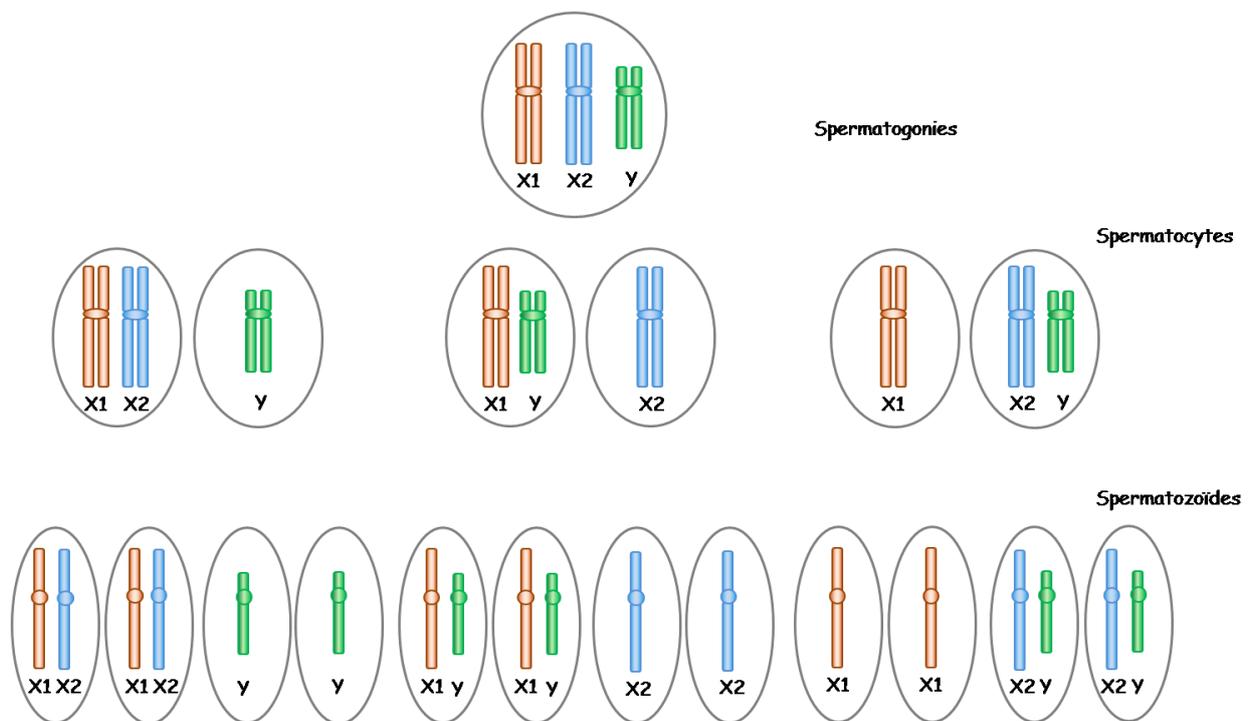


Figure 9 : Ségrégation méiotique théorique des gonosomes dans les gamètes d'un patient ayant un syndrome de Klinefelter (47,XXY).

Théoriquement, 50% des gamètes produits sont chromosomiquement normaux pour les chromosomes sexuels (X ou Y) et il y a deux fois plus de gamètes avec un X qu'avec un Y. De plus, 50% des gamètes sont chromosomiquement déséquilibrés avec une disomie gonosomique. Parmi ceux-ci, il y a deux fois plus de gamètes XY que XX.

Les études réalisées sur la ségrégation méiotique de ces patients indiquent une augmentation de la fréquence d'aneuploïdies des chromosomes sexuels dans les gamètes pouvant être responsables de la formation de fœtus chromosomiquement déséquilibrés au niveau des gonosomes (47,XXX ou 47,XXY) (Shi & Martin, 2001). Il est de plus rapporté une augmentation des fréquences d'aneuploïdies pour les autosomes, toutefois, les augmentations observées pour les autosomes seraient plutôt liées à l'oligozoospermie qu'au syndrome de Klinefelter lui-même (Morel *et al.*, 2003).

Les patients avec un caryotype 47,XXY sont souvent fertiles. Cependant, le chromosome Y supplémentaire peut parfois perturber la spermatogenèse et entraîner une

oligozoospermie (Hauschka *et al.*, 1962). La ségrégation méiotique dans les gamètes se produit, en théorie, comme indiqué par la figure 10.

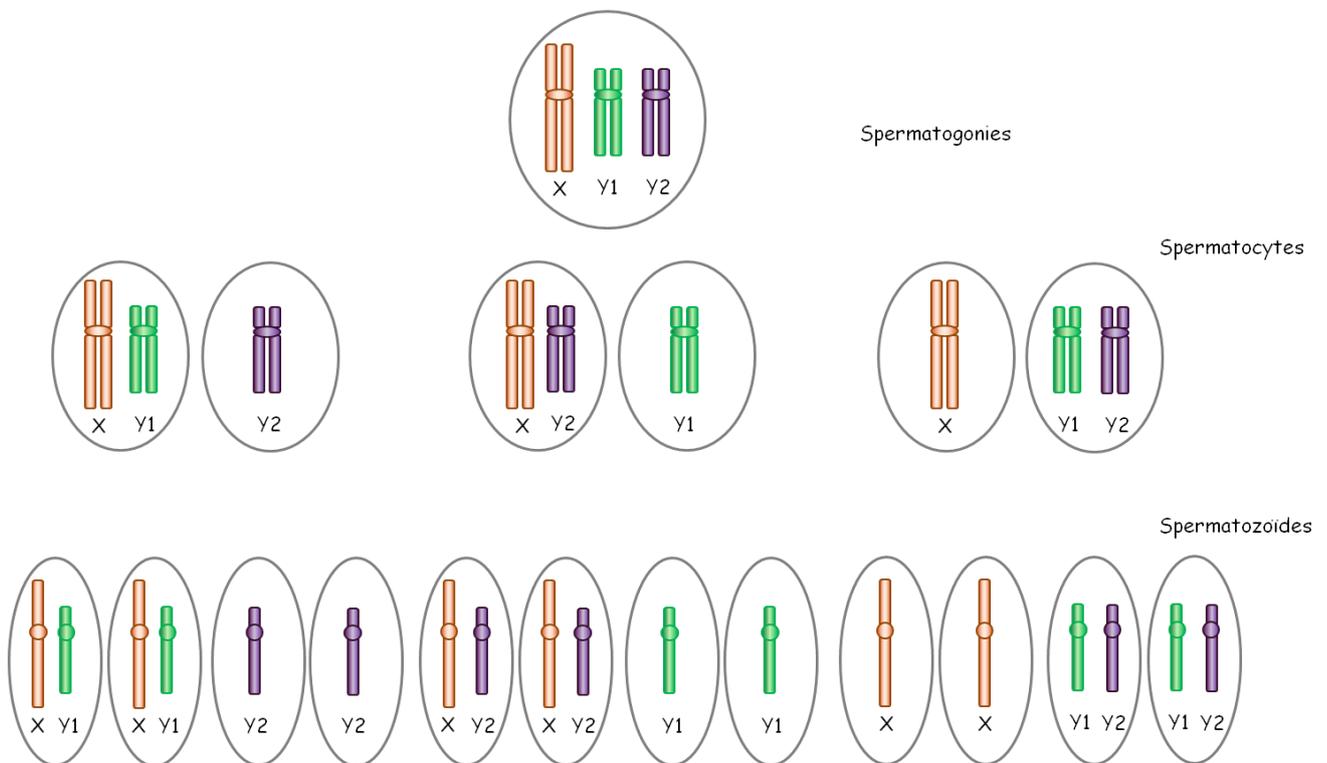


Figure 10 : Ségrégation méiotique théorique des gonosomes dans les gamètes d'un patient avec un caryotype 47,XYY.

Théoriquement, à l'issue de la ségrégation méiotique, 50% de spermatozoïdes normaux sont produits (X ou Y) et il y a deux fois plus de gamètes avec un Y qu'avec un X. De plus, 50% des gamètes sont chromosomiquement déséquilibrés avec une disomie gonosomique. Parmi ceux-ci, il y a deux fois plus de gamètes XY que YY (Mercier, 1996).

En fait, le Y surnuméraire serait souvent éliminé lors de la méiose (Chandley *et al.*, 1976) mais des cellules XYY peuvent tout de même subir une méiose complète et ainsi produire des spermatozoïdes aneuploïdes (Morel *et al.*, 1999).

Enfin, des patients peuvent également avoir une anomalie de nombre en mosaïque comme cela fut rapporté en 1997 avec le cas d'une trisomie 8 en mosaïque 47,XY,+8 [8] /46,XY [92] (Mercier & Bresson, 1997) ou comme l'exemple d'une trisomie 18

(47,XY,+18/46,XY). La ségrégation méiotique se produisant dans ce dernier cas est indiquée par la figure 11.

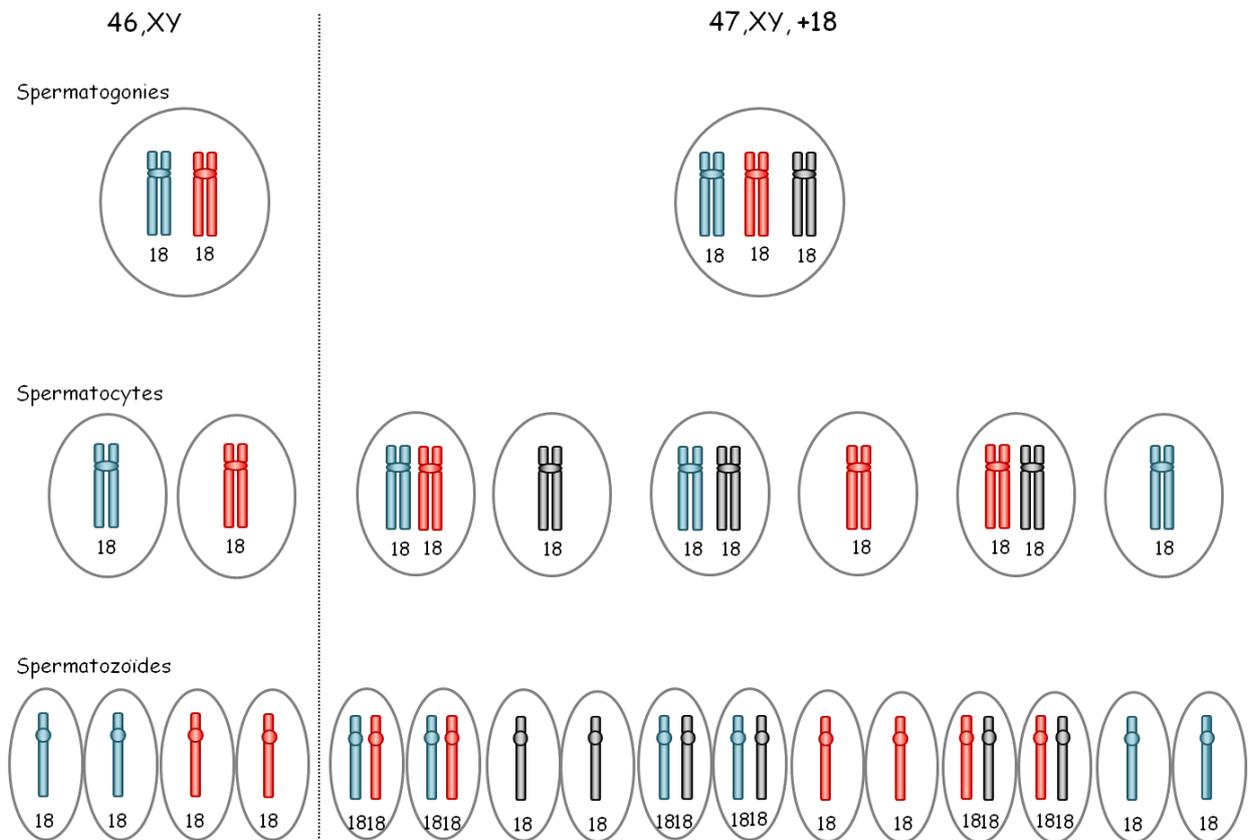


Figure 11 : Ségrégation méiotique dans les gamètes d'un patient avec une anomalie chromosomique de nombre en mosaïque (46,XY/47,XY,+18).

A l'issue de la ségrégation méiotique, il y a une production de gamètes chromosomiquement normaux pour le chromosome 18 et d'autres avec une disomie 18. A partir d'une spermatogonie normale, nous obtenons 100% de gamètes avec un seul chromosome 18. A partir d'une spermatogonie avec un chromosome 18 supplémentaire, nous obtenons 50% de gamètes normaux pour le 18 et 50% de gamètes avec une disomie 18. Le pourcentage de spermatozoïdes au total avec une disomie du 18 va donc dépendre du taux de mosaïque présent au niveau des cellules germinales.

La ségrégation méiotique devient bien différente lorsqu'un patient présente un caryotype avec une anomalie chromosomique de structure.

## 2.2- Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure

### ✚ Translocations robertsoniennes

Au stade pachytène de méiose I, la présence d'une translocation robertsonienne nécessite la formation d'un trivalent afin de permettre l'association des régions homologues des deux acrocentriques normaux concernés au chromosome dérivé. La formation du trivalent, en théorie, peut se faire en configuration *cis* (les deux chromosomes normaux sont du même côté par rapport au dérivé) ou en configuration *trans* (chaque chromosome normal se situe de part et d'autre du chromosome dérivé (Figure 12).

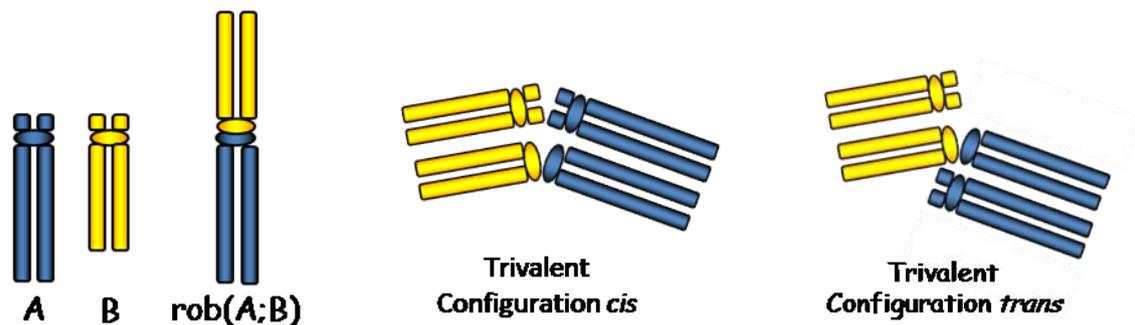


Figure 12 : Schéma du trivalent en configuration *cis* et schéma théorique du trivalent en configuration *trans* lors d'une translocation robertsonienne entre les chromosomes A et B.

La séparation des chromosomes homologues (ou ségrégation méiotique) se fait selon 3 modes. Le mode de ségrégation dit alterne implique que les deux chromosomes acrocentriques normaux ségrègent dans un spermatocyte II et le chromosome dérivé dans l'autre spermatocyte II. Se produit ensuite la 2<sup>ème</sup> division méiotique équationnelle qui forme des spermatides (n chromosomes/n ADN) avec un équipement chromosomique identique à celui des spermatozoïdes. A l'issue du mode alterne, les spermatozoïdes formés seront normaux (23 chromosomes) ou équilibrés (22 chromosomes) en ce qui

concerne les chromosomes étudiés (Figure 13). Ainsi, la fécondation d'un ovocyte normal par ce type de gamètes permettra la formation d'un embryon chromosomiquement normal ou équilibré pour les chromosomes étudiés.

En pratique, lors de la formation du trivalent, la configuration *cis* est exclusive (Vidal *et al.*, 1982; Luciani *et al.*, 1984; Templado *et al.*, 1984). Cette configuration conduit à un mode de ségrégation préférentiel qui est le mode alterne et donc à une production majoritaire de spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés.

Le deuxième mode de ségrégation méiotique dont peuvent être issus les spermatozoïdes est le mode adjacent. Celui-ci se définit par la ségrégation du chromosome dérivé dans une cellule avec l'un ou l'autre des deux acrocentriques normaux. Ce mode de ségrégation ne peut former que des gamètes chromosomiquement déséquilibrés. Les gamètes formés ont alors une disomie d'un des deux acrocentriques (23 chromosomes) ou une nullisomie du même acrocentrique (22 chromosomes) (Figure 13). Si ces gamètes fécondent des ovocytes chromosomiquement normaux, des embryons trisomique ou monosomique seront respectivement formés.

Enfin, le dernier mode, beaucoup plus rare, est le mode 3:0. Les trois chromosomes impliqués dans l'anomalie ségrègent ensemble dans une cellule. Un gamète aura donc une disomie des deux acrocentriques impliqués dans l'anomalie (24 chromosomes) et l'autre une nullisomie de ces mêmes chromosomes (21 chromosomes) (Figure 13). Si ces gamètes fécondent des ovocytes chromosomiquement normaux, un embryon déséquilibré à 47 chromosomes (présence de deux trisomies) ou un embryon déséquilibré à 44 chromosomes (présence de deux monosomies) seront respectivement formés.

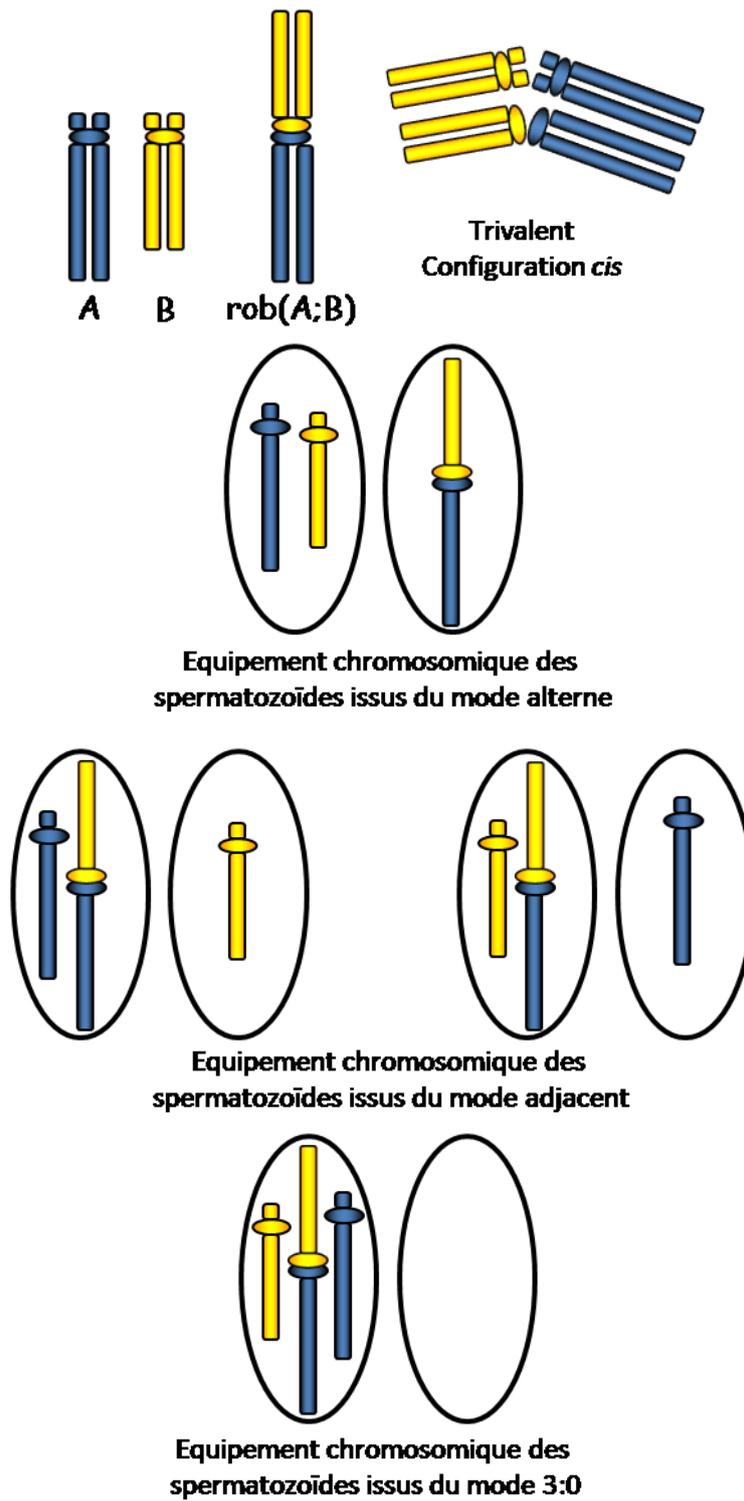


Figure 13 : Equipement chromosomique des gamètes d'un patient porteur d'une translocation robertsonienne 45,XY,rob(A;B)(q10;q10) issus des trois modes de ségrégation induits par la formation du trivalent.

## ✚ Translocations réciproques équilibrées

Une translocation réciproque équilibrée engendre cinq modes de ségrégation méiotique. Si nous considérons une translocation entre des chromosomes A et B, le quadrivalent est alors constitué du chromosome A, du chromosome homologue dérivé -der(A), du chromosome B et du chromosome dérivé -der(B); l'identification d'un chromosome dérivé dépend du centromère présent (Figure 14).

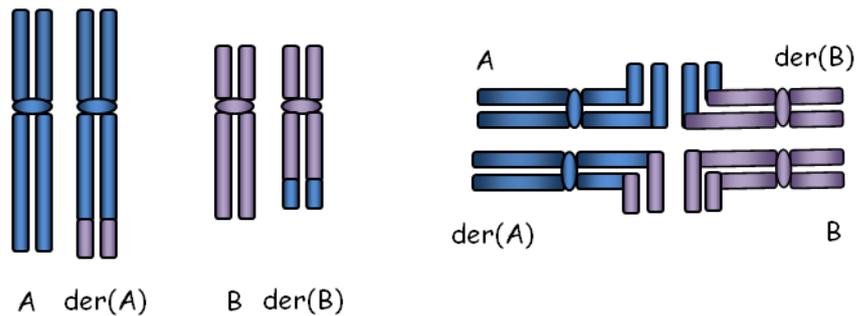
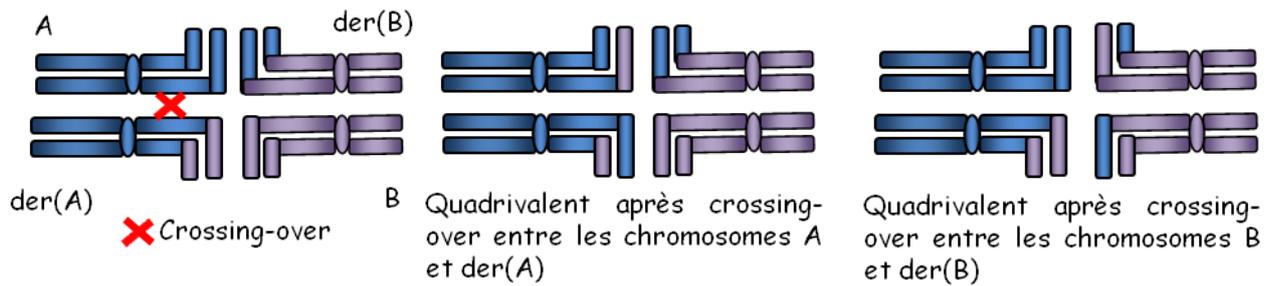


Figure 14 : Schéma du quadrivalent formé au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une translocation réciproque équilibrée entre les chromosomes A et B.

Le mode alterne (Figure 15) consiste en la ségrégation des deux chromosomes normaux A et B ensemble et dans un autre gamète, des deux chromosomes transloqués der(A) et der(B). Les gamètes obtenus sont normaux ou équilibrés (23 chromosomes). De plus, un crossing-over (enjambement entre deux chromatides) peut se produire dans le segment interstitiel entre le centromère et le point de cassure. Dans ce cas, si le nombre de recombinaisons est impair, nous obtenons 25% de gamètes chromosomiquement normaux, 25% de gamètes chromosomiquement équilibrés ainsi que 50% de gamètes chromosomiquement déséquilibrés (23 chromosomes) avec le même contenu chromosomique que celui obtenu lors du mode de ségrégation adjacent I en l'absence de crossing-over.



Mode alterne

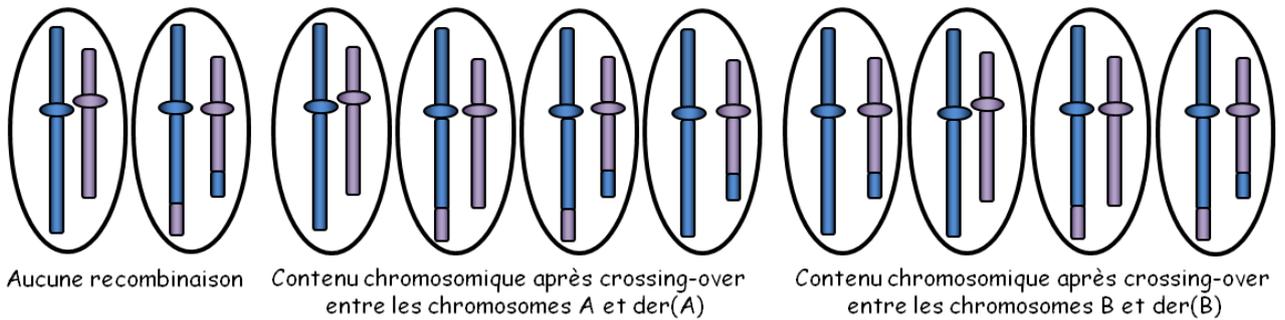
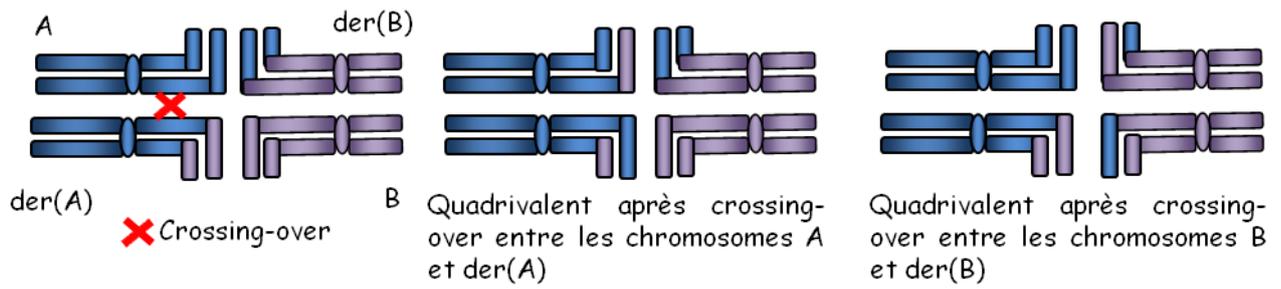


Figure 15 : Quadrivalent formé au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une translocation réciproque équilibrée  $t(A;B)$ , quadrivalents après crossing-over et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique selon le mode alterne.

Le mode adjacent I (Figure 16 A-) se définit par la ségrégation d'un chromosome normal avec le chromosome non homologue dérivé ( $A+der(B)$  et  $B+der(A)$ ). Les gamètes formés ont tous 23 chromosomes mais ils ont soit une disomie partielle du A associée à une nullisomie partielle du B soit l'inverse. Une fécondation d'un ovocyte chromosomiquement normal par ce type de gamètes forme un embryon avec une trisomie partielle du chromosome A associée à une monosomie partielle du chromosome B ou un embryon avec une trisomie partielle du B associée à une monosomie partielle du A.

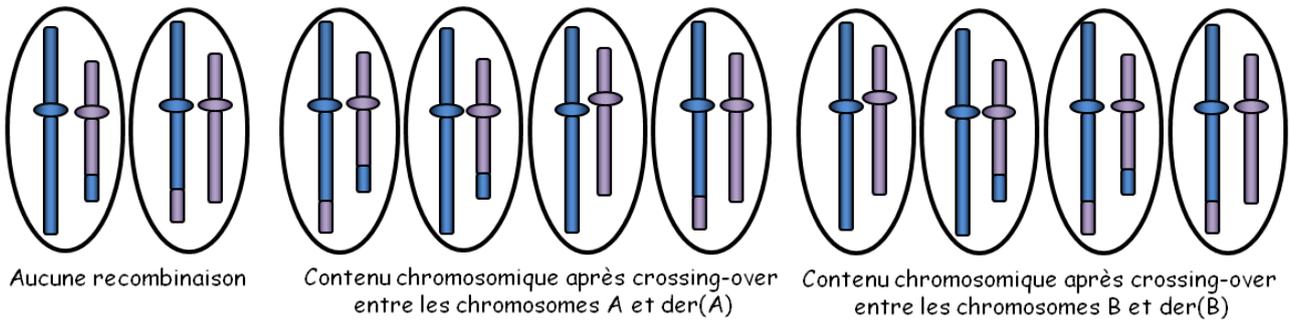
Une recombinaison entre le centromère et le point de cassure suivie d'une ségrégation de type adjacent I entraîne, en plus, la formation de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés, comme ceux obtenus à l'issue d'une ségrégation alterne en l'absence ou avec un nombre pair de crossing-over. Nous obtenons donc 50% de gamètes chromosomiquement déséquilibrés, 25% de gamètes normaux et 25% de gamètes chromosomiquement équilibrés.

Le mode adjacent II (Figure 16 B-) est défini par la ségrégation d'un chromosome normal avec son homologue dérivé ( $A+der(A)$  et  $B+der(B)$ ). Les gamètes formés sont chromosomiquement déséquilibrés avec 23 chromosomes. Si un nombre impair de crossing-over se produit entre le chromosome A et le  $der(A)$ , cela entraîne, en plus, la formation d'un gamète avec une disomie du chromosome A associée à une nullisomie du chromosome B ou d'un gamète avec une disomie partielle du chromosome A associée à une disomie partielle du chromosome B et une nullisomie partielle des chromosomes A et B. A l'inverse, si un crossing-over a lieu entre le chromosome B et le  $der(B)$ , un gamète avec une disomie du chromosome B associée à une nullisomie du chromosome A est produit ainsi qu'un gamète avec une disomie partielle du chromosome A, une disomie partielle du chromosome B associée à une nullisomie partielle du chromosome A et une nullisomie partielle du chromosome B.



A-

Mode adjacent I



B-

Mode adjacent II

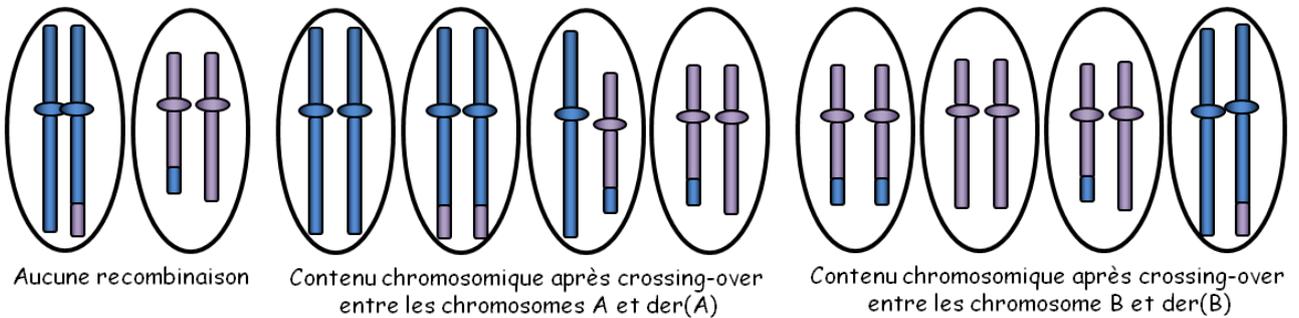


Figure 16 : Quadrivalent formé au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une translocation réciproque équilibrée  $t(A;B)$ , quadrivalents après crossing-over et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique selon le mode adjacent I (A-) et adjacent II (B-).

Le mode de ségrégation 3:1 (Figure 17 A-) induit la formation de gamètes constitués de 3 des 4 chromosomes formant le quadrivalent et de gamètes composés d'un seul des 4 chromosomes du quadrivalent. Tous les gamètes formés sont chromosomiquement déséquilibrés à 24 ou 22 chromosomes. Le mode 3:1 est dit tertiaire lorsqu'il forme un gamète avec une double disomie partielle ou une double nullisomie partielle et le mode 3:1 est dit avec échange lorsqu'il forme des gamètes avec une disomie ou une nullisomie totale.

Enfin, le mode de ségrégation 4:0 (Figure 17 B-) entraîne la formation de gamètes avec les 4 chromosomes constituant le quadrivalent ou aucun de ceux-ci. Les gamètes sont chromosomiquement déséquilibrés avec 25 ou 21 chromosomes.

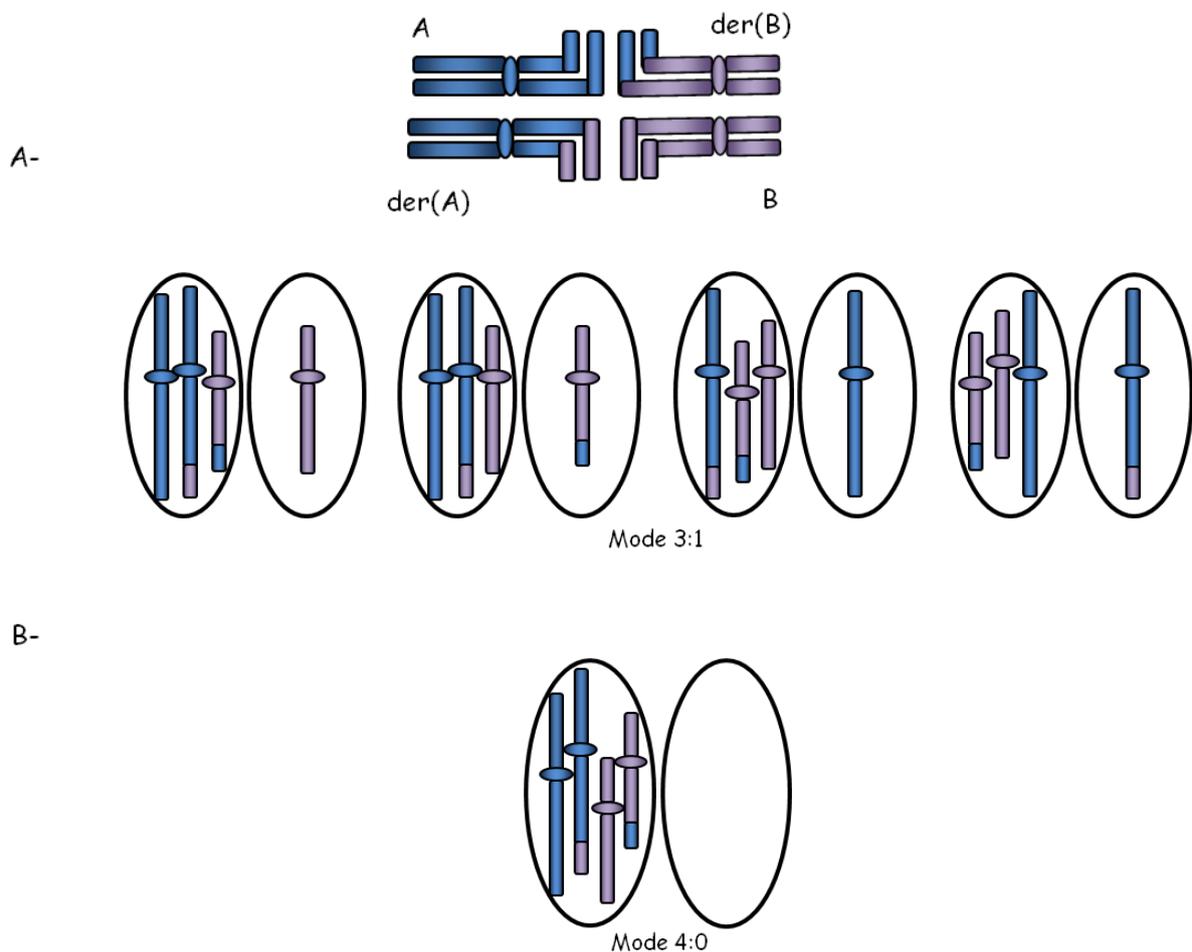


Figure 17 : Quadrivalent formé au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une translocation réciproque équilibrée  $t(A;B)$  et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique selon le mode 3:1 (A-) et 4:0 (B-).

### ✚ Réarrangements chromosomiques complexes

Concernant les CCR de type 1, lors du stade pachytène en méiose I, les 6 chromosomes impliqués dans le réarrangement (les 3 chromosomes normaux et les 3 dérivés) forment un hexavalent pour s'apparier. Si la ségrégation méiotique est de type 3:3 (ségrégation symétrique), jusqu'à 20 gamètes avec une constitution chromosomique différente peuvent être produits (2 gamètes chromosomiquement équilibrés issus d'un mode alterne et 18 gamètes chromosomiquement déséquilibrés issus d'un mode adjacent). Si la ségrégation méiotique n'est pas symétrique (4:2, 5:1 ou 6:0), beaucoup de gamètes chromosomiquement déséquilibrés différents sont produits. Cela peut entraîner des fausses couches extrêmement précoces de par la formation d'embryons avec un équipement chromosomique déséquilibré. Cependant, il y a probablement une tendance à une ségrégation méiotique symétrique favorisant le mode alterne et donc une probabilité non négligeable d'avoir la naissance d'un fœtus normal (Walker & Bocian, 1987). Quant aux naissances de fœtus chromosomiquement déséquilibrés, elles résulteraient le plus souvent d'un mode adjacent I lors d'une ségrégation symétrique (environ 80%) ou d'une ségrégation de type 4:2 (environ 20%).

En présence d'un CCR de type 2, beaucoup de gamètes chromosomiquement déséquilibrés peuvent être produits. Toutefois, chez 70% des patients porteurs de CCR équilibrés impliquant davantage de points de cassure que de chromosomes, une recombinaison peut augmenter la probabilité d'obtenir un fœtus normal en simplifiant le réarrangement, c'est-à-dire, en formant une translocation réciproque équilibrée (Madan *et al.*, 1997).

Enfin, chez des patients avec un CCR de type 3, *a priori*, deux quadrivalents indépendants se forment au moment de l'appariement. La probabilité d'avoir des gamètes chromosomiquement déséquilibrés va donc dépendre du comportement méiotique de chaque translocation.

### ✚ Inversions paracentriques

Lorsqu'un homme est porteur d'une inversion paracentrique, l'appariement entre le chromosome A et le chromosome A inversé ne peut se produire que par la formation

d'une boucle d'inversion (Figure 18 A-). En l'absence ou avec un nombre pair de crossing-over au sein de la boucle, il y a alors formation de gamètes avec la chromatide normale (50%) et de gamètes avec la chromatide porteuse de l'inversion (50%). Les embryons formés par ces gamètes sont alors chromosomiquement normaux ou équilibrés pour les chromosomes étudiés. Si un nombre impair de crossing-over a lieu au sein de la boucle d'inversion (Figure 18 B-), une chromatide est alors dicentrique (deux centromères) et une autre acentrique (aucun centromère). Les probabilités d'obtenir un gamète normal, équilibré, avec un chromosome acentrique et avec un chromosome dicentrique sont chacune de 25%. Ces recombinants (chromosomes nouvellement formés à l'issue d'un crossing-over) forment rarement des foetus car les dicentriques ont tendance à se casser lors des divisions cellulaires et les acentriques sont généralement perdus. Toutefois, des chromosomes recombinants ont été observés chez des nouveau-nés (Pettenati *et al.*, 1995; Lefort *et al.*, 2003) et le risque d'avoir un recombinant viable a été estimé à 3,8% (Pettenati *et al.*, 1995). Cependant, ce risque a été considéré comme surévalué par l'équipe de Sutherland (Sutherland *et al.*, 1995).

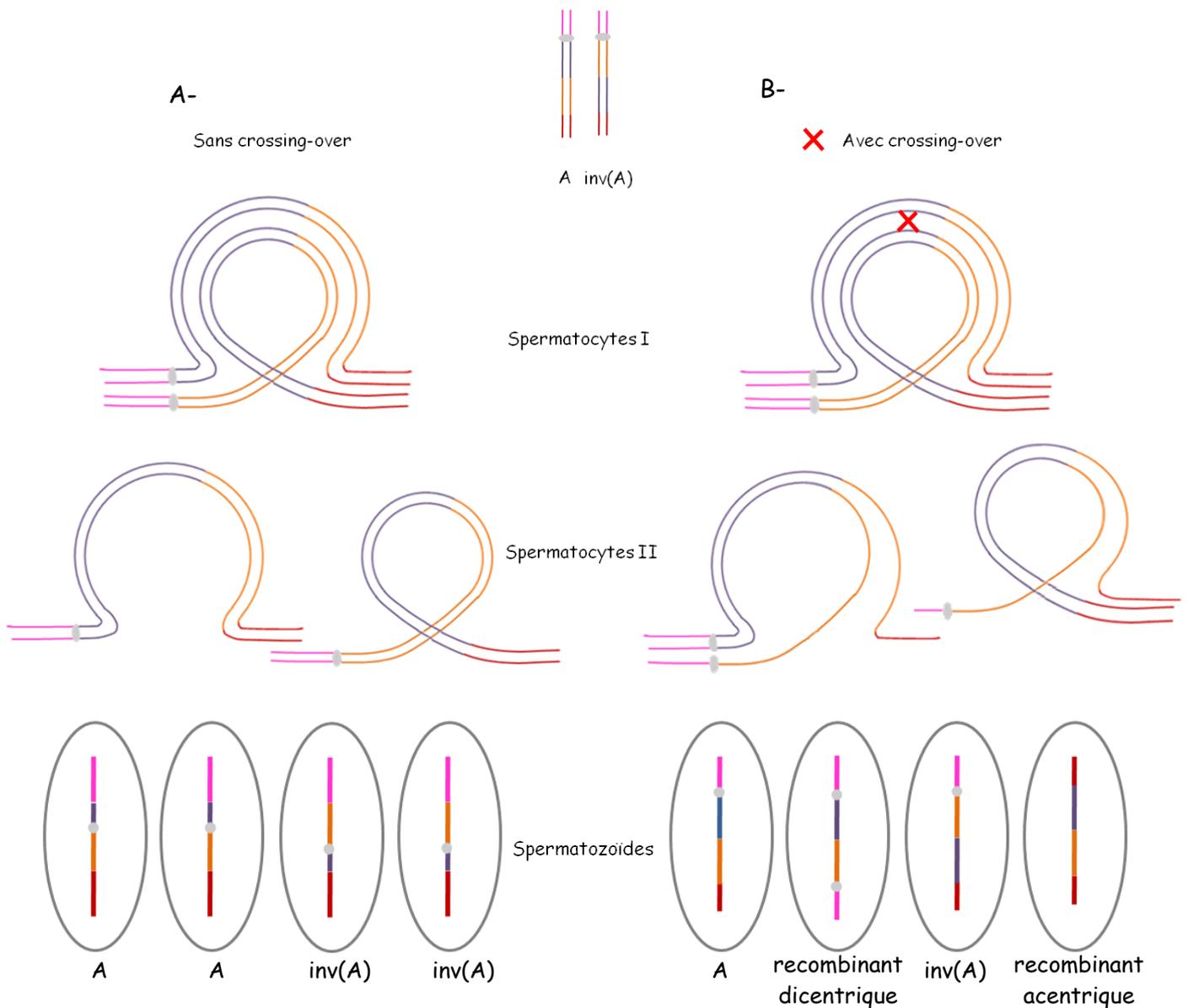


Figure 18 : Boucle d'inversion formée au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une inversion paracentrique du chromosome A et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique en l'absence ou avec un nombre pair de crossing-over au sein de la boucle (A-) et avec crossing-over en nombre impair au sein de la boucle (B-).

### ⚡ Inversions péricentriques

Si un patient est porteur d'une inversion péricentrique, l'appariement entre le chromosome A normal et l'homologue inversé se fera par l'intermédiaire d'une boucle d'inversion (Figure 19). Comme décrit pour les inversions paracentriques, l'absence d'un nombre pair de crossing-over au sein de la boucle (Figure 19 A-) entraîne la formation de gamètes porteurs de la chromatide normale (50%) et de gamètes porteurs de la

chromatide inversée (50%). Les embryons formés sont, respectivement, chromosomiquement normaux ou équilibrés. Si un nombre impair de crossing-over a lieu au sein de la boucle d'inversion (Figure 19 B-), il y a alors, d'une part, la formation d'une chromatide avec une duplication d'une partie du bras court et une délétion d'une partie du bras long (dup(p)/del(q)) et d'autre part, la formation d'une chromatide avec une délétion d'une partie du bras court associée à une duplication d'une partie du bras long (del(p)/dup(q)). Les gamètes présentant ce type de chromatides sont des gamètes recombinants. Lors d'un nombre impair d'enjambements au sein de la boucle, les probabilités d'avoir un gamète normal, un gamète équilibré, un gamète avec une duplication partielle du bras court associée à une délétion partielle du bras long et l'inverse, à savoir un gamète avec une délétion partielle du bras court associée à une duplication partielle du bras long sont chacune égale à 25%. Si un spermatozoïde recombinant féconde un ovocyte chromosomiquement normal, l'embryon sera porteur d'une trisomie partielle associée à une monosomie partielle.

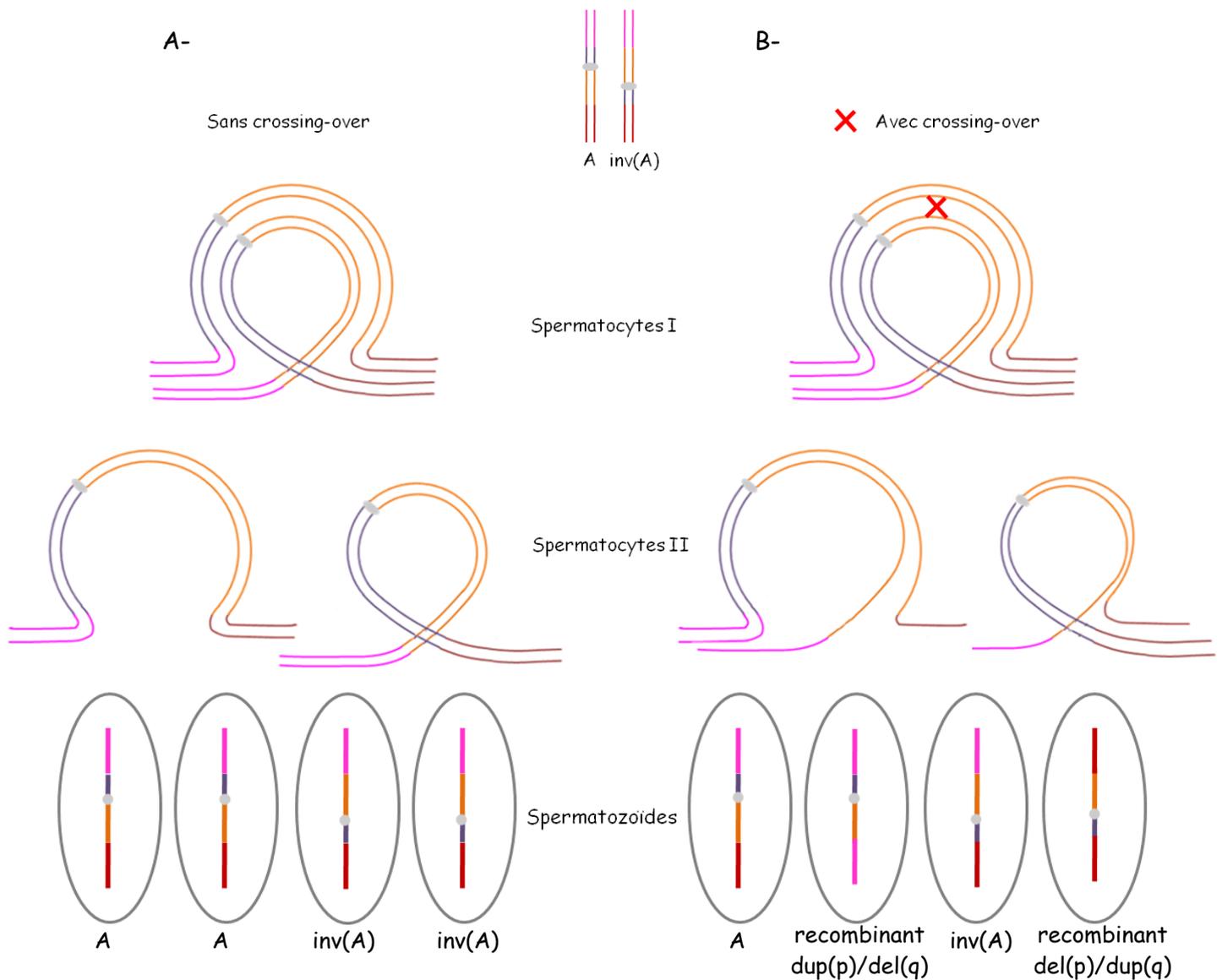


Figure 19 : Boucle d'inversion formée au stade pachytène de méiose I dans les gamètes d'un homme porteur d'une inversion péricentrique du chromosome A et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique en l'absence ou avec un nombre pair de crossing-over au sein de la boucle (A-) et avec crossing-over en nombre impair au sein de la boucle (B-).

### 3- Analyse de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes

Au départ, des études sur spermatozoïdes éjaculés ont été consacrées aux anomalies du chromosome Y en utilisant la coloration à la quinacrine (Barlow & Vosa, 1970; Pearson & Bobrow, 1970; Pearson *et al.*, 1970).

La difficulté pour l'étude de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes résidait principalement dans le fait que ces cellules soient amitotiques (incapables de se diviser par mitoses). Ainsi, l'obtention d'un caryotype ne fut possible que par la réalisation d'une fécondation afin d'obtenir des métaphases haploïdes de spermatozoïdes. En 1976, une équipe a mis au point une technique de fécondation *in vitro* hétérosécifique entre des ovocytes dépellucidés de hamster doré et des spermatozoïdes humains (Yanagimachi & Yanagimachi, 1976). Cette technique originale a permis de montrer que les hommes porteurs d'anomalies chromosomiques (notamment les translocations) pouvaient avoir une grande variabilité des taux d'anomalies chromosomiques dans leurs spermatozoïdes. Cependant, cette technique est lourde à mettre en œuvre et ne permet l'étude que d'un nombre limité de caryotypes de spermatozoïdes. Ainsi, il aura fallu près de 20 années pour obtenir 10 000 caryotypes de spermatozoïdes humains (Guttenbach *et al.*, 1997).

Au cours des années 1980, la cytogénétique moléculaire sur cellules lymphocytaires s'est développée avec l'hybridation *in situ* (HIS) (Harper & Saunders, 1981). La détection de remaniements chromosomiques plus fins, non visibles en cytogénétique conventionnelle, est alors devenue possible. La cytogénétique moléculaire a permis la détection de séquences d'acides nucléiques spécifiques (ADN : acide désoxyribonucléique) à l'aide de sondes nucléiques complémentaires marquées par des éléments radioactifs. En 1986, Pinkel *et al.* (Pinkel *et al.*, 1986) ont utilisé le protocole d'HIS décrit par Harper mais en appliquant des sondes de séquences répétées, marquées par la biotine, suivie d'une immunorévélation à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome : fluoresceine isothiocyanate (FITC), ainsi naissait l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Cette technique a d'abord été utilisée sur des cellules lymphocytaires en interphase et en métaphase puis dans les années 1990 sur spermatozoïdes en interphase (Guttenbach *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1993; Robbins *et al.*, 1993). Elle permet une étude de la ségrégation méiotique bien plus aisée, sur un grand nombre de cellules (jusqu'à 10 000 spermatozoïdes étudiés par patient). L'utilisation de la technique de FISH sur spermatozoïdes se fait grâce à plusieurs types de sondes. Les sondes commercialisées couplées à des fluorochromes sont aujourd'hui à notre disposition dont des sondes centromériques (CEP : chromosome enumeration probe), des sondes locus-spécifique

(LSI : locus specific identifier), des sondes subtélomériques, des peintures partielles ou totales (PCP - partial chromosome paint, WCP - whole chromosome paint). Il existe également des sondes BACs (bacterial artificial chromosomes) pour lesquelles il est nécessaire d'extraire l'ADN contenu dans des bactéries transformées et de réaliser un marquage par des fluorochromes. Selon l'anomalie de structure, les sondes seront choisies de façon différente (annexe 1).

Certaines équipes ont également utilisé une autre approche qu'est le PRINS (primed *in situ* labeling). Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques de synthèse qui s'apparient aux séquences complémentaires de l'ADN. Cela sert de point de départ à une réaction d'élongation catalysée par la Taq polymérase. Des nucléotides libres sont incorporés, parmi eux, certains sont fluorescents afin de permettre la visualisation par un microscope à épifluorescence (technique d'épifluorescence développée par Hobbie *et al.*, 1977). Cette technique a été adaptée pour l'hybridation des noyaux spermatiques (Quenesson *et al.*, 1995; Pellestor *et al.*, 1995a; Pellestor *et al.*, 1995b). Ceci étant, avec ces techniques, il peut s'avérer nécessaire de faire une mise au point avec chaque couple d'amorces nouvellement utilisé. Cela alourdit la technique d'un point de vue de la durée.

Enfin, des analogues d'acides nucléiques, plus précisément, les PNAs (peptide nucleic acids) ont été développés en 1991 (Nielsen *et al.*, 1991). Ces molécules ont été conçues pour des analyses de liaison avec l'ADN et s'utilisent en cytogénétique moléculaire depuis quelques années. La technique PNA-FISH, élaborée en 2001, permet de réaliser un marquage de 3 chromosomes en une seule étape (Taneja *et al.*, 2001). L'équipe de Pellestor *et al.* a ensuite adapté cette technique au marquage *in situ* des spermatozoïdes (Pellestor *et al.*, 2003). Cette nouvelle approche peut se révéler intéressante mais elle n'est pas encore utilisée classiquement en routine.

Ceci étant, la grande majorité des laboratoires utilise la FISH qui est la technique de référence pour l'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes.

### III- Exploration génétique de l'infertilité masculine

#### III.A- Le chromosome Y et AZF

##### 1- Constitution du chromosome Y et origine des microdélétions

Le chromosome Y, de 60 Mb, a été décrit par Painter comme un élément petit et non apparié (Painter, 1921). En 1923, Painter conclut en l'existence de 46 autosomes et 2 gonosomes (X et Y) chez l'homme (Painter, 1923). Le chromosome Y est constitué de régions pseudo-autosomiques communes au chromosome X. Ces régions PARs (pseudo-autosomal region) 1 (2,6 Mb) et 2 (0,32 Mb) permettent une recombinaison interchromosomique avec le chromosome X. Le chromosome Y contient une région qui lui est propre (MSY : male specific Y chromosome). Cette partie ne recombine jamais avec le chromosome X. Elle constitue près de 95% de la longueur du Y. Dans la partie distale de cette région, sur le bras long, il y a une zone d'hétérochromatine (chromatine majoritairement condensée et donc pauvre en gènes) non fonctionnelle plus ou moins étendue selon les hommes. La partie fonctionnelle (donc euchromatique) de la région MSY s'étend sur environ 23 Mb (Ravel *et al.*, 2006) dont 8 Mb sur le bras court et près de 15 Mb sur le bras long (revu par Li *et al.*, 2008). Cette région MSY est constituée de trois régions selon la nature des gènes qui les constituent : une région appelée X-transposée de 3,4 Mb (99% d'homologie avec la région Xq21.2, gènes transposés de l'X), pauvre en gènes et riche en séquences répétées notamment en séquences LINE 1 (long interspersed nuclear elements 1), des régions contenant des gènes X-dégénérés (8,5 Mb) présentes sur le bras court et le bras long du chromosome Y et enfin des régions dites ampliconiques (10,2 Mb) (gènes en multiples copies) (Skaletsky *et al.*, 2003; Ravel & Siffroi, 2009) (Figure 20).

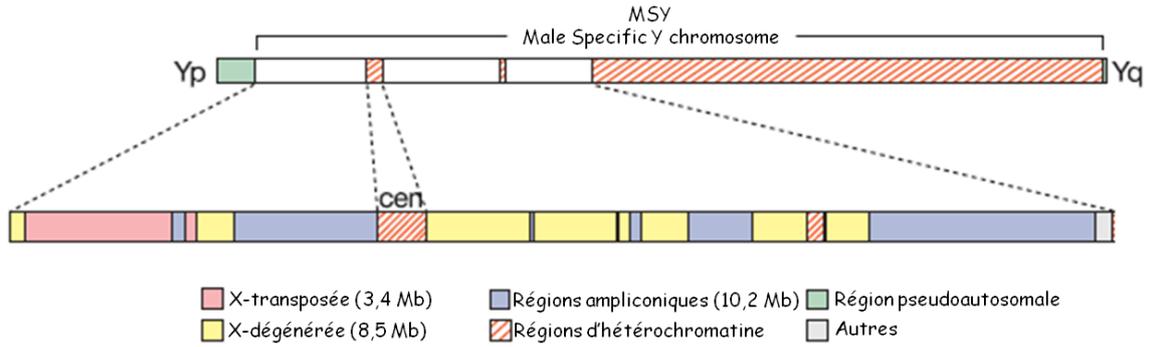


Figure 20 : Représentation du chromosome Y en fonction du type de régions (X-transposées, dégénérées, ampliconiques, hétérochromatine) (Adaptée de Skaletsky *et al.*, 2003).

Ces séquences renferment de nombreux pseudogènes et 16 gènes transcrits majoritairement en protéines ubiquitaires. Le chromosome Y est indispensable à la survie de notre espèce puisqu'il est impliqué dans le déterminisme testiculaire et la production de spermatozoïdes. En effet, au sein de cette région MSY se trouve le gène SRY (sex-determining region of Y chromosome) en Yp11.3. Ce gène de différenciation testiculaire n'est, en principe, jamais délété chez un homme de morphotype masculin. Il est cependant rapporté de rares cas d'hommes XX dont le phénotype est masculin, sans ambiguïté sexuelle et pourtant sans SRY (Zenteno *et al.*, 1997).

Pendant la vie embryonnaire, la gonade encore indifférenciée est sous la dépendance d'un facteur de détermination testiculaire (TDF : testis determining factor) codé par le gène SRY. Il intervient dans la cascade d'activation et de répression géniques qui aboutit à la différenciation du testicule, du tractus génital mâle et des organes génitaux externes et à la régression des canaux müllériens.

A l'heure actuelle, 27 gènes ont été identifiés sur le chromosome Y, 9 sur le bras court et 18 sur le bras long. Parmi ces 18, 12 sont exprimés de façon spécifique dans les testicules et sont nécessaires à la production de spermatozoïdes normaux (Cram *et al.*, 2006). D'autre part, en 1976, la première association fut faite entre infertilité masculine et délétion du chromosome Y, plus précisément entre la région AZF et la spermatogenèse (Tiepolo & Zuffardi, 1976). Dix ans après, la biologie moléculaire a permis de subdiviser le chromosome Y en 7 régions (Verghnaud *et al.*, 1986). C'est entre

les intervalles 5 et 6 que se situe AZF. Une ou plusieurs microdélétions de tout ou partie de la région AZF en Yq aurait lieu pendant la gamétogenèse ou pendant le développement précoce préimplantatoire et pourrait être la résultante d'une déficience des enzymes responsables de la réparation de l'ADN. Ces microdélétions résulteraient de recombinaison entre des blocs de séquences répétées (éléments rétroviraux, séquences palindromiques de répétitions en tandem, plusieurs gènes en multiples copies) flanquant les intervalles délétés (Cram *et al.*, 2006). Les familles de gènes DAZ (deleted in azoospermia), RBMY (RNA-binding motif Y chromosome) et TSPY (testis-specific protein Y-encoded) sont présents en un nombre de copies variable chez les hommes et peuvent être le siège de recombinaisons responsables de microdélétions.

## 2- Types de microdélétions, prévalence et impacts sur la fertilité

Les anomalies génétiques clairement rattachées à des troubles de la fertilité masculine sont rares. Les microdélétions du chromosome Y en font partie. Elles concernent 1 homme sur 2500 dans la population générale (Fellmann, 2006). La grande majorité apparaît *de novo*. Elles font partie des causes génétiques d'infertilité les plus fréquentes (Reijo *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 1996). Des études rapportent jusqu'à 20% de microdélétions dans AZF chez les hommes présentant des anomalies de la spermatogenèse et moins de 5 millions/mL de spermatozoïdes (Vogt *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 1996; Foresta *et al.*, 2001). Aucune microdélétion du chromosome Y chez des hommes normospermiques n'a été rapportée à ce jour. En revanche, il existe des microdélétions du chromosome Y chez des patients fertiles mais qui ne sont pas normospermiques (Krausz & McElreavey, 2001).

En 1992, une équipe américaine a établi une cartographie des régions délétées en se basant sur la détection de STS (sequence-tagged sites) (Vollrath *et al.*, 1992). Un STS est un court fragment d'une séquence génomique qui peut être détecté par une technique de PCR (polymerase chain reaction), puis une étape de migration sur gel d'agarose et enfin une révélation par UV (ultra-violet). L'absence d'une bande indique l'absence du STS correspondant et donc une microdélétion dans AZF. Il existe plusieurs microdélétions dépendamment des différents loci concernés localisés en Yq11.21-23 (Chernykh *et al.*, 2006). Ces différents loci ont été désignés comme étant AZFa, AZFb

et AZFc en 1996 et AZFd quelques années plus tard (Vogt *et al.*, 1996; Kent-First *et al.*, 1999).

En moyenne, AZFa s'étend sur 780 Kb à 3 Mb (Vergraud *et al.*, 1986; Vogt *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1999; McElreavey *et al.*, 2002; Ferlin *et al.*, 2003) et est constitué notamment de 3 gènes que sont DFFY (*Drosophila fat facet Y-linked*), DBY (*dead box Y chromosome*) et UTY (*ubiquitously transcribed tetra-trico-peptide repeat Y chromosome*) (Wallerand *et al.*, 2003). Une microdélétion d'AZFa entraîne une aplasie germinale (SCOS : *Sertoli cell-only syndrome*) définie par l'absence de cellules germinales. Lors d'une biopsie testiculaire, les tubes séminifères ne contiennent que des cellules de Sertoli, signant un arrêt pré-pubertaire de la spermatogenèse (Kent-First *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Si la délétion d'AZFa est partielle, il peut y avoir une hypospermatogenèse sévère (diminution du nombre de cellules germinales touchant tous les stades de maturation) et il est alors possible de retrouver quelques spermatozoïdes (oligozoospermie très sévère ou cryptozoospermie) dans l'éjaculat. D'après l'étude de 2007 de Ferlin *et al.*, la délétion d'un seul gène d'AZFa permet de retrouver la présence de quelques spermatozoïdes dans l'éjaculat 6 fois sur 8 (Ferlin *et al.*, 2007). En Europe, la prévalence de la microdélétion d'AZFa est estimée inférieure à 7% (4,9% - 6,6%) dans une population d'hommes infertiles et à 9% chez des patients ayant un SCOS (Foresta *et al.*, 2000; Foresta *et al.*, 2001).

La région AZFb couvre un intervalle compris entre 1 et 3,3 Mb comprenant 5 familles de gènes que sont SMCY (*selected mouse cDNA Y chromosome*), CDY (*chromodomain protein Y chromosome*), EIF1AY (*eucaryotic translation initiation factor 1A Y chromosome*), XKRY (*XK-related protein Y chromosome*) et RBMY (Brandell *et al.*, 1998; Wallerand *et al.*, 2003). Une microdélétion d'AZFb provoque une azoospermie avec un arrêt du développement des spermatocytes I au stade pachytène de méiose I (Arruda *et al.*, 2007; Clément *et al.*, 2008). Ainsi, la réalisation d'une biopsie testiculaire a peu de chance d'être fructueuse chez un patient présentant une microdélétion complète d'AZFb. En revanche, une microdélétion partielle d'AZFb peut être associée à une oligozoospermie et à une fertilité de l'homme porteur comme rapporté en 2002 par Rolf

*et al.* (Rolf *et al.*, 2002). L'étude italienne de Ferlin indique que lors de délétions partielles d'AZFb, des spermatozoïdes sont présents assez fréquemment dans l'éjaculat ou sur biopsies testiculaires et qu'une fois sur quatre, le développement des spermatocytes est bloqué entraînant l'absence de spermatozoïdes matures (Ferlin *et al.*, 2007). La prévalence de la microdélétion d'AZFb est estimée à environ 10% dans une étude de 63 patients ayant soit une azoospermie, soit une cryptozoospermie ou une extrême oligozoospermie (<1 million/mL) (Patrat *et al.*, 2008).

La région AZFc s'étend sur 3,5 à 4,5 Mb (Girardi *et al.*, 1997; Bienvenu *et al.*, 2003) comprenant 5 familles de gènes que sont RBMY, PRY (PTP-BL related Y chromosome), CDY, BPY2 (basic protein Y2) et DAZ (Ma *et al.*, 1993). Les microdélétions d'AZFc entraînent des phénotypes testiculaires et séminaux variables. Elles se traduisent souvent par une hypospermatogénèse (Foresta *et al.*, 2005) associée à une réduction du nombre de cellules germinales dans plusieurs ou dans tous les tubules ainsi qu'une numération spermatique faible (<5 millions/mL). Mais il peut également y avoir un arrêt de la spermatogénèse, à différents niveaux, entraînant une azoospermie (Clément *et al.*, 2008). Ainsi des spermatozoïdes matures, susceptibles d'être micro-injectés, peuvent être prélevés au cours d'une biopsie testiculaire. Plusieurs équipes ont étudié une délétion partielle d'AZFc appelée délétion gr/gr d'environ 1,6 Mb. L'équipe de Stouffs en 2008 ne trouve aucune différence significative entre les fréquences des délétions gr/gr chez 187 patients infertiles et dans un groupe contrôle de 394 hommes (Stouffs *et al.*, 2008). La microdélétion d'AZFc est la plus fréquente avec une incidence d'environ 1/4000 (Oates *et al.*, 2002). Elle concerne au minimum 65% des microdélétions de AZF rapportées (Roze *et al.*, 2007). La microdélétion de AZFc aurait une prévalence de 5,3% chez les patients infertiles contre 0,4% chez les hommes fertiles (Ferlin *et al.*, 2005). La prévalence de la microdélétion AZFc est de 5,7% chez les hommes avec une oligozoospermie sévère et de 11,3% à 13% chez les hommes azoospermes (Reijo *et al.*, 1996; Oates *et al.*, 2002).

Par ailleurs, un adolescent présentant une oligozoospermie sévère due à la présence d'une microdélétion d'AZFc, a un risque de diminution de la production de

spermatozoïdes au cours du temps pouvant aller jusqu'à l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat (Krausz *et al.*, 2000; Sharlip *et al.*, 2002; Kihale *et al.*, 2005). Ainsi, il peut s'avérer très judicieux de réaliser une autoconservation du sperme éjaculé permettant la concrétisation d'un projet parental futur pour ces jeunes hommes (Clément *et al.*, 2008).

Une quatrième région a été proposée, il s'agit d'AZFd. Elle serait située entre AZFb et AZFc (Kent-First *et al.*, 1999; Foresta *et al.*, 2001). Pour beaucoup, cette région dont l'absence pourrait entraîner aussi bien une oligozoospermie moyenne qu'une numération normale associée à une sévère tératozoospermie, ferait en fait partie intégrante d'AZFc (Saxena *et al.*, 2000).

Des microdélétions multiples sont généralement de mauvais pronostics. Ainsi, les microdélétions AZFb+c ou AZFa+b+c ne permettent pas de trouver des spermatozoïdes testiculaires (Patrat *et al.*, 2008).

Concernant les anomalies du spermogramme associées aux microdélétions du chromosome Y, il est à noter que toutes les équipes n'utilisent pas le même seuil pour définir une oligozoospermie sévère, ce qui peut rendre les comparaisons de données difficiles. Pour certains, une oligozoospermie est dite sévère à partir d'une numération inférieure ou égale à 5 millions/mL (SaoPedro *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2007), à 2 millions/mL (Vogt *et al.*, 1996) ou encore à 1 million/mL (Carrara *et al.*, 2004; Hellani *et al.*, 2006). Pour d'autres, en revanche, ce seuil de 1 million de spermatozoïdes par millilitre définit une cryptozoospermie (Loginova Iu *et al.*, 2003; Giachini *et al.*, 2008).

La société européenne de génétique fixe le seuil maximum conduisant à rechercher la présence de microdélétions du chromosome Y à 5 millions/mL tandis que la HAS fixe ce seuil à 1 million/mL. Il serait nécessaire de trouver le meilleur rapport coût/efficacité justifiant la recherche de ces anomalies en routine dans le but de déterminer précisément l'origine du trouble des patients et d'orienter la thérapeutique. L'équipe de Clément (Clément *et al.*, 2008) considère qu'il est très rare de trouver des microdélétions chez des patients ayant entre 1 et 5 millions/mL de spermatozoïdes. Le seuil qu'elle retient est donc identique à celui de la HAS.

Lors du recours à l'ICSI, il y a normalement transmission de la microdélétion du père à son fils (Cram *et al.*, 2000) et il peut arriver que l'étendue de la microdélétion soit augmentée chez l'enfant (Lee *et al.*, 2006). Toutefois, une étude rapporte un cas de non transmission de la microdélétion après ICSI (Katagiri *et al.*, 2004). Clément *et al.* évoquent l'hypothèse d'une mosaïque de cellules porteuses de la microdélétion et de cellules sans la microdélétion au niveau testiculaire. Ainsi certains sites pourraient conserver une spermatogenèse normale produisant des spermatozoïdes non porteurs de la microdélétion (Clément *et al.*, 2008).

### III.B- Le chromosome 3 et *SPATA16*

Nous venons de développer les microdélétions du chromosome Y découvertes dans les années 1970. Depuis, seulement deux gènes (Dam *et al.*, 2007; Dieterich *et al.*, 2007) ont pu être formellement associés à des troubles de la spermatogenèse chez l'homme. Ces deux gènes sont *SPATA16* et *Aurora Kinase C (AURKc)*.

C'est en analysant par puce des cDNA humains à l'aide de sondes de cDNA de testicules adultes et fœtaux que Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2003) ont identifié le gène *SPATA16* qu'ils ont appelé *NYD-SP12*. Il a été localisé en 3q26.32. Ce gène est spécifiquement exprimé dans les testicules chez l'homme et au niveau de l'appareil de Golgi. Il a été montré, chez la souris, que la protéine codée par ce gène a un rôle dans la formation de l'acrosome lors de la spermiogenèse. Cette protéine est présente dans des vésicules proacrosomiales transportées jusqu'à l'acrosome dans les spermatides rondes et allongées (Lu *et al.*, 2006). En 2007, une mutation homozygote dans l'exon 4 (c.848G→A) de ce gène apparaît impliquée chez des patients infertiles présentant une globozoospermie (Dam *et al.*, 2007). Cette tératozoospermie particulière est rare (incidence de moins de 0,1% chez les hommes infertiles) et se caractérise par des têtes spermatiques rondes et sans acrosome. La mutation consiste en un changement d'acide aminé (p.Cys229Tyr) au niveau d'un résidu hautement conservé (p.R283Q) situé dans la partie C-terminale d'un domaine TPR (tetrapetide repeats). De plus, étant donné que la mutation concerne le dernier nucléotide de l'exon 4, elle peut endommager le site d'épissage situé en 5' de l'intron 4.

### III.C- Le chromosome 19 et *AURKc*

Glover *et al.* rapportent, chez la drosophile *D. melanogaster*, une mutation dans le gène "aurora", qui influe sur le processus mitotique du centrosome (Glover *et al.*, 1995). C'est en 1997 que le gène *Aurora A* (encore appelé *Aik* ou *Btak*) fut identifié chez l'homme à la suite d'une recherche d'homologie avec le gène *aur-A* de *D. melanogaster* (Kimura *et al.*, 1997; Sen *et al.*, 1997). Puis en 1998, le gène *Aurora B* (encore appelé *Aik2* ou *STK12*) fut découvert (Kimura *et al.*, 1998; Prigent *et al.*, 1999) ainsi que le gène *Aurora C* (encore appelé *Aie2* ou *stk13*) (Bernard *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998). Etant donné les différents noms attribués, une nomenclature a été proposée sous les noms de *Aurora A*, *B* et *C* en 2001 (Nigg, 2001). Les gènes *Aurora* codent des kinases qui phosphorylent les résidus sérines et thréonines. Très récemment, le gène *AURKc*, situé en 19q13.43, a été incriminé chez des patients présentant une infertilité primaire avec des spermatozoïdes macrocéphales et multiflagellés et une tératozoospermie à près de 100%. C'est une équipe grenobloise qui a mis en évidence une mutation homozygote dans l'exon 3 du gène *AURKc* (c.144delC) chez 9 patients (Dieterich *et al.*, 2007). Ce gène est exprimé dans les testicules et est impliqué dans la ségrégation méiotique et la division cellulaire lors de la méiose (Kimura *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006). La mutation de *AURKc* entraîne un décalage du cadre de lecture responsable d'une fin prématurée de la traduction et de la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (perte de son domaine kinase) (Harbuz *et al.*, 2009). Une nouvelle étude de la même équipe met en évidence la même mutation chez 34 patients. Parmi eux, deux frères avaient de plus une mutation dans l'exon 6 de *AURKc*. Tous les patients porteurs de la mutation étaient d'origine nord-africaine. Ils estiment la prévalence de ce syndrome de macrocéphalie et flagelles multiples à 1/10 000 hommes dans la population maghrébine (Dieterich *et al.*, 2009; Harbuz *et al.*, 2009).

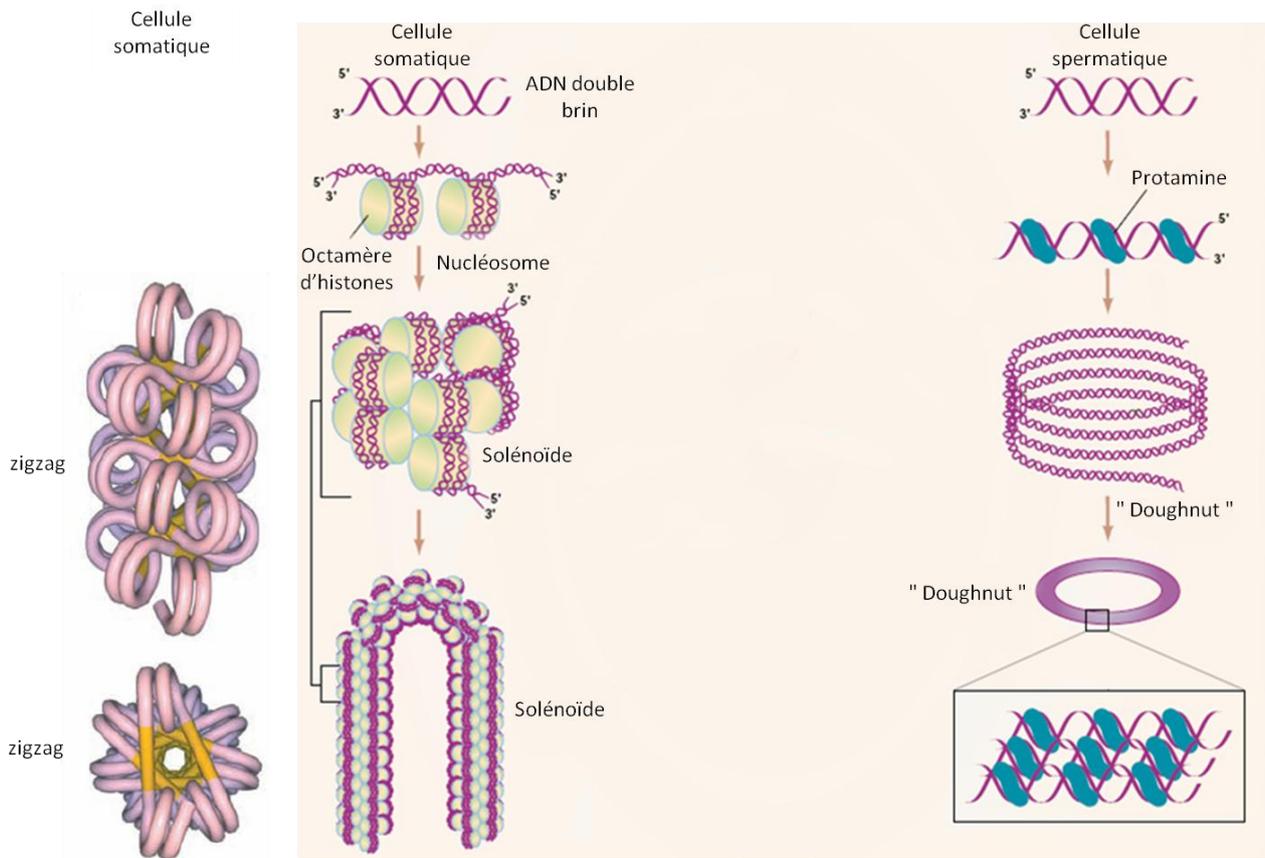
### IV- Qualité de l'ADN spermatique et infertilité masculine

Comme nous le savons, les techniques d'AMP ont permis une avancée extraordinaire dans le traitement symptomatique des infertilités. Le succès de ces techniques dépend d'une

multitude de facteurs dont certains ont été abordés précédemment. Avec l'utilisation de l'ICSI, se pose le problème du risque de transmission de maladies génétiques. De ce fait, les chercheurs se sont davantage concentrés sur l'intégrité du génome des spermatozoïdes. L'intégrité structurale comme fonctionnelle des gamètes utilisés est bien évidemment primordiale. Au départ, les scientifiques pensaient que le développement préimplantatoire précoce était presque uniquement sous influence maternelle et que c'était donc principalement la qualité de l'ovocyte qui importait. Au début des années 1990, des chercheurs ont montré que la mauvaise qualité spermatique était souvent associée à une morphologie embryonnaire médiocre et à de faibles pourcentages de grossesses évolutives (Ron-el *et al.*, 1991). L'équipe de Ménézo montre que la présence de paramètres spermatiques anormaux est corrélée à l'altération de la formation des blastocystes (Janny & Menezo, 1994). Il est alors devenu incontestable que la qualité des spermatozoïdes avait un rôle très important lors du développement embryonnaire. De plus, il a été mis en avant que la qualité de l'ADN des spermatozoïdes pouvait avoir un impact sur la qualité embryonnaire. Ainsi, une équipe a rapporté un taux de spermatozoïdes à l'ADN fragmenté significativement supérieur chez des patients dont le spermogramme était anormal par rapport à celui d'hommes aux paramètres spermatiques normaux (Huang *et al.*, 2005).

#### IV.A- Structure de l'ADN des gamètes mâles

Dans les cellules somatiques, l'ADN s'organise en nucléosomes. Un nucléosome est constitué d'un octamère d'histones (deux histones H2A, deux H2B, deux H3 et deux H4) autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Deux modèles sont actuellement proposés pour décrire la structure de l'ADN compacté, soit un modèle en zigzag (Dorigo *et al.*, 2004), soit un modèle en forme de solénoïde (Braun, 2001) (Figure 21). L'ADN du gamète mâle, support de l'information génétique à transmettre, est une longue molécule fragile fortement compactée. La chromatine d'un spermatozoïde s'organise en une superposition de boucles d'ADN que sont les super-enroulements. Celles-ci ont la forme d'un "doughnut" (beignet).



Adaptée de Dorigo *et al.*, 2004

Adaptée de Braun *et al.*, 2001

Figure 21 : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut).

C'est au cours de la spermiogenèse que les nucléoprotéines de type histones sont remplacées par une structure basée sur des protamines afin de réduire le volume nucléaire et d'augmenter significativement la compaction de l'ADN (Figure 22).

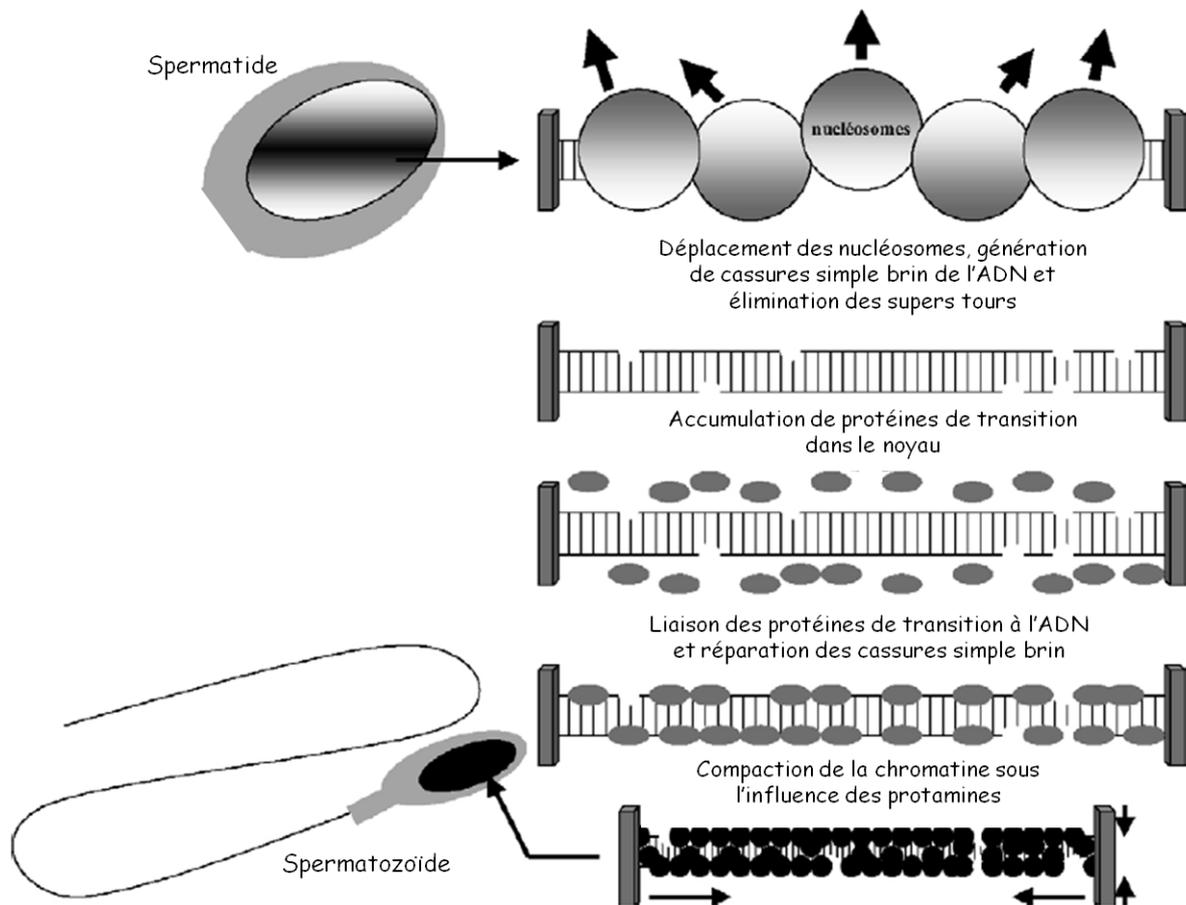


Figure 22 : Synthèse des différentes étapes du remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse, adaptée de Sergerie *et al.*, 2005a.

La chromatine des spermatozoïdes est environ six fois plus condensée que celles des cellules somatiques. Cette compaction très importante correspond à la mise en place d'une protection physique du noyau du gamète aux différentes agressions auxquelles il va être soumis tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire. Il est nécessaire que le patrimoine génétique puisse être acheminé, sans dommage, des voies masculines jusque dans les voies féminines (Manicardi *et al.*, 1998). Au stade de la spermatide ronde, les histones sont remplacées par des protéines de transition 1 et 2 (TNP1 et TNP2 : Transition Nuclear Protein). TNP1 interviendrait dans les processus de réparation de l'ADN, TNP1 et TNP2 dans la mise en place des protamines de type 2 (PRM2). Lors du stade de l'élongation des spermatides, les protéines de transition sont remplacées par des protamines de type 1 (PRM1) et des PRM2 (Aoki *et al.*, 2006). Les protamines sont des protéines basiques riches en arginine

et en cystéine. Lors du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, le nombre de ponts disulfures est augmenté au niveau des résidus cystéine des protamines. Environ 95% des groupements thiols (-SH) portés par la cystéine sont oxydés. Cela conduit à la formation de cystine qui consiste en l'union de deux molécules de cystéine par un pont disulfure, ce qui permet une stabilisation supplémentaire de la structure nucléaire. Ce compactage très important est responsable de la perte de la possibilité pour l'ADN spermatique de se répliquer et d'être réparé (Roux *et al.*, 2004).

Au final, dans les spermatozoïdes humains matures, environ 15% d'histones persistent dans le noyau (Braun, 2001) et plus de 70% des protéines nucléaires basiques sont des protamines (Sergerie *et al.*, 2005a).

#### IV.B- Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

La spermatogenèse est un processus complexe qui consiste en la prolifération des cellules germinales puis en la différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes matures. Tout au long de ce processus, la chromatine des gamètes est susceptible d'être altérée. Habituellement, le taux de fragmentation est faible dans la plupart des spermatozoïdes. Après fécondation, l'ovocyte peut contribuer à réparer ces coupures anormales, sous réserve qu'elles se trouvent dans une proportion raisonnable. Pour des raisons diverses et sans doute pas toutes répertoriées aujourd'hui, il peut arriver que les brins de l'ADN spermatique se coupent de manière excessive : cela se traduit par une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN. Trois théories principales sont proposées pour tenter d'expliquer ces dommages.

Une première hypothèse concerne la compaction de l'ADN des spermatozoïdes matures. En règle générale, plus des deux tiers de la chromatine des spermatozoïdes sont très compactés grâce aux protamines. La compaction chromatinienne des spermatozoïdes requiert des endonucléases comme la Topoisomérase II qui aide au remplacement des histones par des protamines en générant des cassures dans l'ADN. Ces dernières sont nécessaires pour libérer les super-enroulements de la chromatine (McPherson & Longo,

1993). Seulement 15% de l'ADN est moins fortement condensé car la compaction s'opère grâce à des histones. Un dysfonctionnement de la Topoisomérase II pourrait entraîner un taux anormal de fragments d'ADN non réparés (McPherson & Longo, 1993).

Certains hommes infertiles ont un ratio histone : protamine supérieur à celui des hommes fertiles. La compaction chromatinienne devient donc plus faible à cause d'une sous protamination. Cette compaction moindre serait susceptible d'augmenter la sensibilité de l'ADN des spermatozoïdes à des stress extérieurs, l'ADN étant moins bien protégé, il en résulterait des cassures endogènes. En 2001, une équipe met en évidence une déficience complète des protamines chez 5 à 15% d'hommes infertiles (Carrell & Liu, 2001). En 2005, une étude montre un lien entre la déficience en protamines dans l'ADN des gamètes masculins et les altérations présentes dans l'ADN de ces spermatozoïdes (Nasr-Esfahani *et al.*, 2005). En 2006, Aoki *et al.* constatent que les spermatozoïdes présentant un faible taux de protamines ont une viabilité diminuée et une susceptibilité augmentée de leur ADN à être endommagé (Aoki *et al.*, 2006).

La seconde théorie susceptible d'expliquer la présence de dommages dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés concerne la production de substances oxygénées réactives (SOR). Celles-ci sont des agents oxydants dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et les radicaux libres. Les SOR sont connus pour avoir un effet délétère sur la majorité des tissus et donc sur les cellules qui les constituent. En effet, les SOR sont impliquées, par exemple, dans des cancers ou des problèmes vasculaires. Cependant, vers le début des années 1990, des chercheurs ont découvert que de faibles concentrations en SOR, produites au moment opportun, pouvaient jouer des rôles importants dans des cascades de transduction de signaux. Nous savons maintenant que les SOR jouent un rôle physiologique très important dans la différenciation et les fonctions des spermatozoïdes. Les SOR sont nécessaires pour que les spermatozoïdes acquièrent certaines compétences. Il est prouvé que l' $O_2^-$ , le  $H_2O_2$  et le monoxyde d'azote (NO) sont trois SOR qui ont un rôle dans l'activation des spermatozoïdes (de Lamirande & Gagnon, 1993; Herrero *et al.*, 2003; Thundathil *et al.*, 2003; de Lamirande

& O'Flaherty, 2008) ; ceci n'est probablement pas exhaustif mais aucune étude ne prouve clairement le rôle d'autres SOR à l'heure actuelle.

Les spermatozoïdes ont deux fonctions, à savoir acheminer le contenu génétique paternel jusqu'à l'ovocyte, grâce à la mobilité que lui confère son flagelle, et se lier à l'ovocyte, puis le féconder. Le processus de capacitation est un pré-requis indispensable pour la réaction acrosomiale, réaction de libération d'enzymes hydrolytiques permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'ovocyte pour le féconder. Ainsi, de nombreux changements cellulaires se produisent à des moments et des endroits précis lors du processus de capacitation, comme des modifications lipidiques pour augmenter la fluidité membranaire, des afflux de calcium dans la tête et le flagelle du spermatozoïde et une production de quantités contrôlées de SOR. D'autre part, dans le liquide séminal, le spermatozoïde se déplace de façon linéaire. Lors de la capacitation au cours de la migration dans les voies génitales féminines, cette mobilité augmente. Cette hyperactivation dont le(s) mécanisme(s) n'est pas encore exactement connu, contrôlée par des SOR, ferait intervenir une augmentation des phosphorylations des protéines du flagelle. Quant à la réaction acrosomiale, c'est un processus complexe qui demande également des modifications cellulaires comme des afflux de calcium ou la production de SOR. Toutefois, les agents déclencheurs et/ou la cinétique sont différents de ceux nécessaires à la capacitation. La réaction acrosomiale est régulée par des réactions d'oxydo-réduction mais les mécanismes précis par lesquelles les SOR ont un impact sur cette réaction ne sont pas connus (de Lamirande & O'Flaherty, 2008).

La quantité de SOR générées est contrôlée par des antioxydants présents dans le liquide séminal des hommes fertiles. Les effets délétères que peuvent engendrer les SOR sont, par exemple, une augmentation des cassures simple et double brin de l'ADN. L'anion superoxyde et le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\cdot$ ) ont des effets mutagènes et peuvent être la source de cassures ou de mutations chromosomiques (Pons-Rejraji *et al.*, 2009). Les spermatozoïdes de morphologie anormale, tout particulièrement ceux présentant des résidus cytoplasmiques (Tremellen, 2008) ainsi que les leucocytes, seraient la source principale d'une production excessive de SOR. Les dommages de l'ADN résultent

plus de l'augmentation de la production de SOR que de la diminution de la capacité des agents antioxydants à jouer leur rôle protecteur. De plus, il peut y avoir une production de spermatides avec une mauvaise protamination. Un nombre insuffisant de ponts disulfures au niveau des thiols conduisant à une diminution de la compaction de la chromatine entraîne alors une vulnérabilité plus importante de l'ADN aux cassures pouvant être induites par les SOR (Ozmen *et al.*, 2007).

La troisième hypothèse concernerait le rôle de l'apoptose au cours de la spermatogenèse. L'apoptose est une mort cellulaire programmée nécessaire notamment pour l'homéostasie cellulaire, c'est-à-dire, l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort de certaines cellules. Au cours de la spermatogenèse, se produisent des divisions mitotiques et méiotiques ainsi que la transformation des spermatogonies en spermatozoïdes. Cette expansion de cellules germinales doit nécessairement être contrôlée. L'apoptose intervient dans le maintien du nombre de cellules germinales par rapport au nombre de cellules de Sertoli. Des cellules germinales sont éliminées par apoptose pour qu'il n'y en ait pas plus que ne peuvent en supporter les cellules de Sertoli. Pour les uns, dans des conditions normales de spermatogenèse, plus de la moitié des cellules germinales qui pourraient devenir matures serait perdue et la plupart d'entre elles seraient éliminées lors d'une apoptose des spermatogonies (Dunkel *et al.*, 1997), Pour les autres, plus de 75% des cellules de la spermatogenèse seraient éliminées par ce processus (O'Brien & Zini, 2005).

La mort apoptotique possède certaines caractéristiques comme la chute du potentiel de membrane mitochondrial, l'activation de caspases, la perte de la distribution symétrique de la phosphatidylsérine (PS) de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation du noyau. La cellule est ensuite détruite en petites structures appelées corps apoptotiques. A la surface de ces derniers se trouvent des résidus phosphatidylsérines reconnaissables par les macrophages qui les phagocytent. Aucune réaction inflammatoire n'est produite lors de ce processus. Ces caractéristiques apoptotiques identiques à celles trouvées dans les cellules somatiques ont été mises en évidence dans les cellules germinales ainsi que dans les spermatozoïdes

éjaculés. L'apoptose pourrait permettre l'élimination des spermatozoïdes éjaculés anormaux et potentiellement néfastes (Gorczyca *et al.*, 1993).

D'après les marqueurs et les voies connus de l'apoptose dans les cellules somatiques, une représentation schématique par extrapolation en a été faite par une équipe lilloise (Marchetti & Marchetti, 2005). Les voies extrinsèques débutent par un engagement des récepteurs de mort dont Fas qui serait présent à la surface des spermatozoïdes humains. De plus, un taux relativement bas de spermatozoïdes exprimant Fas à leur surface a été mesuré chez des hommes dont les paramètres spermatiques étaient normaux. Au contraire, chez des hommes aux paramètres anormaux, les taux peuvent aller jusqu'à 50% signant une clairance anormale des spermatozoïdes via l'apoptose. Ce facteur pourrait contribuer à l'infertilité (Sakkas *et al.*, 1999a).

Après l'engagement de récepteurs de mort cellulaire, s'ensuit une activation des caspases 8 puis 3, avant l'étape de fragmentation de l'ADN. Les mitochondries sont également impliquées car elles libèrent des facteurs pro-apoptotiques qui activent la caspase 3, conduisant à la fragmentation de l'ADN. Lorsque les mitochondries sont impliquées, il y a une chute caractéristique de leur potentiel de membrane (Figure 23).

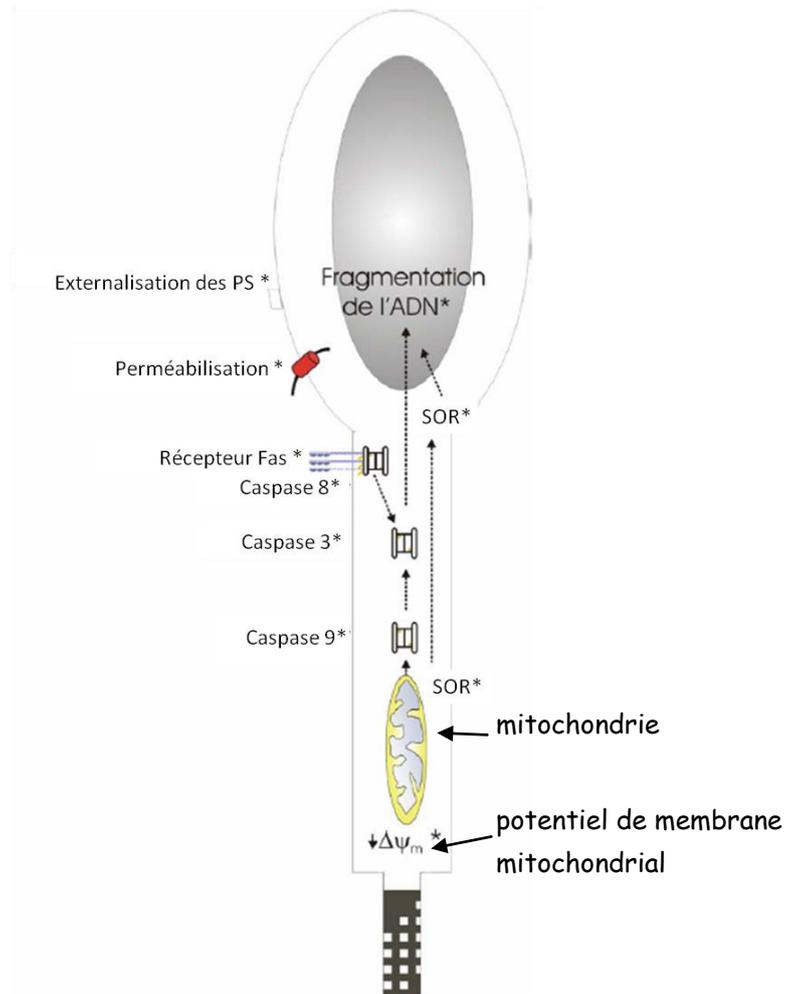


Figure 23 : Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques pouvant être présentes dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles, adaptée de Marchetti & Marchetti, 2005.

La présence dans un éjaculat de spermatozoïdes montrant des traits apoptotiques ainsi qu'une fragmentation de l'ADN suggérerait qu'un processus d'apoptose a été déclenché mais que celui-ci n'a pu aller jusqu'à son but ultime, cela a été décrit comme le processus d'apoptose abortive (Figure 24) (Sakkas *et al.*, 1999a). La figure 24a schématise une spermatogonie B normale et une autre présentant Fas. Celle-ci est donc éliminée par apoptose. Au final, deux spermatozoïdes normaux sont formés. Les paramètres spermatiques de cet homme sont normaux. La figure 24b schématise deux spermatogonies B présentant le récepteur Fas, l'une est bien éliminée par apoptose, l'autre échappe à ce processus et continue ses divisions cellulaires. Au stade

spermatocyte primaire, les deux cellules formées portent le récepteur Fas, l'une est détruite, l'autre poursuit ses divisions pour former deux spermatocytes secondaires. Là encore, le récepteur Fas est présent sur les deux cellules mais l'une des deux échappe à la "destruction". Cette cellule survivante aboutit à la formation de deux spermatozoïdes, toutes deux portant Fas. L'une est éliminée, l'autre poursuit sa maturation en un spermatozoïde possédant Fas, présentant des dommages de son ADN mais vivant. Les paramètres spermatiques de cet homme sont altérés.

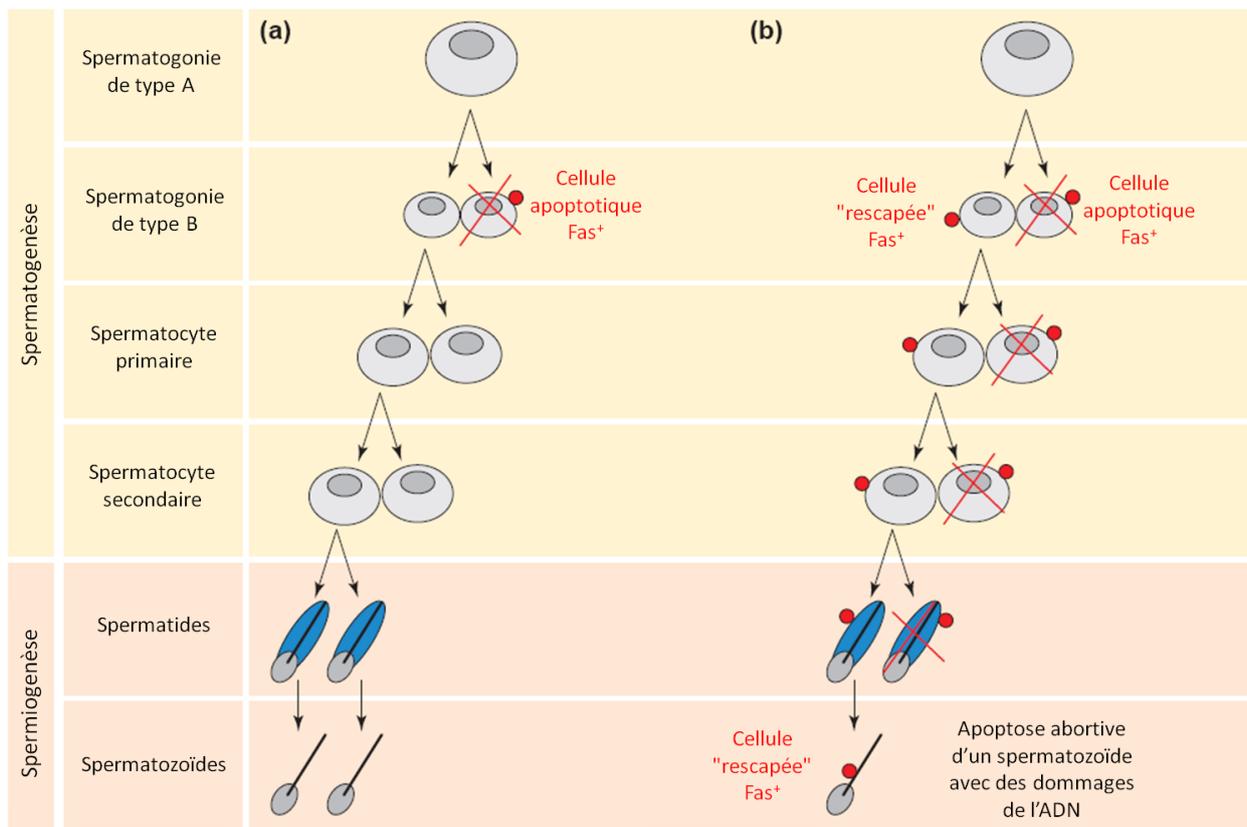


Figure 24 : Rôle hypothétique de Fas au cours de la spermatogénèse chez des hommes aux paramètres spermatiques normaux (a) et anormaux (b), adaptée de Sakkas *et al.*, 1999a.

La signification de la présence de ces traits apoptotiques reste très largement contestée puisque des cellules transcriptionnellement inactives ne devraient pas pouvoir déclencher une réaction apoptotique (Marchetti & Marchetti, 2005). La place et l'intérêt des marqueurs apoptotiques dans l'exploration de l'infertilité masculine ne sont pas clairement établis. En effet, les connaissances d'aujourd'hui sur les voies apoptotiques reposent sur les expériences réalisées sur des cellules somatiques. Rien ne

permet actuellement d'affirmer que les spermatozoïdes subissent un processus apoptotique et peut-être que s'ils en subissent un, ce processus utilise des voies tout à fait différentes de celles répertoriées pour les cellules somatiques.

#### IV.C- Techniques d'évaluation de l'intégrité des gamètes

##### 1- Evaluation de l'intégrité membranaire

Comme précisé précédemment, les altérations membranaires sont caractéristiques du processus d'apoptose. La phosphatidylsérine (PS) a un rôle important dans la fusion membranaire, la reconnaissance cellulaire et l'apoptose. Dans les cellules vivantes, il y a une asymétrie membranaire de la PS dépendante du taux de calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire. La localisation sur la face interne est associée à un faible taux de calcium intracellulaire. Dans les cellules somatiques, une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire *in vitro* peut induire une apoptose cellulaire en faisant intervenir des translocases  $Ca^{2+}$ -dépendantes. En induisant une modification de l'asymétrie membranaire, accompagnée de l'externalisation de la PS, le processus apoptotique permet la reconnaissance de la cellule et son élimination par les cellules phagocytaires. Le passage de la PS en dehors de la cellule permet l'envoi d'un signal destiné aux macrophages environnants. L'annexine V se lie spécifiquement à la PS extériorisée. Ainsi, l'annexine V peut être utilisée pour détecter l'apoptose à un stade précoce du processus apoptotique. En effet, le passage de la PS vers les membranes externes précéderait la fragmentation de l'ADN. L'annexine V peut également rentrer dans une cellule après perméabilisation accrue de la membrane plasmique lorsque la cellule devient nécrotique. Ainsi, certains ont étudié des spermatozoïdes en faisant un double marquage d'une part, par l'annexine V couplée à un fluorochrome et d'autre part, par l'iodure de propidium (IP) qui indique s'il y a une perméabilité membranaire. Ainsi, il est possible de distinguer :

- des spermatozoïdes viables (normalement imperméable à l'IP) (annexine V- ; IP-)
- des spermatozoïdes morts mais sans externalisation de PS (annexine V- ; IP+)
- des spermatozoïdes nécrotiques (annexine V+ ; IP+)

- des spermatozoïdes viables mais avec des altérations membranaires apoptotiques (annexine V+ ; IP-)

Cette dernière population est plus fréquente dans les éjaculats d'hommes infertiles que chez les hommes fertiles (Moustafa *et al.*, 2004; Brugnon *et al.*, 2006).

## 2- Evaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique

Les techniques permettant d'évaluer la qualité de l'ADN spermatique ont pour objectif l'identification des patients ayant un taux important d'anomalies de l'ADN nucléaire de leurs spermatozoïdes. Le but ultime est d'expliquer l'infertilité des couples et de réussir à déterminer un seuil de fragmentation au-dessus duquel la réussite d'une technique d'aide médicale à la procréation est fortement compromise.

L'analyse des gamètes se fait au microscope à épifluorescence ou peut se faire avec un cytomètre de flux (premier appareil développé par Göhde, 1968). L'analyse se fait selon un mode binaire, la chromatine des gamètes est altérée ou intacte.

### 2.1-Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Le test de sperm chromatin structure assay (SCSA) est basé sur le fait que la chromatine spermatique anormale est plus susceptible de se dénaturer après un traitement *in situ* par une solution acide et/ou par la chaleur, qu'une chromatine intacte (Darzynkiewicz *et al.*, 1975; Evenson *et al.*, 1980; Evenson *et al.*, 1985). La technique SCSA utilise les propriétés métachromatiques de l'acridine orange. L'analyse se fait grâce à un cytomètre de flux qui mesure le ratio entre la fluorescence rouge (simple brin d'ADN dénaturé) et la fluorescence verte (ADN double brin). Un coefficient appelé DFI (DNA fragmentation index) est calculé par la relation suivante : Fluorescence rouge / (Fluorescence rouge + verte) (Roux *et al.*, 2004). Un DFI de 0,1 ou de 0,9 signe, respectivement, un ADN non dénaturé ou très dénaturé. La cytométrie de flux permet d'étudier rapidement un grand nombre de spermatozoïdes, cependant, les prélèvements spermatiques avec une faible numération ne peuvent pas être analysés.

Les résultats obtenus à l'aide de la technique SCSA ne sont que faiblement corrélés aux paramètres de l'OMS à savoir la concentration, la mobilité et la morphologie (Evenson *et*

*al.*, 1991). Ce test paraît donc être un outil diagnostique supplémentaire dans l'exploration de l'infertilité masculine (Larson *et al.*, 2000).

Il a été proposé un seuil de DFI aux environs de 30% à partir duquel le taux de fécondité serait diminué (Evenson *et al.*, 1999; Boe-Hansen *et al.*, 2006).

## 2.2- Test à l'acridine orange (AO)

L'acridine orange s'intercale dans l'ADN natif (double brin) et émet une fluorescence verte (515-530 nm). Il peut également se fixer sur l'ADN simple brin ou dénaturé. Dans ce cas, l'acridine orange émet une fluorescence rouge-orangé (>630nm). La coloration à l'acridine orange a été appliquée aux frottis de sperme en 1984 (Tejada *et al.*, 1984). Le principe est donc tout à fait identique à la technique SCSA en dehors du fait que le test à l'acridine orange ne requiert pas un cytomètre de flux, l'analyse se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Plus la chromatine est condensée, plus l'intensité fluorescente diminue, c'est pourquoi un spermatozoïde émet une fluorescence moins forte (5 fois moins) qu'une cellule diploïde ou que des spermatides rondes (Roux *et al.*, 2004). Cette méthode est peu utilisée car elle est moins sensible que la technique SCSA ou TUNEL dans l'évaluation de la fragmentation de l'ADN (Chohan *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007).

## 2.3- Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) dite COMET

La technique SCGE a été décrite la première fois en 1988 pour évaluer les dommages de l'ADN des cellules dus à divers facteurs comme les radiations par ultraviolets, la radiothérapie (Singh *et al.*, 1988). Cette méthode consiste à détecter des cassures dans les brins d'ADN des cellules à étudier. Adaptée à l'analyse des spermatozoïdes (Singh *et al.*, 1989), cette technique consiste à mélanger le sperme avec de l'agarose légèrement chauffé. Le tout est déposé sur une lame. Les cellules sont ensuite lysées. La lyse peut être alcaline (pH>10), elle dénature alors l'ADN spermatique. Des cassures simple et double brin sont décelées (Collins, 2004; Speit *et al.*, 2009). Quelques modifications de la technique faites en 1991 ont permis d'obtenir une détection des cassures double brin uniquement (Olive *et al.*, 1991). La technique COMET, à pH 7, est plus adaptée à la mise

en évidence de dommages de l'ADN liés à une infertilité puisque ces conditions neutres ne dénaturent pas l'ADN contrairement au pH alcalin (Andrabi, 2007).

Après l'étape de lyse, les gamètes sont soumis à une électrophorèse. Si un spermatozoïde est soumis à un champ électrique, l'ADN sans cassure reste dans les têtes spermatiques de par son haut poids moléculaire. Au contraire, si l'ADN a des cassures, il migre et sort petit à petit de la tête spermatique et donne ainsi l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique). Après marquage des spermatozoïdes par un colorant fluorescent, l'intensité de la fluorescence et la longueur de la queue de la comète, proportionnelles aux cassures des brins de l'ADN des gamètes, sont analysées. Si la lyse est alcaline, l'augmentation de la longueur de la queue de la comète ne résulte pas seulement des cassures préexistantes dans l'ADN mais elle est également due à la présence de sites sensibles aux attaques alcalines.

Les résultats obtenus par la technique COMET ont été utilisés comme facteur prédictif de la qualité des embryons (Tomsu *et al.*, 2002). Un taux élevé de cassures de l'ADN a été corrélé à la faible capacité d'atteindre le stade blastocyste (Nasr-Esfahani *et al.*, 2005), à la diminution des divisions embryonnaires après fécondation (Morris *et al.*, 2002) et à de faibles taux de grossesse (Lewis *et al.*, 2004). En revanche, aucune corrélation n'a été mise en avant entre les résultats obtenus par COMET et les taux de fécondation (Lewis *et al.*, 2004; Nasr-Esfahani *et al.*, 2005).

Enfin, même si cette technique détecte les cassures de l'ADN spermatique, il n'y a pas de standardisation de la méthodologie nécessaire à une application en routine. De fait, il n'a pas été établi de seuil à partir duquel un impact clinique existe.

#### 2.4- Sperm Chromatin Dispersion test (SCD)

En 2003, une équipe a présenté (Fernandez *et al.*, 2003) le test SCD comme une méthode simple et peu coûteuse. Le principe de cette méthode consiste à traiter des spermatozoïdes par une solution acide puis par un tampon de lyse. L'ADN est ensuite contre-coloré au DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol). Après ces traitements, les gamètes sans ADN fragmenté relâchent des boucles d'ADN qui forment de grands halos.

Au contraire, les gamètes avec un ADN fragmenté ne produisent pas ou peu de halos de dispersion (Fernandez *et al.*, 2003). De plus, les hommes fertiles ont significativement plus de gamètes avec de grands halos que les hommes infertiles (Chohan *et al.*, 2006). En 2008, une équipe (Meseguer *et al.*, 2008) a montré que le taux de fragmentation estimé par SCD est corrélé à la qualité embryonnaire après injection dans un ovocyte d'un spermatozoïde testiculaire, ainsi qu'à la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes (Velez de la Calle *et al.*, 2008). En revanche, aucun impact sur le devenir d'une grossesse clinique n'a été mis en évidence. Cette dernière équipe a trouvé une corrélation entre le taux de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté, quand il est supérieur à 18%, et le taux de fécondation.

### 2.5- *in situ* Nick Translation assay (NT)

Le test *in situ* de cassures dans l'ADN spermatique consiste en la mesure de l'incorporation du complexe biotine-dUTP (deoxyuridine triphosphate) au niveau des points de cassure de l'ADN simple brin en utilisant l'activité de l'enzyme ADN polymérase I. Afin d'amplifier le signal obtenu, il est possible d'ajouter de l'avidine (se fixe spécifiquement sur la biotine) couplée à un fluorochrome facilement identifiable en microscopie à fluorescence (Sergerie *et al.*, 2005a). L'utilisation de cette technique a été assez restreinte notamment par le fait qu'aucun seuil n'a été déterminé comme étant discriminant entre les hommes infertiles et les hommes fertiles.

### 2.6- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay (TUNEL)

Le TUNEL a été développé en 1992 pour étudier l'apoptose des cellules somatiques (Gavrieli *et al.*, 1992). La technique a ensuite été adaptée pour les spermatozoïdes (Sailer *et al.*, 1995). Dans les cellules somatiques, il se produit des cassures de l'ADN par action d'endonucléases lors du processus apoptotique. Les cassures induisent des libérations d'extrémités 3'-OH (Gorczyca *et al.*, 1993). Cette technique utilise l'activité exonucléasique de la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) qui catalyse l'incorporation de nucléotides triphosphates aux extrémités 3'-OH libres des doubles ou simples brins. Les nucléotides incorporés forment un oligomère composé de nucléotides

couplés à la digoxygénine et de nucléotides non marqués. Des anticorps anti-digoxygénine couplés à un fluorochrome sont ajoutés. Le ratio nucléotides marqués/non marqués est optimisé afin d'assurer une bonne liaison des anticorps anti-digoxygénine. L'analyse de la fragmentation de l'ADN peut se faire à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou par cytométrie de flux (si la numération spermatique n'est pas trop faible).

En 2005, *Sergerie et al.* ont montré que les patients infertiles ont un taux de fragmentation (mis en évidence par TUNEL) supérieur à celui des hommes fertiles. Il paraît donc être un bon indicateur de la fertilité masculine (*Sergerie et al.*, 2005b). De plus, *Tesarik et al.* rapporte un taux supérieur de gamètes à l'ADN fragmenté lorsque les couples ont connu des fausses couches spontanées à répétition (*Tesarik et al.*, 2004).

D'autre part, il a plusieurs fois été suggéré que la technique TUNEL mettait en évidence une activité apoptotique. Une équipe (*Sakkas et al.*, 2002) a étudié le taux de gamètes fragmentés par la technique TUNEL ainsi que la présence de marqueurs apoptotiques tels que Fas, p53 et Bcl-x chez des patients avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux. Les auteurs trouvent une proportion de gamètes avec un ADN fragmenté et une expression plus forte de Fas et p53 chez les patients avec une faible numération spermatique et une tératozoospermie. Cependant, la fragmentation n'est pas toujours corrélée à l'expression des marqueurs apoptotiques. Les auteurs suggèrent la présence d'au moins deux populations de spermatozoïdes différentes : une population qui aurait échappé à la mort cellulaire initiée dans les testicules et une seconde population ayant eu des perturbations lors du remodelage nucléaire (remplacement des histones par les protamines) au cours de la spermiogenèse.

Mais l'hypothèse selon laquelle la technique TUNEL met en évidence une activité apoptotique reste controversée. Elle permet certainement de détecter des fragmentations issues d'autres voies telle la voie nécrotique (*Muratori et al.*, 2000; *Aitken et al.*, 2009).

## V- Exposé des objectifs

Nous avons voulu réaliser une méta-analyse d'études publiées depuis plus d'une trentaine d'années sur les anomalies chromosomiques constitutionnelles et les microdélétions du chromosome Y présentes chez des hommes infertiles afin d'en préciser la fréquence.

Les travaux que nous avons menés concernent l'analyse de la ségrégation méiotique, d'une part, dans les gamètes d'hommes infertiles dont le caryotype est normal et les paramètres spermatiques anormaux, et d'autre part, chez des porteurs d'anomalies constitutionnelles de nombre ou de structure (translocations robertsoniennes, réciproques, réarrangements complexes et inversions péricentriques). Ces analyses sont effectuées par une technique d'hybridation *in situ* fluorescente. Nous voulons aider à la compréhension de la mécanique méiotique, préciser s'il existe des variations intraindividuelles des taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés et contribuer à une évaluation personnalisée des risques encourus par l'éventuelle descendance des hommes infertiles.

Afin d'avoir la capacité d'analyser tous les patients quels que soient les réarrangements chromosomiques, nous avons voulu mettre au point une technique de BACs afin de nous affranchir de la non disponibilité de sondes commerciales adaptées au réarrangement à étudier. Nous avons étudié la fiabilité de l'utilisation de BACs pour l'étude de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes en comparant ces résultats à ceux obtenus par l'utilisation de sondes commerciales.

D'autre part, parmi les causes de l'infertilité masculine rapportées, il y a notamment les microdélétions du chromosome Y. De ce fait, nous avons tenté de mettre au point une technique de recherche des microdélétions du chromosome Y afin de vérifier la présence ou non d'une telle anomalie chez des patients infertiles.

De plus, nous avons étudié des prélèvements de sang de patients avec des taux très importants de tératozoospermie. La littérature rapporte une mutation du gène *AURKc*

chez des patients qui présentent une tératozoospermie caractérisée par la présence de spermatozoïdes macrocéphales et multiflagellés. Nous avons donc essayé de mettre au point la recherche de cette mutation au sein du gène *AURKc* afin de vérifier la séquence nucléotidique d'intérêt des patients ayant ce type de tératozoospermie.

D'un autre côté, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'intégrité de l'ADN des gamètes masculins. Nous avons mis au point, dans le laboratoire, la technique TUNEL. Par cette technique, nous avons comparé le taux de fragmentation de l'ADN de patients infertiles à celui d'un groupe témoin (recruté et analysé au laboratoire). En particulier, nous avons voulu déterminer si le taux de fragmentation est augmenté chez des patients avec une sévère tératozoospermie. Un autre objectif a été de déterminer si la présence d'une anomalie de structure a un impact sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique de ces hommes. De plus, nous avons évalué si les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés sont plus fragmentés que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré.



# METHODES MISES AU POINT ET VALIDATIONS DE TECHNIQUES



Toutes les solutions citées dans ce manuscrit sont détaillées en annexe 2.

## **I- Spermogramme et spermocytogramme**

Les prélèvements des patients sont obtenus par masturbation. Une fois le prélèvement récupéré, il est placé à l'étuve à 37°C pour le liquéfier. Le volume de l'éjaculat est mesuré par la graduation du réceptacle. Le pH est mesuré à l'aide de papier indicateur de pH. La mobilité est examinée dans l'heure suivant le prélèvement puis 4 heures après. L'analyse se fait au microscope (objectif x20 ou x40). Deux cents spermatozoïdes sont classés selon 3 groupes : progressants, oscillants et immobiles. La numération est analysée à l'aide d'une cellule de Malassez après dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans du sérum physiologique et du glutaraldéhyde (VWR, Briare, France) qui immobilise les spermatozoïdes. La vitalité de 200 spermatozoïdes est testée grâce à la méthode de William. Sur une lame, un volume de sperme est déposé pour un volume d'éosine-nigrosine (v/v) (Interchim, Montluçon, France). La membrane cellulaire des spermatozoïdes morts devient perméable à ce colorant, ils apparaissent donc de couleur rouge. Enfin, la morphologie de 100 spermatozoïdes est appréciée (objectif à immersion x100) après coloration d'un frottis par la méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG) et d'un autre, par la coloration de Harris-Schorr (HS) (coloration automatisée à l'aide du Thermo Scientific Shandon Varistain® 24-4, Thermo Fischer Scientific, Cergy-Pontoise, France). La technique de coloration au MGG est réalisée en déposant 2 mL de May-Grünwald sur le frottis de sperme. Après 4 min, 2 mL d'eau d'Evian (pH 7,2) sont ajoutés. Le colorant dilué agit 1 min puis est éliminé. Du Giemsa (dilution au 1/10<sup>ème</sup>) est déposé de façon à recouvrir la lame pendant 5 min. La lame est rincée sous un filet d'eau courante puis séchée. Le montage est réalisé en déposant 1 goutte d'Entellan® (Merck, Darmstadt, Allemagne) et une lamelle. Les atypies sont détaillées selon la classification de David (David, 1975). Les deux grandes classes d'anomalies concernent des atypies de la tête et du flagelle.

En fonction de l'histoire d'infertilité des couples, un caryotype peut être réalisé.

## II- Cytogénétique

### II.A- Cytogénétique conventionnelle sur sang

Les cellules sanguines sont mises en culture dans un milieu nutritif en présence de phytohémagglutinine (substance mitogène) qui stimule spécifiquement les lymphocytes T. Vingt-quatre heures avant la fin de la culture, du FUdR (5-fluoro-2'-deoxyuridine) est ajouté au milieu. Celui-ci est un inhibiteur enzymatique de la thymidylate synthétase. L'inhibition de la synthèse endogène de thymidine entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN, responsable du blocage des cellules en phase S. Cela correspond à l'étape de synchronisation. Ce blocage est levé par ajout de thymidine. Les cellules sont ensuite bloquées en métaphase par de la colchicine qui est un poison du fuseau mitotique. Un choc hypotonique est ensuite réalisé qui, en gonflant les cellules, permet une bonne dispersion des chromosomes. Les cellules sont enfin préfixées et fixées afin de maintenir les structures dans un état le plus proche possible de l'état vivant.

Une fois les préparations chromosomiques obtenues, la technique des bandes RHG (reverse bands by heating using giemsa) est réalisée permettant de visualiser environ 400 à 550 bandes par lot haploïde de chromosomes. Les bandes colorées sont les bandes R, elles sont riches en GC (guanine et cytosine) et donc en gènes.

#### 1- Mise en culture et synchronisation

Pour chaque patient, les cultures sont réalisées en flasques en ajoutant 0,5 mL de sang dans 10 mL de milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté, en L-glutamine, en pénicilline et en streptomycine et 80  $\mu\text{L}$  de phytohémagglutinine. Les flasques sont placées à l'étuve à 37°C avec 5% de  $\text{CO}_2$ , pendant environ 48h. Ensuite, 400  $\mu\text{L}$  d'uridine  $10^{-4}$  M et 100  $\mu\text{L}$  de FudR à  $10^{-5}$  M sont ajoutés dans chaque flasque, les cultures sont replacées à l'étuve à 37°C avec 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 17h. Il est ensuite ajouté 100  $\mu\text{L}$  de thymidine  $10^{-3}$  M par flasque. Une remise à l'étuve est effectuée pendant 5h.

## 2- Blocage en métaphase

Un quart d'heure avant la fin de la culture, 120  $\mu\text{L}$  de colchicine à 8 mg/L sont ajoutés.

## 3- Choc hypotonique

Le contenu de chaque flasque est transvasé dans des tubes afin de réaliser une centrifugation de 8 min à 500 g. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 12 mL d'une solution de choc hypotonique. Les tubes sont placés à 37°C pendant 20 min.

## 4- Préfixation

Du fixateur (Carnoy) est ajouté dans chaque tube avant une centrifugation identique à la précédente et l'élimination du surnageant.

## 5- Fixation

La fixation se fait en remettant le culot cellulaire en suspension dans 12 mL de fixateur, suit un temps variable de repos à 4°C et une centrifugation de 8 min à 500 g. Cette étape est réitérée trois fois. Seuls les temps de repos changent (25 min, 20 min et 12h). Enfin, une 4<sup>ème</sup> étape de fixation est pratiquée mais sans temps de repos, puis le culot est remis en suspension dans un faible volume de fixateur.

## 6- Etalements

Afin d'obtenir un bon étalement, le culot est remis en suspension dans du fixateur jusqu'à obtenir une concentration cellulaire adéquate estimée par la turbidité. Quatre étalements sont réalisés par patient en déposant une goutte de la suspension cellulaire sur une lame dégraissée.

## 7- Marquage chromatidien

Après séchage, les lames sont placées dans une solution saline (solution de Earle diluée) à 87°C pendant des temps différents (75 min, 80 min, 85 min et 90 min). La dénaturation est bloquée par des passages rapides sous l'eau froide. Les préparations

chromosomiques sont ensuite colorées dans une solution de Giemsa à 2% pendant 7 min puis rincées à l'eau.

#### 8- Analyse des métaphases

La lecture des lames se fait à l'aide du microscope optique Zeiss-Axiophot® (Zeiss, Le Pecq, France) qui est couplé à une caméra et un logiciel de classement des chromosomes (Ikaros, MetaSystems, Altlussheim, Allemagne). Seize à vingt-cinq métaphases sont analysées pour chaque prélèvement.

Le caryotype est établi en suivant les recommandations de la nomenclature internationale (ISCN, 2005).

L'analyse en cytogénétique conventionnelle peut ensuite être réalisée.

#### II.B- Cytogénétique moléculaire sur sang et sur spermatozoïdes

Le principe de la FISH repose sur les propriétés d'hybridation de l'ADN selon la complémentarité entre les bases nucléotidiques. Une fois le matériel chromosomique étalé sur lames, il est dénaturé avec les sondes avant de procéder à l'étape d'hybridation. Après lavages et contre-coloration de l'ADN du patient, les lames sont observées au microscope à fluorescence (Figure 25).

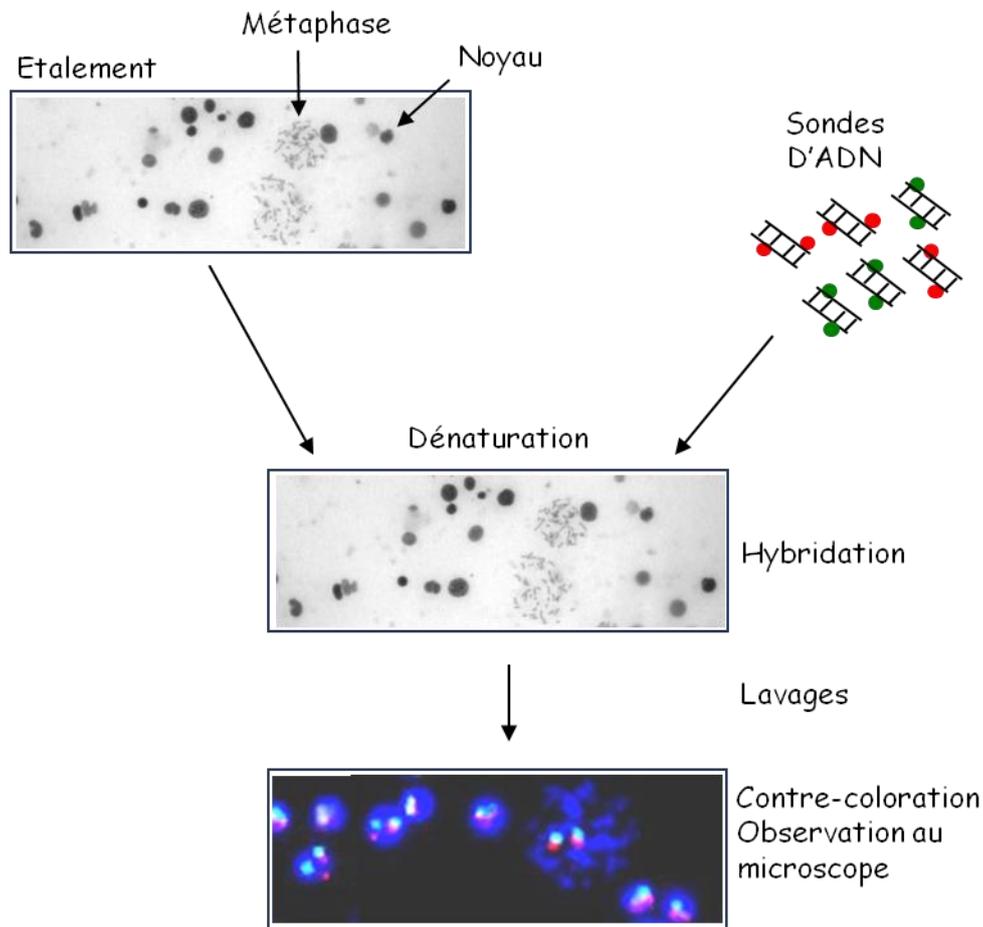


Figure 25 : Principe de la FISH sur sang.

## 1- Types de sondes d'ADN utilisées

Les sondes nucléiques utilisées pour les investigations en FISH sont des fragments d'ADN complémentaire de l'ADN chromosomique. Les sondes employées dans nos travaux sont soit des sondes commercialisées soit des BACs.

### 1.1- Sondes commercialisées

Les sondes commercialisées sont "prêtes à l'emploi". Elles sont marquées directement par un fluorochrome. Les fluorochromes utilisés sont la fluorescéine (fluorescence

verte), la rhodamine (fluorescence rouge) et la coumarine (fluorescence bleue). Seule une dilution est nécessaire.

Il existe des sondes CEP, spécifiques des régions  $\alpha$ -satellites (séquences répétées) d'un chromosome donné, des sondes LSI, spécifiques d'une région chromosomique de quelques kilobases et des sondes subtélomériques, spécifiques de l'extrémité du bras court ou du bras long d'un chromosome donné.

En fonction des anomalies chromosomiques des patients à étudier, l'analyse de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes a nécessité la fabrication de sondes BACs complémentaires des régions d'intérêt, ceci lorsqu'il n'existe pas de sondes commercialisées adaptées à nos besoins.

## 1.2-Sondes BACs

Les sondes nucléiques utilisées sont des fragments d'ADN spécifiques d'un segment d'ADN chromosomique humain, clonés le plus souvent dans des vecteurs plasmidiques. Ceux-ci permettent d'insérer des ADN de taille variant en moyenne de 100 à 300Kb. Ainsi la "sonde" est le vecteur recombinant (vecteur et insert). Les sondes que nous utilisons sont insérées dans des bactéries hôtes *Escherichia Coli*. Les BACs avec lesquels nous travaillons contiennent soit le vecteur pBACe3.6, soit pBeloBac. Dans les deux cas, l'antibiotique de résistance est le chloramphénicol.

Les BACs sont fabriqués en Californie et nous les commandons directement par internet<sup>4</sup>. Le choix des différents clones est réalisé d'après les points de cassure impliqués dans le remaniement identifié par cytogénétique conventionnelle. Nous devons être en mesure de distinguer les chromosomes normaux de leurs dérivés. Si le patient n'a pas d'anomalie chromosomique constitutionnelle, il se fait selon les chromosomes que nous voulons étudier. Ce choix est déterminant pour analyser la ségrégation méiotique. Il se fait après consultation de divers sites internet<sup>5,6,7</sup>.

<sup>4</sup>: <http://www.chori.org/bacpac>, <sup>5</sup>: <http://ensembl.org>, <sup>6</sup>: <http://sanger.ac.uk>,

<sup>7</sup>: <http://genome.ucsc.edu/>

## 2- Préparation des sondes

### 2.1- Sondes commercialisées

Ces sondes sont à diluer, dans 6  $\mu\text{L}$  final, avec de l'eau distillée et le tampon adapté du fournisseur (Abbott, Rungis, France).

### 2.2- Sondes BACs

L'hybridation sur spermatozoïdes d'un seul BAC spécifique d'un locus, comme cela se fait sur métaphases ou lymphocytes en interphase, n'est pas satisfaisante. Les spermatozoïdes sont des cellules beaucoup plus petites ( $5 \times 3 \mu\text{m}$ ) que les lymphocytes (7 à  $12 \mu\text{m}$ ) et l'ADN est bien plus compacté. L'hybridation d'un seul BAC ne permet pas d'obtenir un spot fluorescent ni suffisamment intense ni suffisamment grand pour une analyse aisée et des résultats fiables. Il a donc été nécessaire de mettre au point l'utilisation de pools de BACs contigus.

#### Pools de BACs

Afin de mettre au point des pools de BACs et de vérifier combien de BACs contigus peuvent être associés pour avoir des signaux suffisants sans pour autant être diffus, nous avons testé 8 pools, sur métaphases et spermatozoïdes, composés de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 BACs du chromosome 17 (Tableau 2).

Chacun d'entre eux a été validé d'abord sur métaphases. Ensuite, les mises au point ont été faites en parallèle sur métaphases et sur spermatozoïdes.

Les tests ont été effectués avec trois marquages différents (spectrum green, red et aqua).

BACs utilisés	Localisation des sondes (locus / début - fin en pb)	Taille des sondes (pb)
(1) RP11-118F13	17q24.3 / 65653752-65814013	160 261
(2) RP11-467K17	17q24.3 / 65852468-66031934	179 467
(3) RP11-1058G23	17q24.3 / 66082371-66272804	190 433
(4) RP11-238F2	17q24.3 / 66270805-66332110	61 305
(5) RP11-1003J3	17q24.3 / 66328112-66530874	202 762
(6) RP11-420O5	17q24.3 / 66528875-66592885	64 010
(7) RP11-879D6	17q24.3 / 66590893-66773165	182 272
(8) RP11-261A13	17q24.3 / 66711133-66856750	145 617

Tableau 2 : BACs du chromosome 17, localisation et taille des sondes.

Les associations de BACs testées sont celles indiquées dans le tableau 3.

BACs poolés	Taille de la région hybridée (Kb)	Taille de la zone couverte (Kb)
1	160	160
1/2	340	378
1/2/3	530	619
1/2/3/4	598	678
1/2/3/4/5	797	877
1/2/3/4/5/6	859	939
1/2/3/4/5/6/7	1039	1119
1/2/3/4/5/6/7/8	1123	1203

Tableau 3 : BACs du chromosome 17 poolés, taille de la région hybridée et étendue de la zone couverte.

Les pools de BACs s'hybrident sur une région de 160 Kb à 1123 Kb. Les BACs choisis sont proches mais pas toujours contigus et l'espace entre deux BACs peut être plus ou moins important. Cela explique que la taille de la zone couverte par un pool de BACs puisse différer quelque peu de la taille de la zone hybridée. Avec les 8 pools différents testés, la taille de la zone couverte va de 160 Kb à 1203 Kb (Tableau 3).

### Mise en culture

Chaque clone est mis en pré-culture dans 2 mL de milieu Luria Bertani (milieu LB), en présence de l'antibiotique de sélection (20 mg/mL de chloramphénicol), à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, 30 µL de la suspension bactérienne (diluée au 100<sup>ème</sup>) sont étalés sur milieu solide LB-Agar/chloramphénicol. Après une nuit à 37°C, une colonie individualisée est prélevée et sert d'inoculum pour une culture dans du milieu liquide

LB/chloramphénicol. Après une nuit à 37°C sous agitation, nous réalisons une extraction au phénol-chloroforme.

### ✚ Extraction de l'ADN

L'extraction de la sonde se fait par lyse bactérienne en utilisant une solution à base de NaOH concentré. Les culots bactériens sont mis en suspension dans 0,8 mL de GTE 1X lysozyme (glucose tris EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid), mélangés par vortex et incubés 15 minutes dans la glace. Le glucose permet de maintenir une bonne osmolarité, l'EDTA chélate les ions divalents, le Tris stabilise le pH à 8,0 et le lysosyme dégrade les constituants de la paroi bactérienne. Puis 1,6 mL de SDS 1% (sodium dodecylsulfate) / NaOH 0,2 N sont ajoutés aux suspensions bactériennes. Le SDS dénature les protéines en créant des brèches dans le système membranaire des bactéries et le NaOH dénature les acides nucléiques. Après avoir laissé 5 minutes dans la glace, 1,2 mL d'acétate de potassium 3 M sont ajoutés. Il participe à la lyse cellulaire. Le potassium précipite le SDS ainsi que les protéines et les lipides tandis que l'ADN et l'ARN restent en solution aqueuse. Après 15 minutes dans la glace, la suspension est centrifugée 25 minutes à 4°C et à 2 800 g. Le filtrat est récupéré et 1,8 mL d'isopropanol (précipite les acides nucléiques) sont ajoutés. Après 20 minutes dans la glace, une centrifugation de 15 minutes à 4°C, à 2 800 g est réalisée.

Le culot est remis en suspension avec 0,5 mL de TE 1X (Tris HCl + EDTA). L'EDTA est un détergent qui détruit les cellules. Il permet la dissociation des membranes et chélate les ions divalents nécessaires au fonctionnement des nucléases. Le tris HCl permet d'avoir un pH basique ( $\approx 8$ ).

Les ARN sont précipités avec 0,5 mL de LiCl 5M (chlorure de lithium). Après agitation par vortex, les tubes Falcon® sont déposés 15 minutes dans la glace puis centrifugés 15 minutes à 4°C, à 2 800 g.

Le surnageant est récupéré, 3 mL d'éthanol absolu sont ajoutés dans le but de précipiter l'ADN. Après 35 minutes à  $-80^{\circ}\text{C}$  et une centrifugation de 25 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ , à 2 800 g, le surnageant est éliminé.

Le culot est repris dans 300  $\mu\text{L}$  de TE 1X et 7  $\mu\text{L}$  de RNases à 10 mg/mL sont ajoutés pour éliminer les ARN ayant subsisté jusque là. Après incubation d'une heure à  $37^{\circ}\text{C}$ , 10 mL de protéinase K à 10 mg/mL sont ajoutés pour digérer les protéines. Puis, les tubes sont incubés une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ .

Afin de purifier l'ADN extrait, 400  $\mu\text{L}$  de phénol/chloroforme sont ajoutés. Le phénol est un déprotéinisant puissant et le chloroforme permet d'extraire le phénol. L'extraction se poursuit par une centrifugation de 10 minutes à température ambiante à 13 000 g. Une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN et une phase inférieure (phase chloroformique) sont obtenues. Après avoir récupéré la phase supérieure, 100  $\mu\text{L}$  d'acétate d'ammonium à 7,5 M sont ajoutés puis 600  $\mu\text{L}$  d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN.

Une phase de repos de 30 minutes à  $-80^{\circ}\text{C}$  ainsi qu'une centrifugation de 15 minutes à 13 000 g à température ambiante sont ensuite nécessaires. Une fois le surnageant éliminé, 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol à  $70^{\circ}$  sont déposés sans remise en suspension du culot. Le lavage se poursuit par une centrifugation de 10 minutes à 13 000 g à température ambiante suivie de l'élimination du surnageant.

Le culot sec est repris par 50 à 100  $\mu\text{L}$  de TE 1X selon la taille puis remis en suspension. Le TE 1X contient de l'EDTA pour inactiver les DNases Mg-dépendantes.

L'évaluation de la concentration en ADN extrait et le degré de pureté sont établis par mesure de la densité optique (DO) par spectrométrie UV à 260 nm (absorption des acides nucléiques) et à 280 nm (absorption des protéines). Le rapport DO260/DO280 permet d'estimer le degré de contamination protéique, sa valeur doit être comprise entre 1,8 et 2 pour une préparation de pureté satisfaisante.

Une fois l'ADN récupéré, il doit être marqué par des fluorochromes. Le marquage se fait par nick-translation.

### ✚ Marquage par Nick-Translation

Ce marquage s'effectue sur le vecteur plasmidique contenant l'insert, par cassures aléatoires simple brin de l'ADN par la DNase I, dégradation au niveau de ces cassures (activité exonucléase 5'-3') et repolymérisation (activité polymérase 5'-3') de fragments d'ADN par la DNA polymérase I, au niveau de ces cassures avec incorporation de bases nucléotidiques dont l'une couplée à un fluorochrome. Les sondes sont ainsi marquées directement par un fluorochrome (spectrum green ou spectrum orange ou spectrum aqua). Les marquages dont la fluorescence émet dans le vert et le rouge sont réalisés à l'aide d'un Kit Abbott et le marquage dont la fluorescence émet dans le bleu s'est faite à l'aide du kit Atto425 Nick Translation (Jena Bioscience commercialisé par Euromedex, Mundolsheim, France). Un mélange de 1,25  $\mu\text{g}$  d'ADN, 1,3  $\mu\text{L}$  de dUTP (nucléotides couplés à un fluorochrome) à 0,2 mmol, 2,5  $\mu\text{L}$  de dTTP à 0,1 mmol, 5  $\mu\text{L}$  de dNTP à 0,1 mmol, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon 10X, 5  $\mu\text{L}$  d'enzymes et le volume d'eau distillée nécessaire pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$  est laissé une nuit à 15°C. La réaction est bloquée le lendemain par un bain à 70°C pendant 10 minutes suivi d'une étape de 10 minutes dans la glace.

Avant de pouvoir hybrider les sondes sur l'ADN contenu dans les spermatozoïdes, une étape de précipitation est nécessaire afin de concentrer les sondes à utiliser.

### ✚ Précipitation des sondes

Les étapes de précipitation étaient toujours réalisées BAC par BAC. Mais comme il est nécessaire d'associer plusieurs BACs contigus pour une hybridation sur spermatozoïdes, l'étape de précipitation a été adaptée afin de précipiter plusieurs BACs en une seule réaction.

Cinq microlitres de chaque BAC préalablement marqué sont mis dans un tube avec 1  $\mu\text{L}$  d'ADN cot 1 (1 mg/mL) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (sature les séquences répétées de l'ADN afin de limiter les hybridations non spécifiques), 4  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, 1,5  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3M (agent aidant à la précipitation) et 35  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 100°.

L'ensemble est mélangé par léger vortex avant d'être laissé 20 minutes dans la glace. Après centrifugation de 40 minutes à 16 000 g, à 4°C et élimination du surnageant, le culot est repris par 1 µL d'eau distillée et 4 µL de tampon LSI (Abbott). Il contient la sonde, constituée du pool de BACs, prête à l'emploi.

### 3- Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

#### 3.1-Sur sang

##### ✚ Pré-traitement des cellules des patients et hybridation

Le matériel biologique subit une étape de pré-traitement afin de perméabiliser les membranes cellulaires pour faciliter l'entrée des sondes nucléiques et d'éliminer les débris pouvant créer un bruit de fond en fixant de manière aspécifique les sondes fluorescentes.

Ainsi, les étalements sont plongés dans une solution de SSC (sodium saline citrate) 2X/0,4%NP40 pendant 30 minutes à 37°C. Les échantillons sont de nouveau déshydratés dans des bains d'éthanol de titre croissant (70°, 90°, 100°) puis séchés à l'air libre.

Pour chacun des échantillons, nous réalisons une dénaturation simultanée de l'ADN cible et des sondes nucléiques. Cette co-dénaturation s'effectue dans un appareil automatique d'hybridation, l'HYBrite® (Abbott).

Pour chaque étalement, les lames sont placées sur l'HYBrite®. Les sondes sont déposées, à 45°C, sur la préparation avant d'être recouvertes d'une lamelle de 22x22 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne). Celle-ci est scellée avec du rubber cement® (Starkey Chemiccil Process, Lagrange, IL). La co-dénaturation s'effectue à une température de 70°C pendant 1 minute puis l'hybridation se fait pendant 1 nuit à 37°C dans une chambre humide.

### ✚ Lavages post-hybridation

Après l'étape d'hybridation proprement dite, les prélèvements sont plongés dans une solution de SSC 0,4X/0,3%NP40 pendant 40 secondes à 72°C puis dans une solution de SSC 2X/0,1%NP40 à température ambiante pendant 15 secondes. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre.

Toutes ces étapes sont réalisées à l'abri de la lumière.

### ✚ Contre-coloration de l'ADN

Les lames sont ensuite montées avec un intercalant de l'ADN, le DAPI (1,5 µg/mL) (Vectashield® Mountig Medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Excitable dans les UV, il émet dans le bleu.

### ✚ Analyse au microscope à fluorescence et interprétation

L'analyse des signaux fluorescents s'effectue au microscope Zeiss-axioplan (Zeiss). Différents filtres sont nécessaires pour la lecture des lames. Le microscope est relié à une caméra de haute sensibilité. Les images sont capturées à l'aide d'un logiciel informatique (ISIS : *In Situ* Imaging System de MetaSystems, Altlussheim, Allemagne) permettant l'analyse des signaux.

Pour chaque lame hybridée, environ 10 métaphases sont analysées afin de vérifier la bonne localisation des sondes, leur spécificité (absence de cross-hybridation) et de déceler un éventuel polymorphisme.

## 3.2-Sur sperme

Le sperme est lavé deux fois par ajout de PBS (phosphate buffered saline) 1X suivi d'une centrifugation à 600 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension, puis étalées sur des lames sèches et dégraissées. Après séchage à l'air libre, les lames sont plongées dans une solution de Carnoy

(méthanol : acide acétique 3 vol : 1 vol) pendant une nuit pour permettre la fixation des cellules.

#### ✚ Etape de décondensation

Les noyaux des spermatozoïdes, caractérisés par une condensation importante du matériel nucléaire, subissent une première étape de décondensation de la chromatine. Les lames sont plongées dans une solution de NaOH 1N, à température ambiante, pendant une durée de 3 minutes environ. Les lames sont ensuite mises dans une solution de SSC 2X, à température ambiante, pendant 10 minutes avant d'être déshydratées dans des solutions de titre croissant d'éthanol (70°, 90°, 100°). Enfin, elles sont séchées à l'air libre. Les lames sont alors observées au microscope en contraste de phase. Une décondensation convenable, pour permettre une hybridation *in situ*, est évaluée par la taille des têtes de spermatozoïdes : celle-ci doit être égale à environ 2 fois la taille initiale.

Ensuite le matériel spermatique subit les mêmes étapes que celles indiquées en cytogénétique moléculaire sur sang.

#### ✚ Analyse au microscopique à fluorescence et interprétation

L'analyse des signaux fluorescents s'effectue au microscope Zeiss-axioplan (Zeiss) avec les filtres adéquats.

Pour toutes les études, plus de 1 000 spermatozoïdes, si possible, sont analysés en utilisant des critères stricts de sélection. Le spermatozoïde doit être une cellule isolée avec un contour bien défini et présenter un flagelle. Les signaux seront comptabilisés s'ils sont de même intensité et s'il existe un espace correspondant au diamètre d'un signal entre deux signaux.

## II.C- Validations des BACs

### 1- Pools de BACs sur spermatozoïdes

L'analyse au microscope à fluorescence des lames de spermatozoïdes a montré que les hybridations des pools 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 marqués par des fluorochromes vert, rouge et bleu ont toutes fonctionné. L'analyse des pools de BACs, marqués en vert et en rouge, a montré qu'une taille de 340 Kb, est nécessaire et suffisante pour une analyse correcte des noyaux. Il n'y a pas de bruit de fond et les signaux ne sont pas diffus même avec le pool de 8 BACs. Quant à la taille du pool de BACs contigus, marqués en bleu, nécessaire et suffisante pour que le signal soit visible au microscope, elle est de 530 Kb. En deçà, l'intensité et la taille des spots sont insuffisantes pour une analyse confortable.

En revanche, la taille des signaux n'est pas fondamentalement différente selon les pools quelque soit le fluorochrome utilisé, c'est surtout l'intensité des signaux qui est améliorée. Le taux moyen d'hybridation est de 97,7% en vert, rouge et bleu.

Enfin, nous avons hybridé 3 pools de BACs marqués par 3 fluorochromes différents afin de vérifier qu'il est tout à fait possible d'hybrider les spermatozoïdes à la fois par des BACs marqués en vert, en rouge et en bleu.

### 2- Pools de BACs *versus* sondes commerciales

Afin de valider l'utilisation de nos pools de BACs, nous avons analysé les ségrégations méiotiques de 6 patients porteurs d'anomalies chromosomiques de structure avec des sondes commerciales puis avec des pools de BACs. La FISH est réalisée sur le même éjaculat pour chaque patient. Les patients étudiés et les pools de BACs utilisés sont indiqués dans le tableau 4. La comparaison des profils de ségrégation méiotique obtenus par les sondes commerciales à ceux obtenus par les sondes BACs a été effectuée grâce au test statistique  $\chi^2$  à l'aide du logiciel SPSS 15.0 (SPSS Inc., Paris, France).

Formule caryotypique	Pools de BACs		
	5p15.2 (Vert)	5q31.2 (Rouge)	9q12 (Aqua)
P1 : 46,XY,inv(5)(p12q12)	RP11-598A20 RP11-242C17 RP11-412H2 RP11-639D9	RP11-264B21 RP11-1149H12 RP11-461O14 RP11-696D22 RP11-649P24	RP11-1127I17 RP11-759E5 RP11-59I10 RP11-120E5
	8p23.3 (Vert)	8q24.3 (Rouge)	9q12 (Aqua)
P2 : 46,XY,inv(8)(p12q21) P3 : 46,XY,inv(8)(p23q24)	RP11-43A14 RP11-105F11 RP11-52B23 RP11-115H22	RP11-890K16 RP11-265N12 RP11-435A16 RP11-910B18	RP11-1127I17 RP11-759E5 RP11-59I10 RP11-120E5
	14q32.2 (Vert)	18q11.1 (Aqua)	18q21.2 (Rouge)
P4 : 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3)	RP11-915D17 RP11-1140P17 RP11-242A7 RP11-57E12 RP11-464J3	RP11-96C18 RP11-1035O2 RP11-746M23 RP11-311F3	RP11-1072K4 RP11-111P8 RP11-1073H21 RP11-241J19
	13q14.12 (Vert)	14q32.2 (Rouge)	
P5 : 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) P6 : 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	RP11-789H24 RP11-30F20 RP11-624O9 RP11-61H13	RP11-915D17 RP11-1140P17 RP11-242A7 RP11-57E12 RP11-464J3	

Tableau 4 : Pools de BACs utilisés afin d'étudier la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes de 6 patients porteurs d'anomalies chromosomiques de structure.

Les résultats de l'analyse de la ségrégation méiotique par des sondes commerciales et par des sondes BACs sont indiqués ci-dessous (Tableaux 5 et 6). Les profils de ségrégation méiotique apparaissent identiques, le ratio de spermatozoïdes normaux par rapport aux anormaux ne diffère pas ( $p > 0,05$ ).

P1 46,XY,inv(5)(p12q12)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VRA (haploïde)	2594 (97,41)	2035 (98,21)
VVA (dup(p)/del(q))	0 (0)	0 (0)
RRA (dup(q)/del(p))	0 (0)	0 (0)
VVRRAA (diploïde)	33 (1,24)	15 (0,72)
VVRRRA (disomie 5)	24 (0,90)	5 (0,24)
VRAA (disomie 9)	0 (0)	0 (0)
Autres	12 (0,45)	17 (0,83)
Total	2663 (100)	2072 (100)

P2 46,XY,inv(8)(p12q21)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VRA (haploïde)	3300 (97,00)	2469 (97,13)
VVA (dup(p)/del(q))	34 (1,00)	17 (0,67)
RRA (dup(q)/del(p))	15 (0,44)	19 (0,75)
RRVVAA (diploïde)	11 (0,32)	9 (0,35)
VVRRRA (disomie 8)	5 (0,15)	0 (0)
VRAA (disomie 9)	4 (0,12)	7 (0,27)
Autres	33 (0,97)	21 (0,83)
Total	3402 (100)	2542 (100)

P3 46,XY,inv(8)(p23q24)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VRA (haploïde)	1248 (61,03)	907 (60,43)
VVA (dup(p)/del(q))	409 (20,00)	289 (19,25)
RRA (dup(q)/del(p))	362 (17,70)	287 (19,12)
RRVVAA (diploïde)	14 (0,68)	11 (0,73)
VVRRRA (disomie 8)	0 (0)	0 (0)
VRAA (disomie 9)	2 (0,10)	0 (0)
Autres	10 (0,49)	7 (0,47)
Total	2045 (100)	1501 (100)

Tableau 5 : Résultats de l'analyse de la ségrégation méiotique dans les gamètes des patients P1 à P3 porteurs d'une inversion péricentrique, à l'aide de sondes commerciales et de sondes BACs.

P4 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VRA (Alterne)	131 (90,97)	55 (87,30)
VRRRAA (Adjacent)	1 (0,70)	0 (0)
V (Adjacent)	4 (2,78)	1 (1,60)
VVRA (Adjacent)	3 (2,08)	2 (3,17)
RA (Adjacent)	2 (1,39)	3 (4,76)
VVRRRAA (3:0 ou diploïde)	0 (0)	0 (0)
Autres	3 (2,08)	2 (3,17)
Total	144 (100)	63 (100)

P5 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VR (Alterne)	1600 (91,22)	482 (92,16)
VRR (Adjacent)	32 (1,82)	9 (1,72)
VVR (Adjacent)	25 (1,43)	10 (1,91)
R (Adjacent)	49 (2,79)	8 (1,53)
V (Adjacent)	29 (1,65)	12 (2,30)
VVRR (3:0 ou diploïde)	14 (0,80)	2 (0,38)
Autres	5 (0,29)	0 (0)
Total	1754 (100)	523 (100)

P6 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	Sondes commerciales	Sondes BACs
Combinaisons fluorescentes (équipement chromosomique)	Nombre de spermatozoïdes (%)	Nombre de spermatozoïdes (%)
VR (Alterne)	1600 (86,67)	892 (88,76)
VRR (Adjacent)	52 (2,82)	36 (3,58)
VVR (Adjacent)	60 (3,25)	29 (2,88)
R (Adjacent)	66 (3,57)	21 (2,09)
V (Adjacent)	57 (3,09)	26 (2,59)
VVRR (3:0 ou diploïde)	7 (0,38)	1 (0,10)
Total	1846 (100)	1005 (100)

Tableau 6 : Résultats de l'analyse de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'un patient 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) et de deux patients P5 et P6 porteurs d'une translocation robertsonienne, à l'aide de sondes commerciales et de sondes BACs.

### III- Génétique

#### III.A- Microdélétions du chromosome Y

Nous avons mis au point une technique de recherche des microdélétions du chromosome Y afin de l'utiliser chez des patients infertiles ayant de très faibles numérations spermatiques. L'ADN des patients est extrait à partir de sang ou à partir de cellules buccales. La recherche de microdélétions se fait ensuite grâce à des PCR multiplex.

#### 1- Extraction de l'ADN à partir de sang et de cellules buccales

##### 1.1- Sang

La mise au point de la recherche de microdélétions du chromosome Y a d'abord été effectué sur de l'ADN extrait à partir de prélèvements sanguins. Nous avons extrait l'ADN à partir de 3 femmes (T1, T4, T5) et de 2 hommes (T2, T3). Pour tous ces témoins, le sang a été prélevé sur héparine-lithium. En revanche, pour T3, nous avons pu obtenir également un prélèvement sanguin sur EDTA. Les couples d'amorces ont été testées sur les deux prélèvements de T3 afin de s'assurer que l'anticoagulant n'avait pas d'impact négatif sur le déroulement des PCR multiplex.

L'extraction d'ADN à partir de sang a été réalisée selon les recommandations données avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Pour récupérer la fraction leucocytaire (ou "buffy coat"), les tubes de sang sont centrifugés pendant 10 minutes à 2500 g à température ambiante. Les leucocytes sont placés dans un tube Eppendorf® dans lequel sont ajoutés 30 µL de protéinase K, 200 µL de buffy coat ainsi que 180 µL de tampon AL. Le tout est homogénéisé puis incubé à 56°C pendant 30 minutes. Après ajout de 200 µL d'éthanol absolu, le mélange est transféré dans une colonne puis centrifugé 1 minute à vitesse maximum. Le filtrat est éliminé, 500 µL de tampon Aw1 sont ajoutés puis une nouvelle centrifugation de 1 minute à vitesse maximum est réalisée. Le filtrat est à nouveau éliminé, après addition de 500 µL de tampon Aw2, une centrifugation est effectuée à vitesse maximum pendant 3 minutes. Le filtrat est à nouveau éliminé et la même centrifugation de 3 minutes est renouvelée, suivie de l'élimination du filtrat. Dans chaque colonne, 200 µL de tampon d'éluion AE

sont alors déposés. Après incubation à température ambiante pendant 5 minutes, les colonnes sont centrifugées à 6 000 g pendant 1 minute. L'éluant contenant l'ADN est conservé et quantifié.

Les quantifications d'ADN sont réalisées sur un Nanophotomètre (Eurolabo, Paris, France).

Parmi tous les témoins testés, la concentration d'ADN récupéré était comprise entre 11 et 171 ng/ $\mu$ L par volume final de 200  $\mu$ L. La quantité d'ADN récupéré à partir d'un tube de sang est comprise entre 9,23  $\mu$ g et 41,68  $\mu$ g.

## 1.2- Cellules buccales

Nous avons également mis au point une extraction d'ADN à partir de cytobrosses. En effet, ce mode de prélèvement (récupération de cellules buccales) est rapide, non invasif et donc bien accepté par la plupart des patients. Pour chaque patient, les prélèvements sont réalisés sur deux cytobrosses. L'ADN est extrait à partir de cytobrosses du témoin T2 et de 4 patients (P5, P6, P7 et P8). Plusieurs techniques ont été testées afin d'obtenir un maximum d'ADN de bonne qualité.

Après avoir testé plusieurs techniques, nous avons choisi d'extraire l'ADN à l'aide du kit NucleoSpin® de Macherey-Nagel® (Hoerdt, France). Chaque cytobrosse est déposée dans un cryotube de 2 mL où sont ajoutés 600  $\mu$ L de tampon de lyse T1, 25  $\mu$ L de protéinase K à environ 22 mg/mL et 600  $\mu$ L de tampon de lyse B3. Après mélange, le tout est incubé à 70°C pendant 10 minutes puis centrifugé 5 minutes à 14 000 g. L'écouvillon est alors retiré et 600  $\mu$ L d'éthanol absolu sont ajoutés. Après mélange, 600  $\mu$ L de la solution sont déposés dans une colonne, le tout est centrifugé 1 minute à 11 000 g et le filtrat est éliminé. Ceci est répété autant de fois que nécessaire jusqu'à épuisement de la solution. Dans chaque colonne sont ajoutés 500  $\mu$ L de tampon de lavage BW avant une centrifugation de 1 minute à 11 000 g. Le filtrat est jeté, une nouvelle centrifugation est faite et 600  $\mu$ L d'un second tampon de lavage B5 sont ajoutés sur chaque colonne. Après une centrifugation de 1 minute à 11 000 g et rejet du filtrat, une nouvelle centrifugation est réalisée pour éliminer les résidus d'éthanol. Chaque colonne

est déposée dans un tube Eppendorf® et 50  $\mu\text{L}$  de tampon BE préalablement chauffé à 70°C sont élués par une centrifugation de 1 minute à 11 000 g, après une incubation de 5 minutes à température ambiante. Cette opération est renouvelée afin d'obtenir un volume final de 100  $\mu\text{L}$ .

La concentration d'ADN extrait est comprise entre 15 ng/ $\mu\text{L}$  et 65 ng/ $\mu\text{L}$  dans un volume final de 100  $\mu\text{l}$  soit une quantité d'ADN comprise entre 1,5  $\mu\text{g}$  et 6,5  $\mu\text{g}$  par cytobrosse.

## 2- Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex

### 1.1- Sur témoins

Le principe de la PCR, mise en place par Mullis (Mullis *et al.*, 1986), consiste à multiplier le nombre de copies d'une (PCR simple) ou plusieurs (PCR multiplex) séquence(s) cible(s) d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase. Chaque cycle de PCR est constitué d'une étape de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'une étape de polymérisation. A chaque cycle de PCR, le nombre de séquence(s) cible(s) est doublé, ainsi, en théorie, à partir d'un nombre de cycles de PCR n, le nombre de copies obtenues est de  $2^n$ .

Tous les mélanges ont été mis au point sur témoins (hommes et femmes).

### 1.2- Sur patients

Une recherche de microdélétions en aveugle a été faite ensuite sur l'ADN préalablement extrait de 4 patients (P1, P2, P3 et P4), fourni par Le Dr Aknin (Service de Biologie de la Reproduction, St-Etienne, France) afin de valider la technique. Chacun de ces patients avait une microdélétion connue, préalablement identifiée par le Dr Aknin.

De plus, une recherche de microdélétions a été par la suite réalisée chez 4 autres patients (P5, P6, P7 et P8) à partir de cellules buccales prélevées par le Dr Amice (Service de Biologie de la Reproduction, Brest, France). Pour ceux-ci, la présence ou non d'une microdélétion nous était inconnue.

### 1.3- Mises au point

Afin de mettre en évidence des microdélétions du chromosome Y, nous utilisons des marqueurs, des STS, qui sont des séquences spécifiques situées le long du chromosome Y. Celles-ci sont amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne en utilisant des amorces spécifiques des régions à étudier. Une fois l'amplification effectuée, les produits de PCR migrent, par électrophorèse, sur gel d'agarose. En cas de microdélétion, le produit d'amplification correspondant à la région microdélétée sera absent du gel de migration. Pour valider cette technique, il est nécessaire d'utiliser un contrôle interne comme SRY (Yp11.3), généralement présent chez un homme de morphotype masculin. Le choix des STS se fait principalement en fonction des recommandations de l'European Academy of Andrology (EAA) (Simoni *et al.*, 2004). Celles-ci indiquent qu'un minimum de 6 STS doivent être analysés pour permettre le diagnostic de plus de 90% des microdélétions des régions AZFa, b et c. Toutes les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 7 (Eurogentec®, Angers, France).

STS	Séquences d'amorces sens	Séquences d'amorces antisens
SRY	GAATATTC <del>CCG</del> CTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
ZFY	ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
sY82	ATCCTGCCCTTCTGAATCTC	CAGTGTCCACTGATGGATGA
sY83	CTTGAATCAAAGAAGGCCCT	CAATTTGGTTTGGCTGACAT
sY84	AGA AGGGTCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY86	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT
sY87	TCTGTTGCTTGAAAAGAGGG	ACTGCAGGAAGAATCAGCTG
sY88	TTGTAATCCAAATACATGGGC	CACCCAGCCATTTGTTTTAC
sY95	TCCTACAGATGTCCAAAGTGC	GATGAGTGACCCAGAATTG
sY117	GTTGGTTCCATGCTCCATAC	CAGGGAGAGAGCCTTTTACC
sY127	GGCTCACAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
sY134	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTCAA
sY135	CATTTCCACATTATGATAATTATGC	ACCCAGAGAGTAGAAACAGTGC
sY142	AGCTTCTATTGAGGGCTTC	CTCTCTGCAATCCCTGACAT
sY143	GCAGGATGAGAAGCAGGTAG	CCGTGTGCTGGAGACTAATC
sY152	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA	ACAGGAGGGTACTTAGCAGT
sY157	CTTAGGAAAAGTGAAGCCG	CCTGCTGTCAGCAAGATACA
sY158	CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC	ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA
sY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCATGTGCAGCCAC
sY1015	ACGGTCACTATGCAAGGAAA	GCTTGACCATACCGTTGAGG
sY1125	GTGGGGGTTTCACATTATGG	GGTCACAGACTCACATTTAAGCA
sY1192	ACTACCATTTCTGGAAGCCG	CTCCCTTGGTTTCATGCCATT
sY1197	TCATTTGTGTCTTCTCTTGGGA	CTAAGCCAGGAACCTGCCAC

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour la recherche de microdélétions du chromosome Y.

Afin de limiter le nombre de réactions de PCR, nous avons réalisé des PCR multiplex (à 2 ou 4 couples d'amorces) (Tableau 8).

Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4	Mélange 5	Mélange 6	Mélange 7	Mélange 8	Mélange 9	Mélange 10
SRY	ZFY	sY135 AZFb	sY82 AZFa	sY83 AZFa	sY95 AZFa	sY157 AZFc	sY143 AZFb	sY1015 AZFb	sY1197 AZFb
sY84 AZFa	sY254 AZFc	sY88 AZFa	sY152 AZFc	sY142 AZFb	sY1192 AZFc	sY158 AZFc	sY117 AZFb	sY87 AZFa	sY1125 AZFc
sY134 AZFb	sY86 AZFa								
sY255 AZFc	sY127 AZFb								

Tableau 8 : Association des STS utilisés et loci concernés pour la recherche de microdélétions du chromosome Y.

Pour tous les patients, les mélanges 1 et 2 sont tout d'abord utilisés. S'il manque les bandes correspondant à AZFa, alors les mélanges 3, 4, 5, 6 et 9 sont effectués en plus. S'il manque les bandes correspondant à AZFb, alors les mélanges 3, 5, 8, 9 et 10 sont également effectués. S'il manque les bandes correspondant à AZFc, alors les mélanges 4, 6, 7 et 10 sont aussi réalisés.

Les conditions retenues pour préparer les mélanges de PCR sont décrites dans le tableau 9.

	Conditions pour les mélanges 1 et 2	Conditions pour les mélanges 3 à 10
	Volume/tube 25 $\mu$ L	Volume/tube 25 $\mu$ L
Eau distillée ( $\mu$ L)	25-(13,38 + vol ADN)	25-(8,13 + vol ADN)
Tampon 10X (QIAGEN) ( $\mu$ L)	2,5	2,5
dNTP (10 mM) ( $\mu$ L) (Invitrogen)	0,5	0,5
Mg <sup>2+</sup> 25 mM ( $\mu$ L) (QIAGEN)	0,25	0
Amorce sens 10 $\mu$ M ( $\mu$ L)	1,25 x 4	1,25 x 2
Amorce antisens 10 $\mu$ M ( $\mu$ L)	1,25 x 4	1,25 x 2
Hotstart 5u/ $\mu$ L ( $\mu$ L) (QIAGEN)	0,13	0,13
ADN ( $\mu$ L)	Volume pour 62,5 ng	Volume pour 62,5 ng

Tableau 9 : Conditions de PCR pour l'amplification de STS du chromosome Y.

Parmi les 10 mélanges, 6 sont incubés à 58°C lors de l'étape d'hybridation et 4 à 56°C. Les conditions retenues pour les cycles de PCR (T3000 Thermocycler, Biometra, Goettingen, Allemagne) sont indiquées dans le tableau 10.

Température (°C)	Etape	Durée	Nombre de cycles
95	Activation Taq	15 min	
94	Dénaturation	30 sec	35
56 pour les mélanges 3 à 6 58 pour les mélanges 1, 2 et 7 à 10	Hybridation	45 sec	
72	Elongation	1 min 30	
72	Extension finale	5 min	

Tableau 10 : Programmes de PCR utilisés pour l'amplification de STS du chromosome Y.

La migration des produits de PCR se fait sur des gels d'agarose (Eurobio, Les Ulis, France) à 2% avec 0,005% de bromure d'éthidium (bet) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Dans chaque puits, 2  $\mu$ L de tampon de charge 6X (0,25% de bromophénol blue, 0,25% de xylène cyanol, 15% de Ficoll, H<sub>2</sub>O distillée) sont déposés avec 9  $\mu$ L de produit de PCR. Un marqueur de taille (SmartLadder®, Eurogentec) est utilisé à raison de 5  $\mu$ L par puits. Les produits de PCR migrent environ 40 minutes à 150 V. La présence des bandes est ensuite vérifiée à l'aide d'un système d'imagerie à très haute résolution Infinity® (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Ce système comprend une chambre noire, une table à UV et une caméra ultra haute sensibilité, reliée à un ordinateur et le logiciel d'acquisition Infinity-Capt v12.9 (Vilbert-Lourmat, Torcy, France).

### 3- Validation de la technique sur témoins

L'analyse des bandes après migration des produits de PCR pour les mélanges 1 et 2 montre les 8 bandes attendues pour les témoins masculins (Photo 1). Aucune différence n'est visible pour T3 que le prélèvement sanguin soit sur héparine-lithium (T3H) ou sur EDTA (T3EDTA).

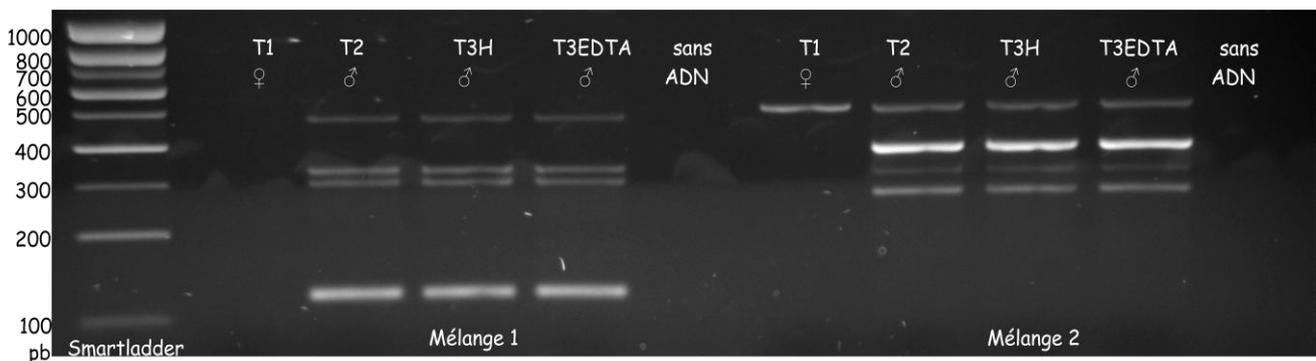


Photo 1 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez des témoins, après extraction de l'ADN à partir de sang, lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

Pour le mélange 1, le témoin T1 féminin ne montre aucune bande comme attendu. Pour le mélange 2, la première bande est ZFY (Zinc Finger Y-linked gene) (492 pb). Elle est

visible chez tous les témoins, car ce couple d'amorces amplifie une région en Yp22.3 et en Xq34. Il s'agit d'un témoin positif.

Les 8 couples utilisés pour les mélanges 1 et 2 sont fonctionnels.

Concernant le mélange 3 (Photo 2), aucune bande n'est visible pour T1, témoin féminin. Pour les 2 témoins masculins, la première bande est sY135 (253 pb), la troisième bande est sY88 (123 pb). La deuxième bande est inattendue mais elle est systématiquement retrouvée, à la même taille, quelque soit le témoin utilisé. Il s'agit d'une amplification non spécifique qui ne nuit pas à une interprétation correcte.

Le mélange 4 (Photo 2) montre les 2 bandes attendues chez un homme n'ayant pas de microdélétion pour les STS sY82 (264 pb) et sY152 (125 pb).

Le mélange 5 (Photo 2) indique les 2 bandes attendues chez les 2 témoins masculins (sY83 - 277 pb et sY142 - 196 pb). En revanche, nous voyons également une bande correspondant à sY83 pour le témoin féminin.

Le mélange 6 montre les bandes attendues (sY95 - 303 pb et sY1192 - 255 pb). La multitude de bandes présentes pour le témoin féminin n'est pas observé chez les témoins masculins et ne gêne donc pas l'interprétation.

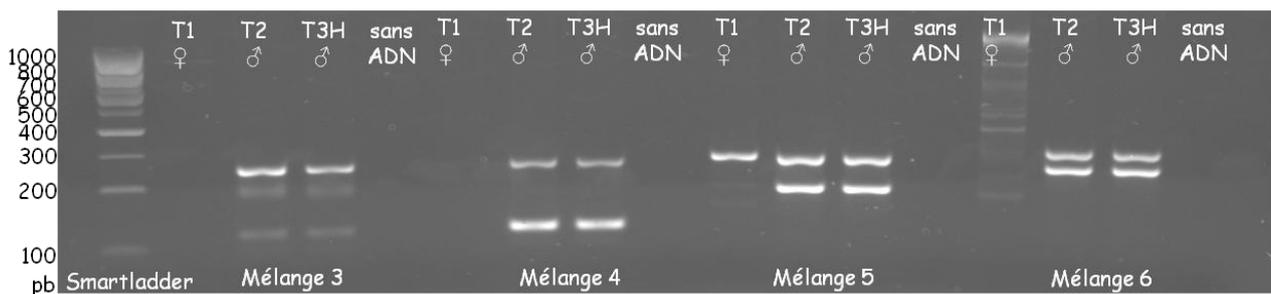


Photo 2 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 3 à 6 chez des témoins, après extraction de l'ADN à partir de sang, lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

Afin de contrôler le couple d'amorces spécifiques du STS sY83 chez les femmes, nous avons amplifié l'ADN de deux autres femmes (46,XX) (T4 et T5) avec ce même couple

d'amorces et à nouveau l'ADN de la femme T1. Nous obtenons exactement le même profil de bandes pour toutes les femmes (Photo 3).

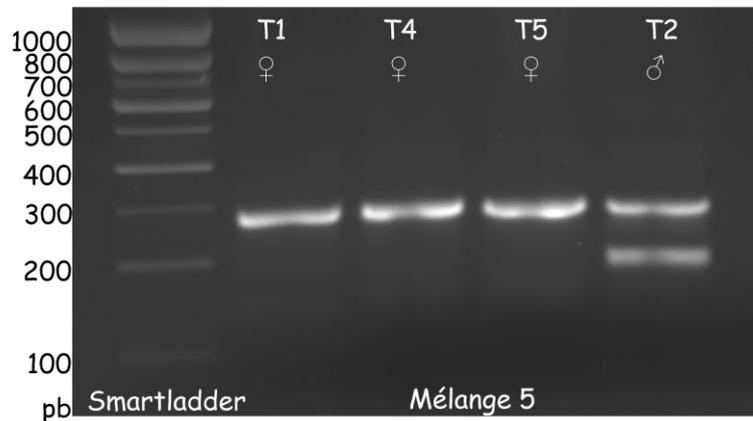


Photo 3 : Profils de migration électrophorétique des STS sY83 et sY142 amplifiés chez trois femmes (T1, T4 et T5) et un homme (T2) après extraction de l'ADN à partir de sang.

Afin de comprendre cette amplification inattendue de sY83 chez les femmes, nous avons effectué une recherche d'homologie de séquences sur ncbi<sup>8</sup>. Il s'avère que le couple d'amorces utilisé pour l'amplification de sY83 est capable d'amplifier également des régions sur les chromosomes 3, 7, 12, 19 et X en raison d'une homologie de séquences comprise entre 65 et 99% (Figure 26). Ce couple d'amorces peut donc servir uniquement de contrôle positif.

<sup>8</sup> : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">NW_001842435.2</a>	Homo sapiens chromosome Y genomic contig, alternate assembly	<a href="#">512</a>	875	100%	7e-143	100%
<a href="#">NT_011875.11</a>	Homo sapiens chromosome Y genomic contig, reference assembly	<a href="#">512</a>	1770	100%	7e-143	100%
<a href="#">NW_001842438.1</a>	Homo sapiens chromosome Y genomic contig, alternate assembly	<a href="#">372</a>	372	97%	1e-100	91%
<a href="#">NW_001838877.2</a>	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, alternate assembly	<a href="#">335</a>	335	99%	2e-89	88%
<a href="#">NT_022517.17</a>	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, reference assembly	<a href="#">335</a>	335	99%	2e-89	88%
<a href="#">NT_030008.6</a>	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, reference assembly	<a href="#">324</a>	324	97%	3e-86	88%
<a href="#">NW_001842396.2</a>	Homo sapiens chromosome X genomic contig, alternate assembly	<a href="#">318</a>	318	98%	2e-84	87%
<a href="#">NW_001839006.2</a>	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, alternate assembly	<a href="#">318</a>	318	97%	2e-84	87%
<a href="#">NT_011786.15</a>	Homo sapiens chromosome X genomic contig, reference assembly	<a href="#">318</a>	637	98%	2e-84	87%
<a href="#">NW_001838055.2</a>	Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, alternate assembly	<a href="#">265</a>	265	97%	2e-68	84%
<a href="#">NT_009714.16</a>	Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, reference assembly	<a href="#">265</a>	265	97%	2e-68	84%
<a href="#">NW_001842441.2</a>	Homo sapiens chromosome Y genomic contig, alternate assembly	<a href="#">261</a>	261	86%	3e-67	86%
<a href="#">NW_001842363.1</a>	Homo sapiens chromosome X genomic contig, alternate assembly	<a href="#">246</a>	246	67%	8e-63	90%
<a href="#">NT_079573.3</a>	Homo sapiens chromosome X genomic contig, reference assembly	<a href="#">246</a>	246	67%	8e-63	90%
<a href="#">NW_001838484.1</a>	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly	<a href="#">224</a>	224	65%	4e-56	89%
<a href="#">NT_011295.10</a>	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, reference assembly	<a href="#">224</a>	224	65%	4e-56	89%

Figure 26 : Résultat du blast de la séquence nucléotidique amplifiée par les amorces choisies pour sY83.

Le mélange 7 (Photo 4) permet de mettre en évidence les 2 bandes attendues chez les hommes témoins et l'absence de bandes chez une femme (sY157 - 286 pb - sY158 - 231 pb).

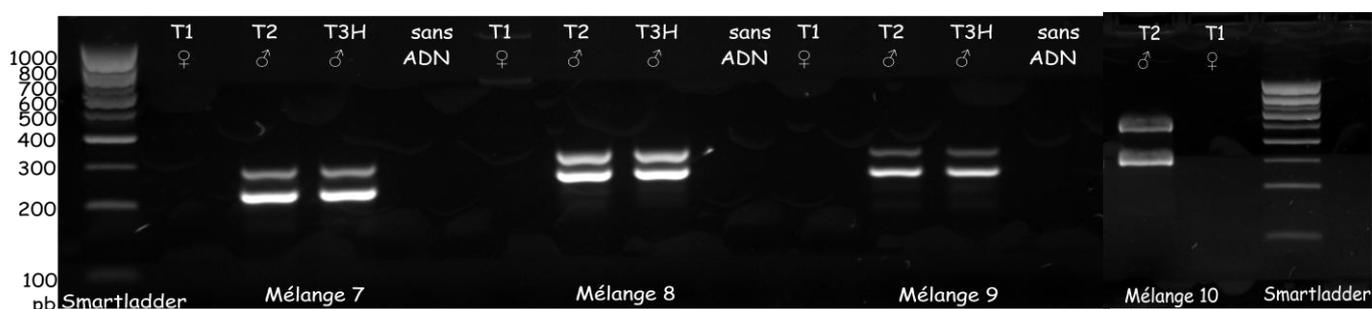


Photo 4 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 7 à 10 chez des témoins, après extraction de l'ADN à partir de sang, lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

De même, nous observons chez les hommes, avec le mélange 8, les 2 bandes attendues correspondant aux sY143 (311 pb) et sY117 (262 pb). Le mélange 9 nous permet de valider également les couples d'amorces utilisés pour amplifier les STS sY1015 (304 pb) et sY87 (252 pb).

Enfin, le mélange 10 est également opérationnel, nous visualisons sans difficulté sY1197 (453 pb) et sY1125 (283 pb) chez le témoin masculin et aucune bande n'est présente chez le témoin féminin.

D'autre part, chez le témoin T2, nous avons réalisé une amplification, à l'aide des mélanges 1 et 2, de l'ADN extrait à partir de cellules buccales et à partir de sang. Les profils de migration électrophorétique sont identiques quelque soit l'origine des cellules utilisées (Photo 5).

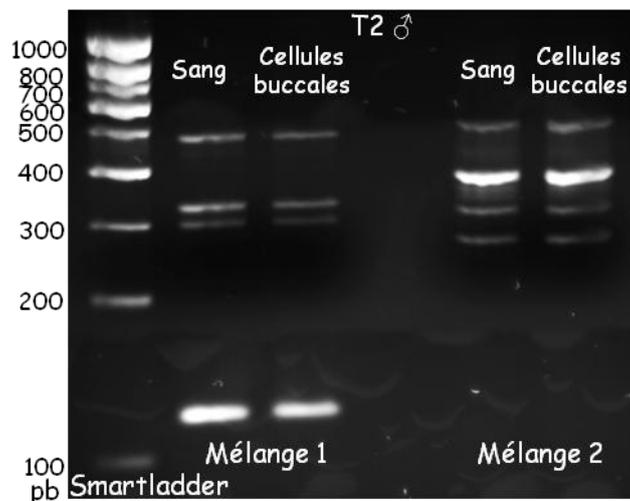


Photo 5 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez un témoin, après extraction de l'ADN à partir de sang et de cellules buccales, lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

#### 4- Validation de la technique sur patients

La technique a été validée en aveugle sur l'ADN de 4 patients porteurs de microdélétion(s) du chromosome Y (P1, P2, P3 et P4). La photo 6 montre les résultats pour les mélanges 1 et 2 des 4 patients. Les bandes correspondant aux STS sY255 et sY254 sont absentes pour le patient P1 porteur d'une microdélétion de AZFc. Pour le patient P2, sY134 et sY127 sont absents. Ce patient a une microdélétion de la région AZFb. Le patient P3 n'a pas les bandes correspondant aux sY134, sY255, sY254 et sY127, il a une microdélétion de AZFb et AZFc. Enfin le patient P4 a une microdélétion de AZFa (absence de sY84 et sY86).

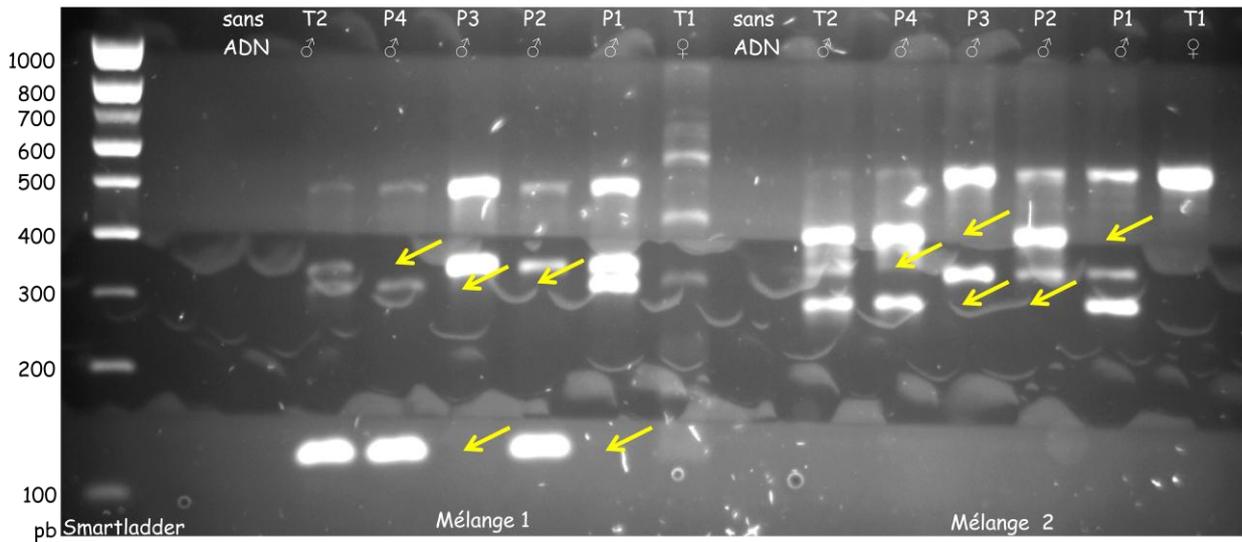


Photo 6 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez des patients et des témoins lors de la recherche de microdélétions dans AZF (  : bande manquante).

Etant donné les résultats obtenus pour ces 4 patients, nous avons réalisé une deuxième PCR avec d'autres couples d'amorces afin de confirmer les microdélétions décelées par les mélanges 1 et 2 et de préciser si elles sont complètes ou partielles.

Comme P1 a une microdélétion de AZFc à l'issue des mélanges 1 et 2, nous avons testé en plus les mélanges 4, 6, 7 et 10 (Photo 7).

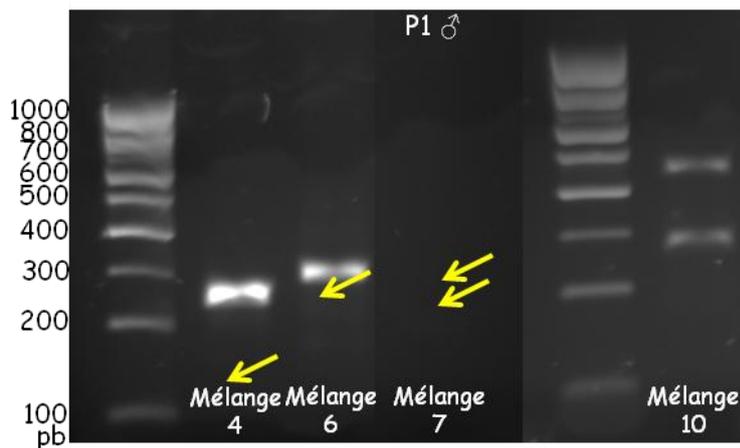


Photo 7 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 4, 6, 7 et 10 chez un patient lors de la recherche de microdélétions dans AZF (  : bande manquante).

Nous voyons qu'il manque les bandes correspondant aux STS sY152, sY1992, sY157 et sY158. Cela confirme la microdélétion du locus AZFc. C'est également le résultat donné par le Dr Aknin.

Le patient P2 a une microdélétion de AZFb à l'issue des mélanges 1 et 2, nous avons donc testé en plus les mélanges 3, 5, 8, 9 et 10 (Photo 8).

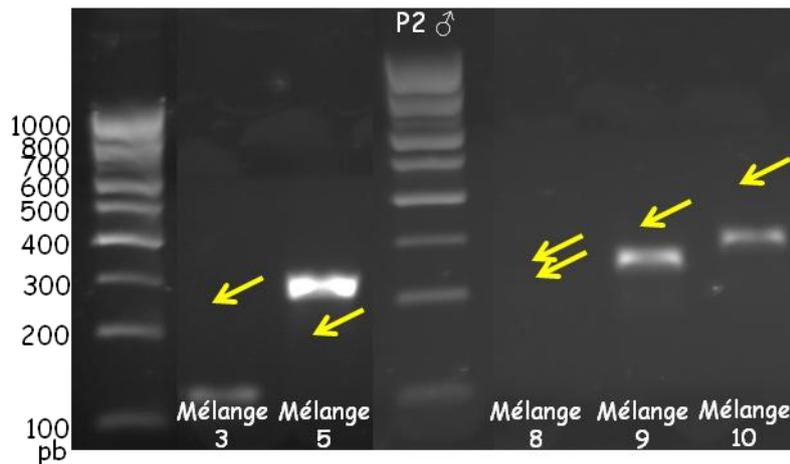


Photo 8 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 3, 5 et 8 à 10 chez un patient lors de la recherche de microdélétions dans AZF (→ : bande manquante).

Nous voyons qu'il manque les bandes correspondant aux STS sY135, sY142, sY143, sY117, sY1015 et sY1197. Cela confirme la microdélétion du locus AZFb. Nos résultats concordent avec ceux donnés par le Dr Aknin.

Le patient P3 a une microdélétion de AZFb et AZFc à l'issue des mélanges 1 et 2, nous avons donc testé en plus les mélanges 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 (Photo 9).

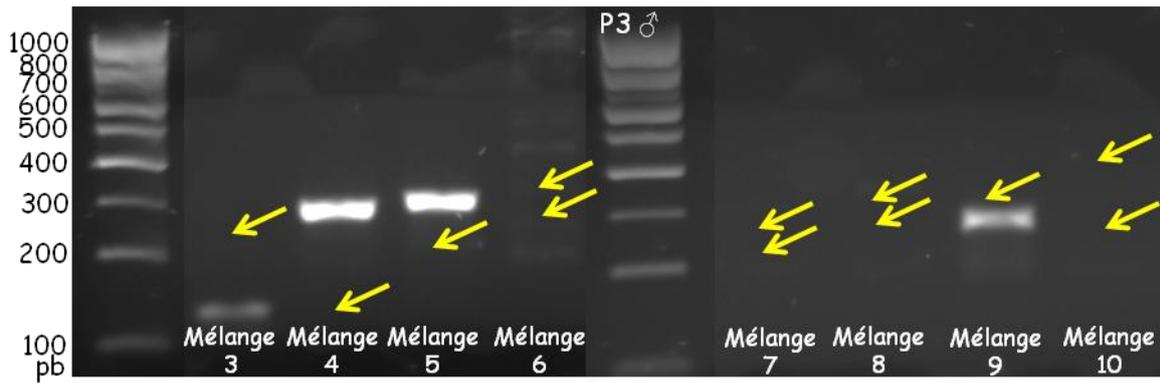


Photo 9 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 3 à 10 chez un patient lors de la recherche de microdélétions dans AZF (→ : bande manquante).

Les bandes correspondant aux STS sY135, sY152, sY142, sY95, sY1192, sY157, sY158, sY143, sY117, sY1015, sY1197 et sY1125 sont manquantes. Cela confirme les microdélétions des loci AZFb et AZFc, anomalies également mises en évidence par le Dr Aknin.

Le patient P4 a une microdélétion de AZFa à l'issue des mélanges 1 et 2, nous avons donc testé en plus les mélanges 3, 4, 5, 6 et 9 (Photo 10).

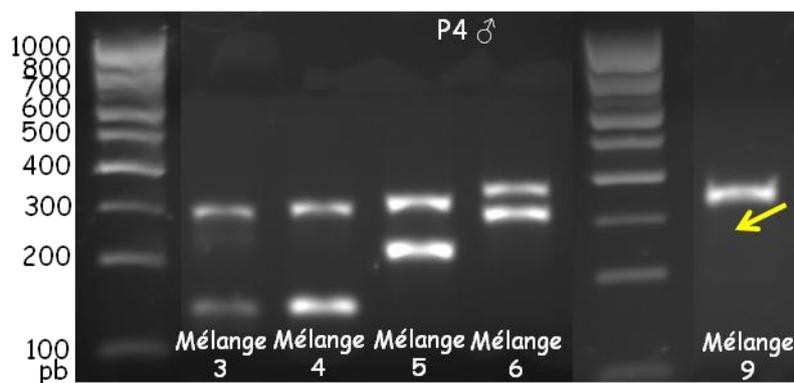


Photo 10 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 3 à 6 et 9 chez un patient lors de la recherche de microdélétions dans AZF (→ : bande manquante).

Il manque la bande correspondant au STS sY87. Cela confirme la microdélétion du locus AZFa comme observé par le Dr Aknin.

Après avoir validé la technique de recherche de microdélétions du chromosome Y chez des patients pour lesquels une microdélétion avait été préalablement identifiée, nous avons fait cette recherche sur 4 patients (P5, P6, P7 et P8) présentant des troubles de la fertilité et une faible numération spermatique. La numération a toujours été évaluée à partir de deux éjaculats ayant au moins 3 mois d'écart. Pour les deux éjaculats, les patients P5 et P6 avaient une azoospermie, P7 avait une concentration en spermatozoïdes de 1,02 et 6,3 millions/mL et P8 de 2,6 et 3 millions/mL.

Les résultats de la migration électrophorétique du patient P5 (Photo 11), du patient P6 (Photo 12) et du patient P7 (Photo 13) permettent d'assurer qu'il n'y a aucune microdélétion après l'utilisation des mélanges 1 et 2, dans les limites de la technique.

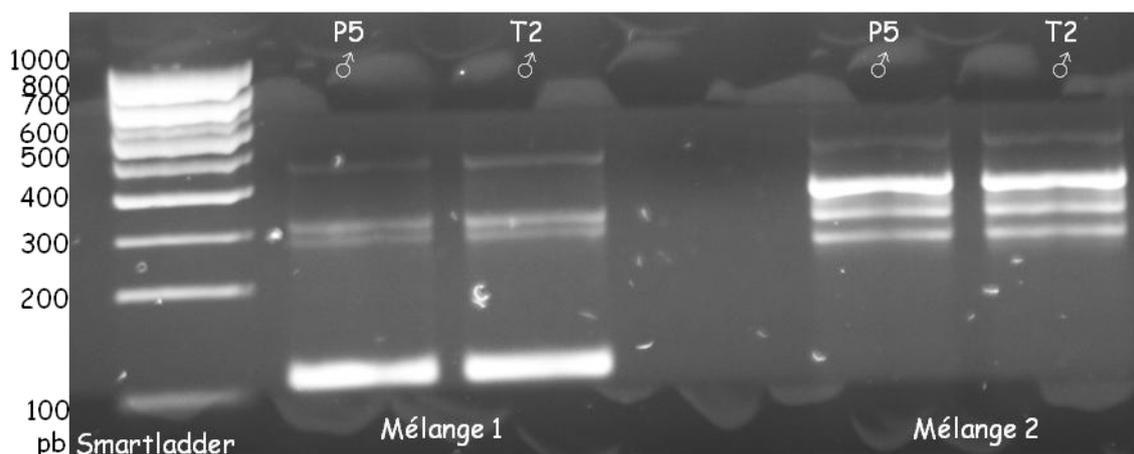


Photo 11 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez un patient et un témoin, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P5) ou de sang (T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

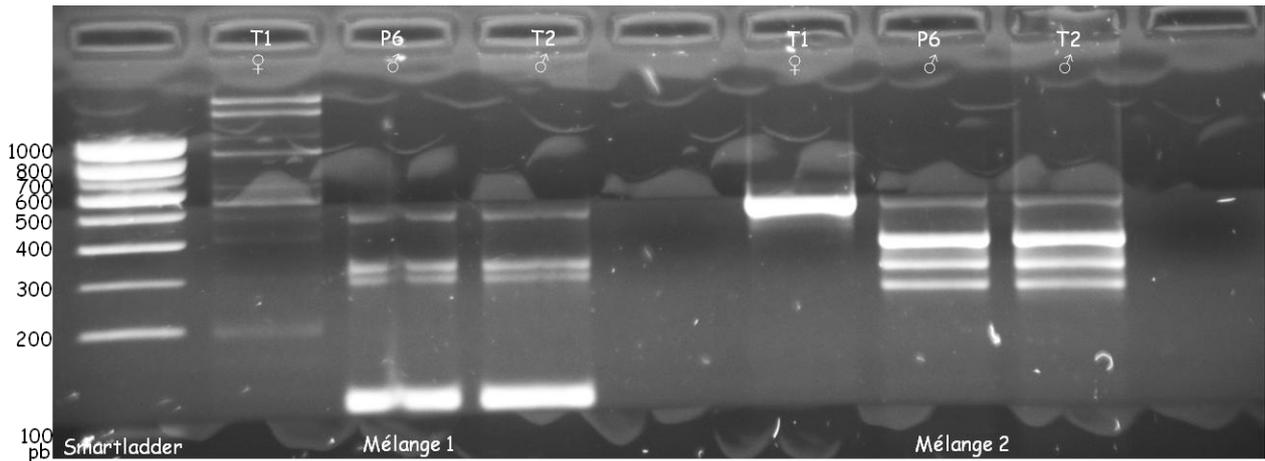


Photo 12 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez un patient et deux témoins, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P6) ou de sang (T1 et T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

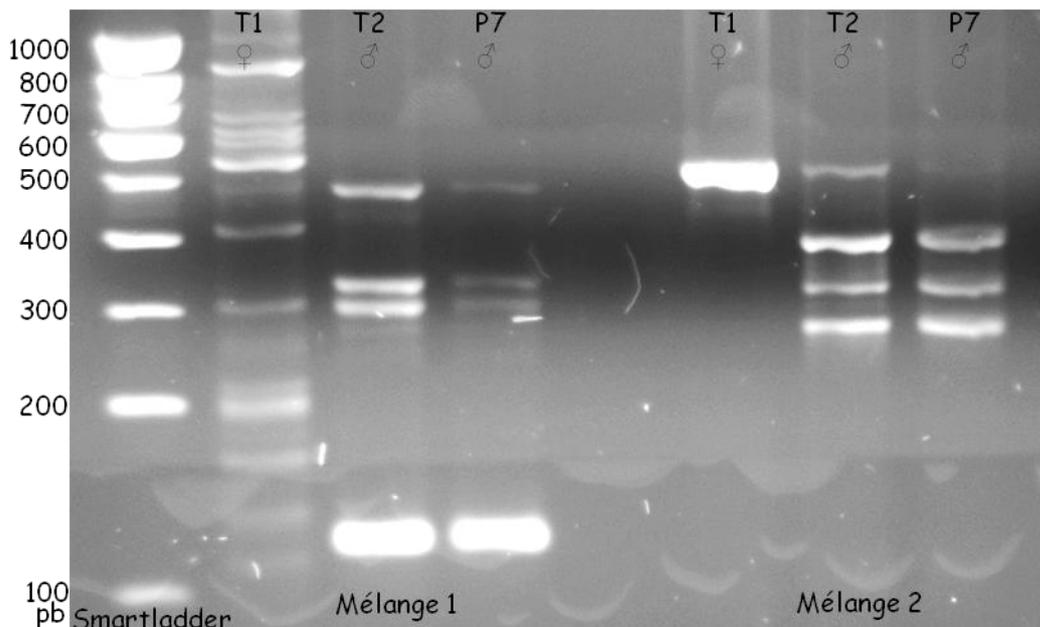


Photo 13 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez un patient et deux témoins, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P7) ou de sang (T1 et T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF.

Les résultats de la migration électrophorétique du patient P8 (Photo 14) mettent en évidence l'absence des STS sY254 et sY255 à l'issue de l'utilisation des mélanges 1 et 2. Ces STS étant localisés au niveau de AZFc, nous avons alors utilisé des amorces

supplémentaires spécifiques de ce locus à savoir les mélanges 4, 6 (Photo 15) et 7 et 10 (Photo 16).

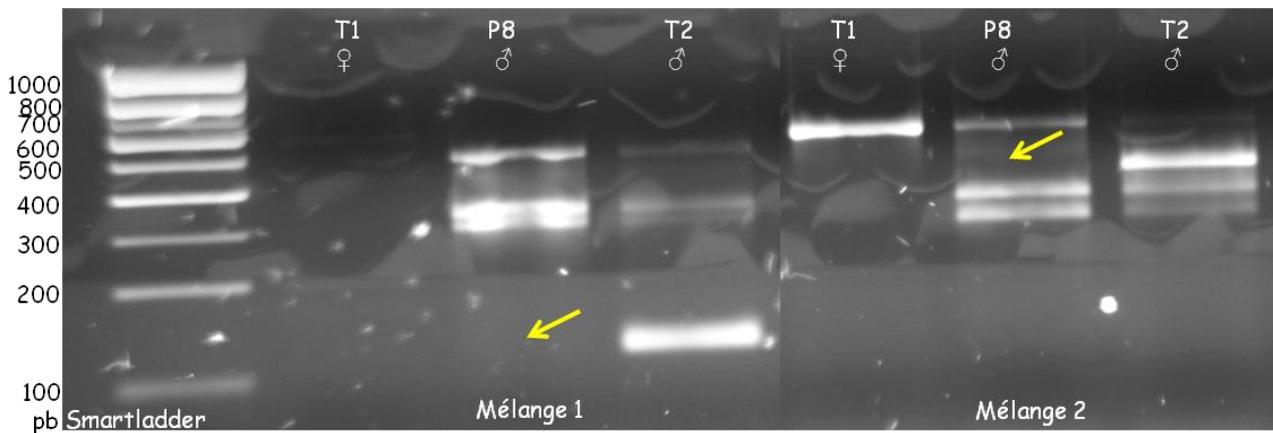


Photo 14 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 1 et 2 chez un patient et deux témoins, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P8) ou de sang (T1 et T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF (➡ : bande manquante).

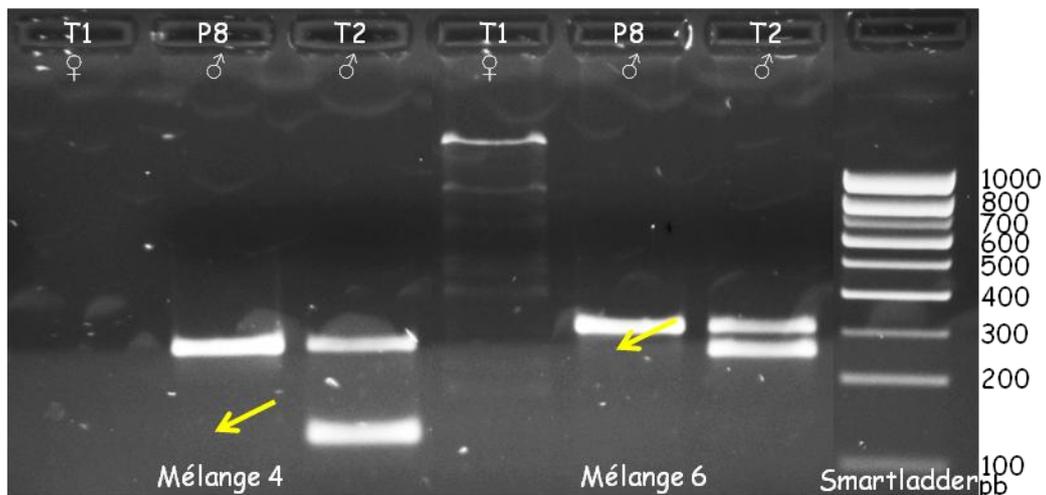


Photo 15 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 4 et 6 chez un patient et deux témoins, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P8) ou de sang (T1 et T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF (➡ : bande manquante).

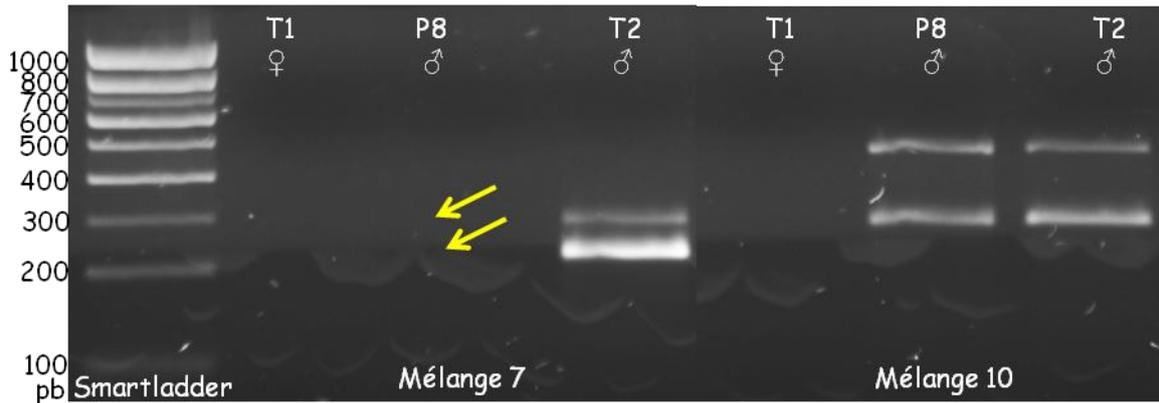


Photo 16 : Profils de migration électrophorétique des amplicons obtenus avec les mélanges 7 et 10 chez un patient et deux témoins, après extraction de l'ADN à partir cellules buccales (P8) ou de sang (T1 et T2), lors de la recherche de microdélétions dans AZF (→ : bande manquante).

Pour le patient 8, il manque en plus les STS *sY152*, *sY1192*, *sY157*, *sY158*. Ce patient a donc une microdélétion du locus AZFc.

### III.B- Mutation du chromosome 19

Travaillant en collaboration avec le laboratoire Labomac de Casablanca, nous avons reçu des lames de spermatozoïdes fixés par du Carnoy de patients ayant une sévère tératozoospermie. Nous avons également reçu du sang sur héparine-lithium pour deux de ces patients (P9 et P10). La réception de ces envois se fait 2 à 3 semaines après le prélèvement, temps pendant lequel les échantillons restent à température ambiante. Ainsi, nous avons voulu mettre au point une technique de recherche de mutations du gène *AURKc* et savoir si les échantillons de sang qui nous sont envoyés dans ces conditions sont exploitables.

La mise au point a été effectuée chez une femme témoin (T1) dont le sang vient d'être prélevé et chez les deux patients P9 et P10.

#### 1- Extraction de l'ADN à partir de sang

L'extraction a été réalisée comme indiqué dans la partie précédente sur les microdélétions du chromosome Y, selon les recommandations données avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN).

La concentration en ADN obtenu après l'extraction était au mieux de 171 ng/ $\mu$ L (volume final de 200  $\mu$ L) pour T1, 17,5 ng/ $\mu$ L (volume final de 200  $\mu$ L) pour P9 et 70 ng/ $\mu$ L (volume final de 200  $\mu$ L) pour P10. Au total, pour T1, la quantité récupérée a été de 41,68  $\mu$ g, pour P9 de 13,5  $\mu$ g et enfin pour P10 de 36,1  $\mu$ g.

## 2- PCR

Le gène *AURKc* étant constitué de 7 exons, nous avons pris 7 couples d'amorces (Eurogentec®) (Dieterich *et al.*, 2007) (Tableau 11).

Exons	Séquences d'amorces sens	Séquences d'amorces antisens
1	GTCCTTTCTATTGGGCGCACTTC	GTGTCTTCTGTGCACCCGACC
2	CCCTCACCTCTCGCTCCCTATT	CCCAGCCCTATCAGTAGTTCTCGTT
3	GACTTTCCCTCCGCCTACCCTAC	GCTGGGCTCAGACGTCAAAGA
4	GGCCTCAGGGAGAAATCTGAC	CCCACCAGCCCACAGTAAACT
5	AAATTGTGGCAGGCTTCACT	GGGTCATTCCCTAACTGGTACTCAG
6	TCATCCTGGGCTCTGCTTAGT	TGAATGCCCAAAGGTGACTGTC
7	TTCTTCTTTCTGGCCTCATC	CCCACAAGAAATAAAGATTCTACCC

Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les 7 exons du gène *AURKc*.

Les conditions retenues pour préparer les mélanges de PCR sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

	Conditions pour chaque couple d'amorces en dehors de l'exon 4	Conditions pour le couple d'amorces de l'exon 4
	Volume/tube 25 $\mu$ L	Volume/tube 25 $\mu$ L
Eau distillée ( $\mu$ L)	25-(5,63 + vol ADN)	25-(6,13 + vol ADN)
Tampon 10X (QIAGEN) ( $\mu$ L)	2,5	2,5
dNTP (10 mM) ( $\mu$ L) (Invitrogen)	0,5	0,5
Mg 25 mM ( $\mu$ L) (QIAGEN)	0	0,5
Amorce sens 10 $\mu$ M ( $\mu$ L)	1,25	1,25
Amorce antisens 10 $\mu$ M ( $\mu$ L)	1,25	1,25
Hotstart 5u/ $\mu$ L ( $\mu$ L) (QIAGEN)	0,13	0,13
ADN ( $\mu$ L)	Volume pour 62,5 ng	Volume pour 62,5 ng

Tableau 12 : Conditions de PCR pour l'amplification des exons du gène *AURKc*.

Les conditions retenues pour les cycles de PCR (T3000 Thermocycler, Biometra) sont indiquées dans le tableau 13.

Température (°C)	Etape	Durée	Nombre de cycles
95	Activation Taq	10 min	
94	Dénaturation	30 sec	45
60	Hybridation	1 min	
72	Elongation	1 min	
72	Extension finale	10 min	

Tableau 13 : Programmes des cycles de PCR utilisés pour l'amplification des exons du gène *AURKc*.

La migration des produits de PCR s'est faite comme indiquée précédemment pour les études des microdélétions du chromosome Y.

Après avoir contrôlé la présence des bandes attendues pour chaque exon, un séquençage a été réalisé sur les reliquats des produits de PCR.

### 3- Séquençage

Le principe de cette technique consiste à déterminer l'ordre des nucléotides constituant l'ADN afin de détecter la présence éventuelle de mutations. Le séquençage selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce (oligonucléotides) complémentaire de la région d'ADN d'intérêt. L'élongation de l'amorce est réalisée à l'aide d'une ADN polymérase. Les 4 désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP : dATP, dCTP, dGTP et dTTP) sont ajoutés ainsi que des didésoxynucléotides triphosphate (ddNTP : ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) (dans une moindre proportion) couplés à 4 fluorochromes différents. L'ADN polymérase a la capacité d'ajouter des désoxyribonucléotides (sens 5'-3') les uns à la suite des autres par le groupement OH libre en position 3' dont est porteur chaque dNTP. Les ddNTP, quant à eux, n'ont pas de groupement OH en position 3' (seulement un H). Ainsi, lorsque de façon aléatoire un ddNTP est incorporé par l'ADN polymérase, il

n'est alors plus possible d'ajouter le moindre nucléotide : la synthèse du brin d'ADN s'arrête. Les ddNTP sont des terminateurs de chaîne. A la fin de la réaction, un ensemble de brins d'ADN de tailles variées est obtenu (Figure 27).

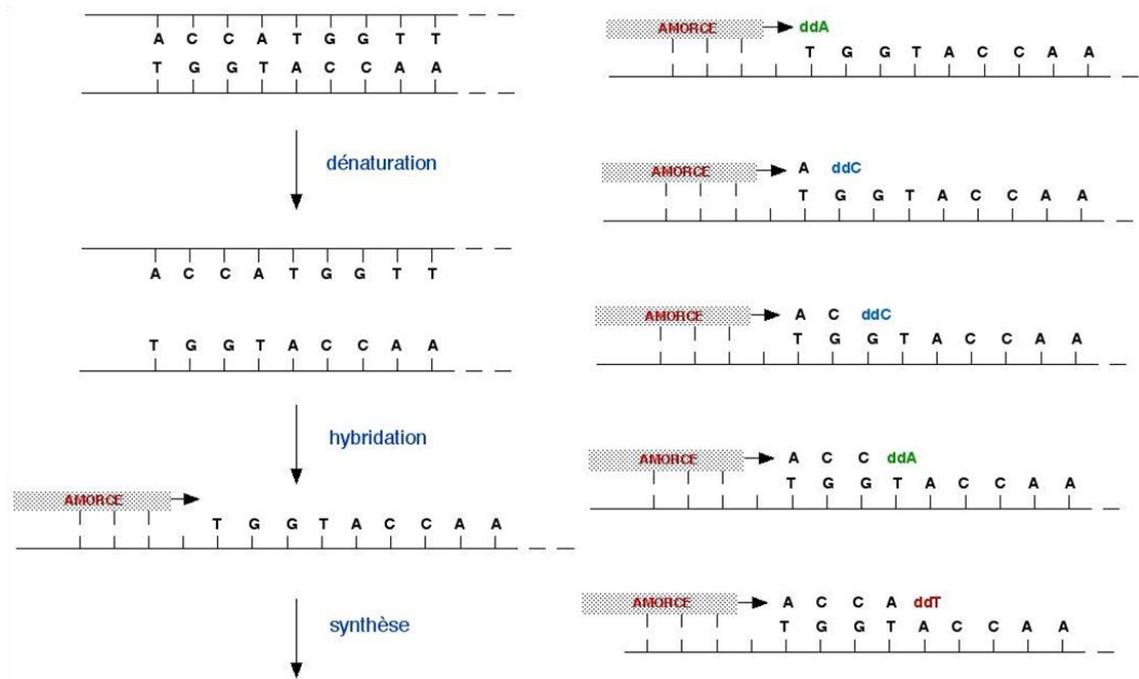


Figure. 27 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger<sup>9</sup>.

L'analyseur de séquence permet ensuite de différencier les fluorochromes et d'associer les bases correspondantes.

Le séquençage est réalisé à l'aide du kit ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster city, CA). Pour chaque amorce, les réactions de séquençage s'opèrent comme indiqué dans le tableau 14.

Réactifs (concentration)	Volume (µL)
Ready reaction premix (2,5X)	1
BigDye sequencing buffer (5X)	2
Amorces (10 µM)	1
Eau distillée	4
Produits de PCR	2

Tableau 14 : Réactions de séquençage des 7 exons du gène *AURKc*

<sup>9</sup>: <http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html>

Le "Ready reaction premix" contient l'enzyme, les dNTP et les ddNTP.

Le programme utilisé pour la réaction de séquençage est indiqué dans le tableau 15.

Température (°C)	Etape	Durée	Nombre de cycles
95	Activation Taq	2 min	25
95	Dénaturation	10 sec	
50	Hybridation	5 s	
60	Elongation	4 min	

Tableau 15 : Programme utilisé pour la réaction de séquençage des exons du gène *AURKc*.

Les produits de séquençage ainsi obtenus sont purifiés avant d'être séquencés. La purification est réalisée sur des colonnes de Sephadex à l'aide du kit illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Allemagne).

Les billes de Séphadex présentes dans chaque colonne sont remises en suspension par vortex. Après une centrifugation de 5 minutes à 2 000 g, l'eau est éliminée et la colonne de Sephadex est prête à l'emploi. Cette colonne agit comme une chromatographie à exclusion en éliminant les dNTP et les ddNTP en excès. La totalité du produit de séquençage (10  $\mu$ L) est déposée sur la colonne puis la centrifugation est réalisée. L'éluat récupéré peut ensuite être étudié par l'analyseur de séquences.

L'analyseur de séquences 3130x/ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) et le logiciel de pilotage 3130x/ Genetic Analyzer Data Collection Software 3.0 sont utilisés pour analyser le gène *AURKc* du témoin et des deux patients. Les électrophorégrammes sont visualisés grâce au logiciel Sequencing Analysis Software 5.2 (Applied Biosystems) et interprétés à l'aide de Mutation Surveyor v.2.61 (Softgenetics, LLC, State college, PA).

#### 4- Validation de la technique sur un témoin

L'analyse, après migration électrophorétique des produits de PCR, révèle toutes les bandes et aux tailles attendues (Photo 17 et Tableau 16).

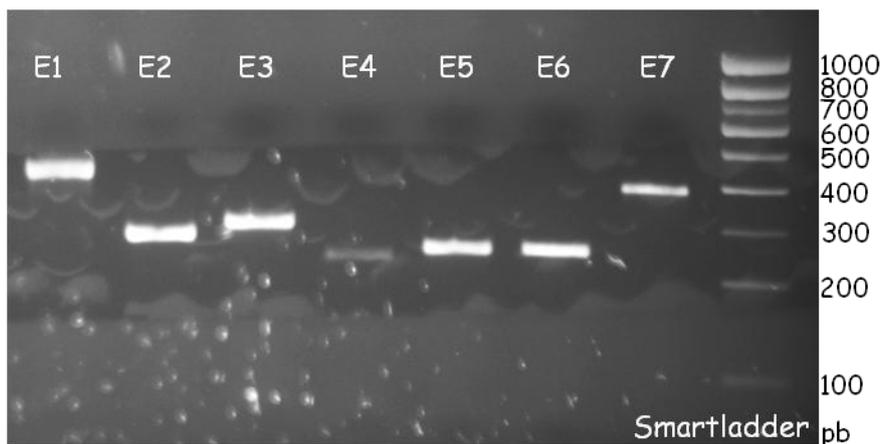


Photo 17 : Profils de migration électrophorétique des amplicons des exons 1 à 7 du gène *AURKc* chez le témoin T1.

Exons	Taille des bandes attendues (pb)
E1	433
E2	277
E3	301
E4	237
E5	252
E6	251
E7	383

Tableau 16 : Taille des bandes attendues après amplification des exons 1 à 7 du gène *AURKc*.

Nous voyons cependant que l'intensité de la bande correspondant à l'amplification de l'exon 4 (E4) est plus faible. Nous avons donc ajouté du  $Mg^{2+}$  dans le mélange pour amplifier l'exon 4, après avoir réalisé un gradient de magnésium (photo 18).

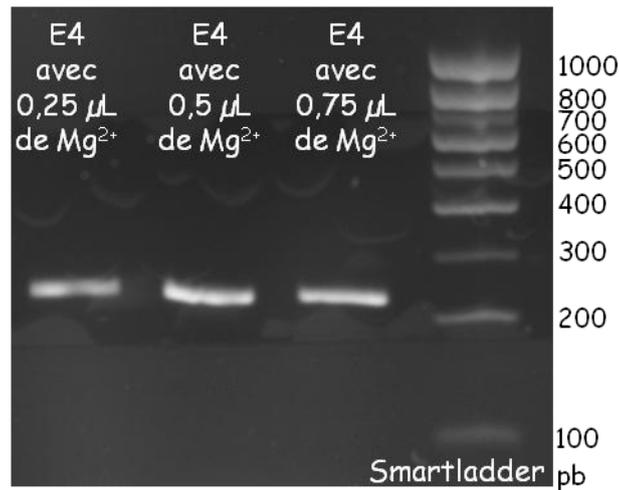


Photo 18 : Résultats de la migration électrophorétique de l'amplicon de l'exon 4 avec ajout de magnésium chez T1.

La concentration retenue est 0,5 µL de Mg<sup>2+</sup> pour l'amplification de l'exon 4 du gène *AURKc*.

La figure 28 montre un électrophorégramme obtenu pour l'exon 3 du gène *AURKc* de T1. C'est dans cet exon, en position 144, que la perte d'une cytosine a été mise en évidence chez des patients avec des gamètes macrocéphales et multiflagellés.

Le séquençage effectué sur T1 ne révèle aucune mutation dans le gène *AURKc* : la cytosine en position 144 est bien présente.

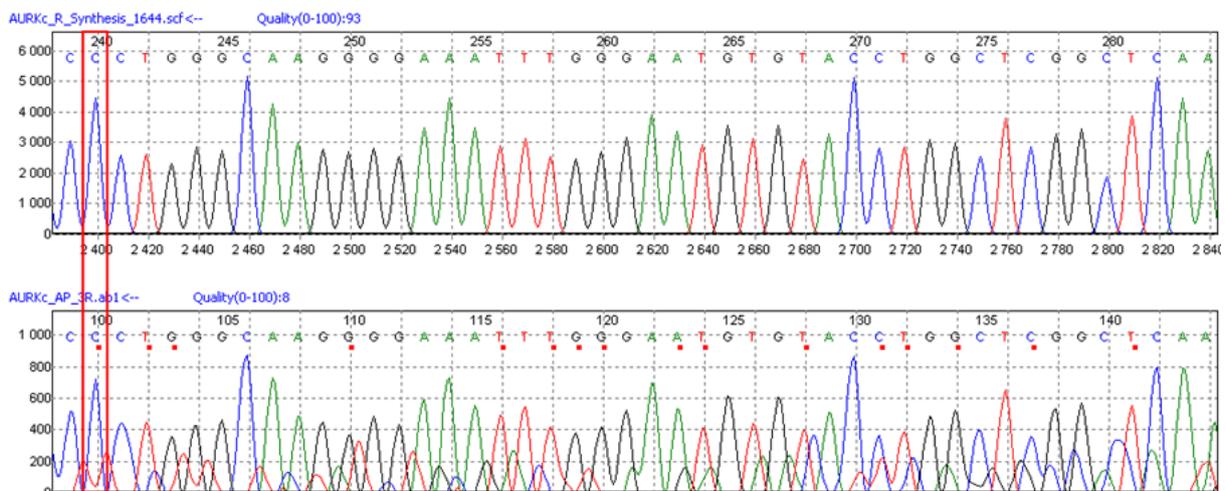


Figure 28 : Electrophorégrammes d'une partie de l'exon 3 du gène *AURKc* chez T1 (en haut) et de la séquence de référence (en bas). Le rectangle rouge cible la cytosine en position 144.

## 5- Validation de la technique sur deux patients

L'analyse des bandes après migration électrophorétique des produits de PCR indique que toutes celles attendues sont présentes chez les deux patients P9 et P10 (Photo 19).

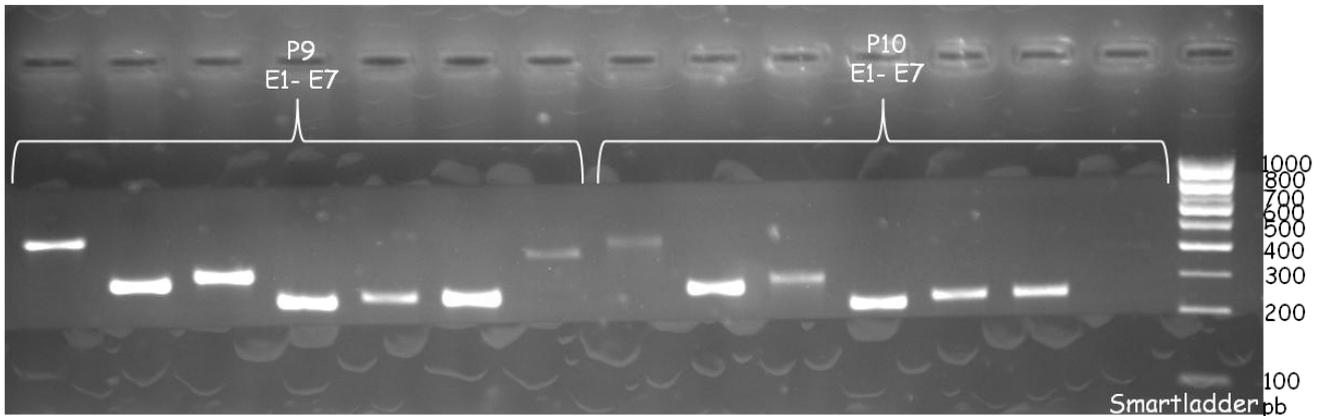


Photo 19 : Profils de migration électrophorétique des amplicons des exons 1 à 7 du gène *AURKc* chez les patients P9 et P10.

Cependant, l'amplification correspondant à l'exon 1 était faible pour le patient P10, celle correspondant à l'exon 7 était faible pour le patient P9 et très faible pour le patient P10, elles ont donc été renouvelées (photo 20) afin de réaliser un meilleur séquençage.

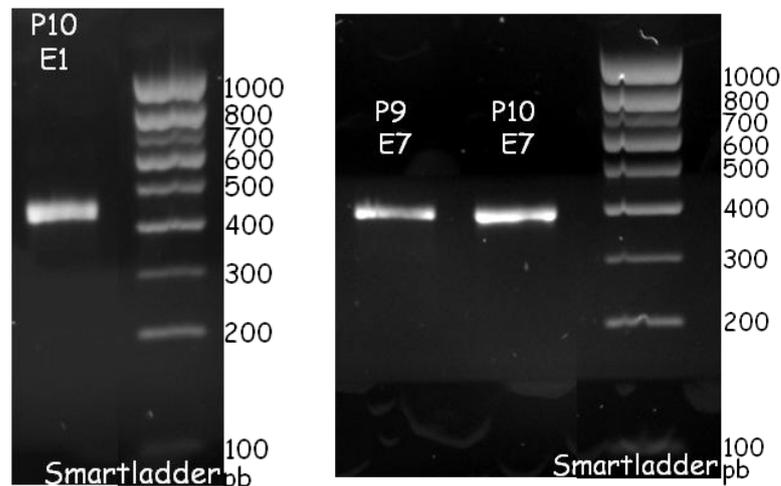


Photo 20 : Profils de migration électrophorétique des amplicons de l'exon 1 de P10 et de l'exon 7 de P9 et P10 du gène *AURKc*.

Les figures 29 et 30 montrent une partie de l'électrophorégramme obtenu pour l'exon 3 du gène *AURKc* de P9 et P10. Le séquençage effectué sur P9 et P10 ne met pas en

évidence de mutation dans le gène *AURKc*. La cytosine attendue en position 144 est présente chez les deux patients. Les patients P9 et P10 ont respectivement 92% et 100% de formes anormales mais ils n'ont pas de gamètes macrocéphales et multiflagellés.

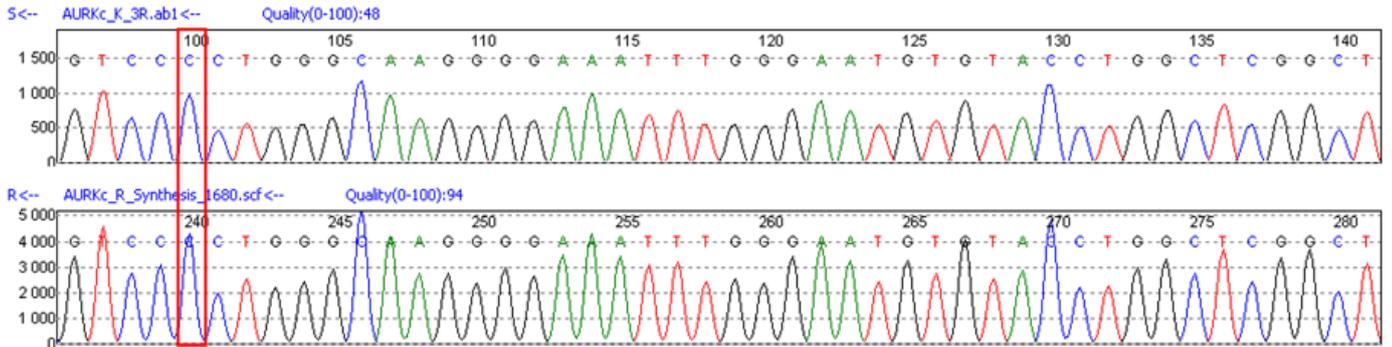


Figure 29 : Electrophorégrammes d'une partie de l'exon 3 du gène *AURKc* de P9 (en haut) et de la séquence de référence (en bas). Le rectangle rouge cible la cytosine en position 144.

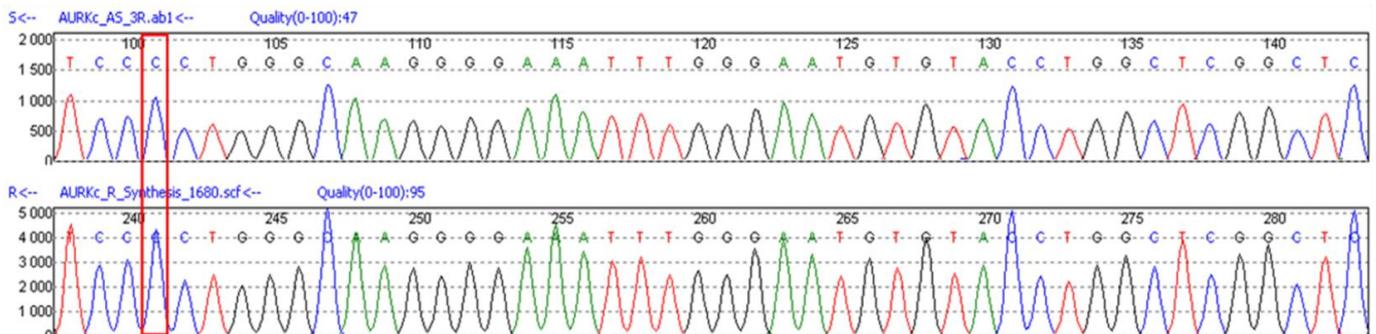


Figure 30 : Electrophorégrammes d'une partie de l'exon 3 du gène *AURKc* de P10 (en haut) et de la séquence de référence (en bas). Le rectangle rouge cible la cytosine en position 144.

Au travers de ces analyses, nous avons, de plus, constaté qu'il était possible de réaliser une extraction d'ADN à partir d'échantillons sanguins restés à température ambiante pendant un long délai d'acheminement (environ 3 semaines). Cet ADN extrait est de qualité suffisante pour pouvoir être amplifié et séquencé.

## IV- ADN spermatique

### IV.A- Fragmentation de l'ADN spermatique

#### 1- Technique TUNEL

Nous avons mis au point l'analyse du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par la technique TUNEL. Lorsque l'ADN des gamètes est fragmenté, des extrémités 3'-OH sont libérées. Le principe de la technique TUNEL (Figure 31) est d'utiliser une enzyme, la Terminal deoxynucleotidyl Transférase (TdT), capable d'ajouter des nucléotides à ces extrémités 3'-OH d'ADN libres. Les nucléotides sont couplés à de la digoxigénine. Nous ajoutons des anticorps, couplés à un fluorochrome, dirigés contre la digoxigénine. Le fluorochrome utilisé est la rhodamine (fluorescence rouge). Une contre-coloration de l'ADN avec du DAPI (fluorescence bleue) permet de visualiser l'ADN des gamètes.

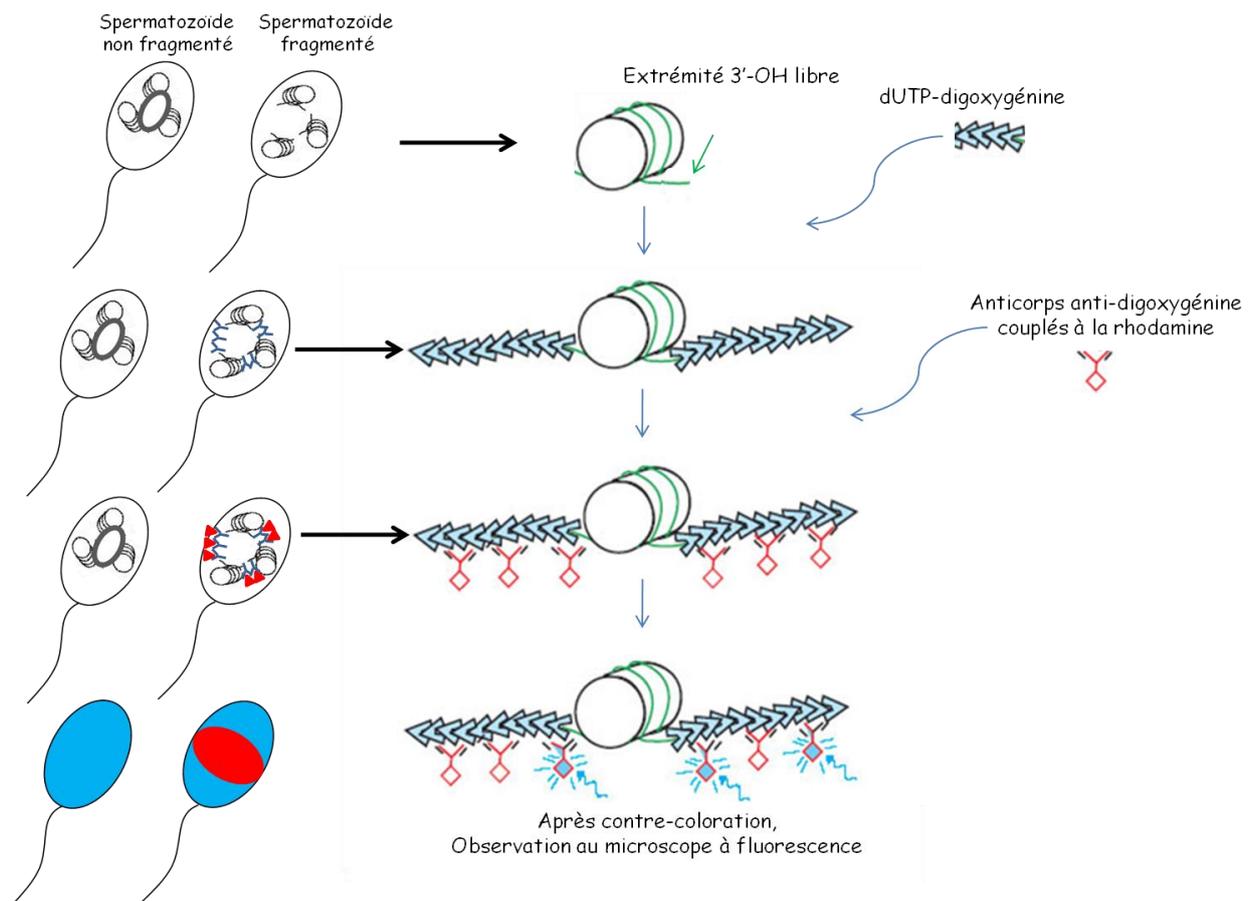


Figure 31 : Principe de la technique TUNEL.

Dès réception, le prélèvement est lavé et les spermatozoïdes sont étalés sur lame et fixés par du Carnoy. Les membranes des gamètes sont ensuite perméabilisées grâce à un bain de SSC 2x / 0,4% NP40 pendant 30 minutes à 37°C. Les lames sont enfin plongées dans des bains d'éthanol de degré croissant (70°, 90°, 100°).

La fragmentation de l'ADN spermatique est détectée par le kit ApopTag Red (MP Biomedicals, Illkirch, France). Sur chaque lame, 50 µL de tampon de stabilisation sont déposés pendant 30 secondes à température ambiante. Cette étape permet d'équilibrer le pH et d'hydrater la préparation. Puis, 45 µL du mélange 1 sont ajoutés. Les lames sont incubées dans le noir, dans une chambre humide à 37°C pendant une heure. Cette étape permet l'incorporation de nucléotides dont certains sont couplés à de la digoxygénine. Les lames sont ensuite agitées pendant 15 secondes dans un tampon de lavage puis incubées pendant 10 min dans ce même bain, à température ambiante. Cette étape enlève l'excès de nucléotides et d'enzyme afin d'arrêter la réaction. Les lames sont ensuite lavées par deux bains de PBS 1X pendant 1 min 30. La révélation est faite par ajout de 43 µL d'un mélange constitué d'anticorps anti-digoxygénine couplés à de la rhodamine. Une incubation en chambre noire est réalisée pendant 30 min à 37°C. Les lames sont lavées dans deux bains de PBS 1X de 4 minutes. L'ADN est enfin contre-coloré par du DAPI.

Les lames sont ensuite analysées avec un microscope Zeiss AxioPlan (Zeiss). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD et du logiciel Isis (MetaSystems). Seuls les spermatozoïdes ayant un flagelle sont comptabilisés. Si cela a été possible, 500 spermatozoïdes ont été analysés pour chaque patient. Nous considérons un spermatozoïde comme non fragmenté si seule une fluorescence bleue est visible, ou comme fragmenté si une fluorescence rouge partielle ou totale est émise.

## 2- Etablissement d'un groupe témoin et validation de la technique

Nous avons analysé la fragmentation de l'ADN spermatique chez 24 hommes fertiles dont le caryotype et les paramètres spermatiques sont normaux. Le taux de fragmentation de notre groupe témoin est compris entre 0 et 3,6%.

De plus, les témoins et les patients ont été analysés en aveugle par 2 personnes différentes. Les résultats obtenus sont similaires.

#### IV.B- Stratégie employée pour l'étude de la fragmentation spermatique et de l'équipement chromosomique des gamètes

Nous avons décidé d'étudier la fragmentation de l'ADN spermatique et les déséquilibres chromosomiques au sein des mêmes gamètes et donc sur une même lame de spermatozoïdes. Nous avons voulu savoir si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont plus fragmentés que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré.

La stratégie mise en place pour cette étude est décrite par la figure 32.

Après avoir étalé les spermatozoïdes (a) et les avoir fixés par du Carnoy, nous réalisons la technique TUNEL (b) sur le frottis.

Nous établissons ensuite une galerie de photos (c) des gamètes présents sur la lame grâce au logiciel Metafer qui a la capacité d'enregistrer les coordonnées X,Y,Z (abscisse, ordonnée, profondeur) dans le repère cartésien tridimensionnel.

Nous analysons au microscope les gamètes un par un et nous notifions sur chaque photo si le gamète est fragmenté (d).

Une fois que la lame est analysée, nous devons éliminer la rhodamine (e) afin de pouvoir réaliser une technique de FISH sur la même lame.

Cette élimination de la rhodamine a nécessité une mise au point. Les conditions retenues sont les suivantes :

- 1) nous refixons les gamètes par du Carnoy pendant 1 heure,
- 2) la lame est lavée pendant 30 min dans du PBS 1X,
- 3) puis elle est plongée dans un bain de SSC 2X pendant 30 min,
- 4) nous éliminons la rhodamine par un bain de 20 min dans du SSC 0,4X/0,3% NP40 à 72°C,

5) la lame est lavée dans un bain de 5 min dans du SSC 2X/0,1% NP40 à température ambiante,

6) les têtes spermatiques sont décondensées par un bain de NaOH 1N pendant 1 min,

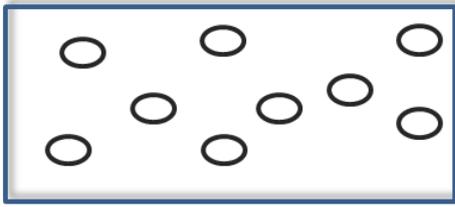
7) le frottis est lavé par du SSC 2X pH 7,2 pendant 10 min,

8) les cellules sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool successifs de degrés croissants.

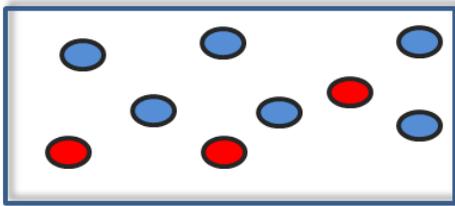
Nous réalisons ensuite la technique de FISH (f) comme décrite précédemment sans réaliser le bain correspondant à l'étape de perméabilisation membranaire qui ne s'avère plus nécessaire. Après avoir contre-coloré les noyaux, cette lame est à nouveau analysée au microscope à fluorescence. La galerie de photos correspondant à l'analyse TUNEL est reprise (g) afin de lier l'équipement chromosomique de chaque gamète à l'état de son ADN fragmenté ou non fragmenté (h).

1-

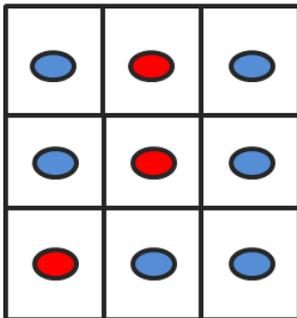
a Etallement des spermatozoïdes



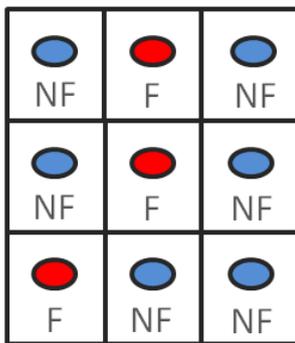
b Technique TUNEL



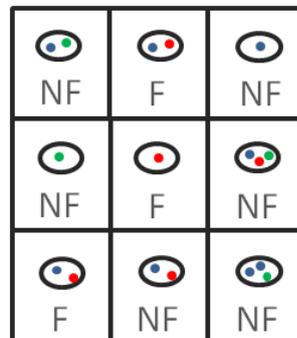
c Création d'une galerie de photos



d Analyse de chaque gamète afin de les étiqueter comme fragmenté (F) ou non (NF)

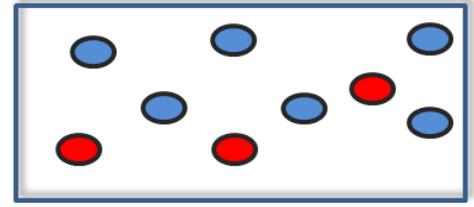


Analyse au microscope à fluorescence  
Reprise de la galerie créée

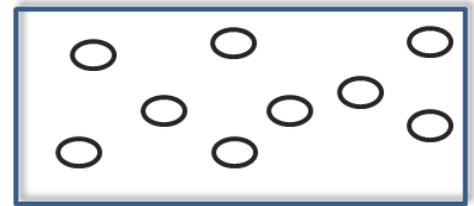


h Etude de la FISH dans chaque gamète préalablement repéré comme étant fragmenté ou non

2-



e Elimination de la rhodamine



f FISH 3 couleurs

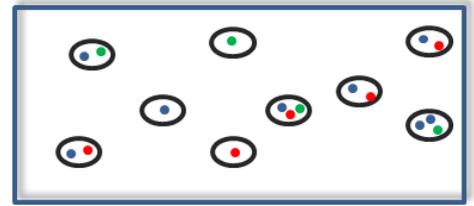


Figure 32 : Stratégie d'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique (1-) et dans un deuxième temps, du contenu chromosomique dans les mêmes gamètes (2-).



# TRAVAUX REALISES



---

## Chapitre de livre 1 : Chromosomal abnormalities in male infertility

M. De Braekeleer, A. Perrin, F. Morel.

Cytogenetics and Infertility. Dir : De Braekeleer, M. Transworld Research Network, Trivandrum (India). 2006, 27-52

---

Parmi les facteurs interférant avec la spermatogenèse, les anomalies chromosomiques constitutionnelles sont connues comme ayant un impact négatif. L'existence d'anomalies chromosomiques constitutionnelles chez les hommes infertiles a été suspectée dès 1957 par Ferguson-Smith et *al.* (Ferguson-Smith *et al.*, 1957).

Dans ce chapitre, notre travail a consisté à réaliser une méta-analyse des résultats publiés depuis plus d'une trentaine d'années sur l'étude des anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles.

Ainsi, sur 8952 patients infertiles, une anomalie chromosomique est présente chez 600 patients (6,7%). Dans cette population, 3,8% ont la formule chromosomique 47,XXY, 0,5% des patients ont une mosaïque 47,XXY/46,XY, 0,5% des patients ont une autre anomalie du nombre des gonosomes et 0,1% sont 46,XX. De plus, parmi cette population d'hommes infertiles, 0,5% des patients ont une anomalie de structure du chromosome Y, 0,6% ont une translocation robertsonienne, 0,3% ont une translocation réciproque, 0,1% ont une inversion et 0,2% un marqueur chromosomique surnuméraire (Figure 33).

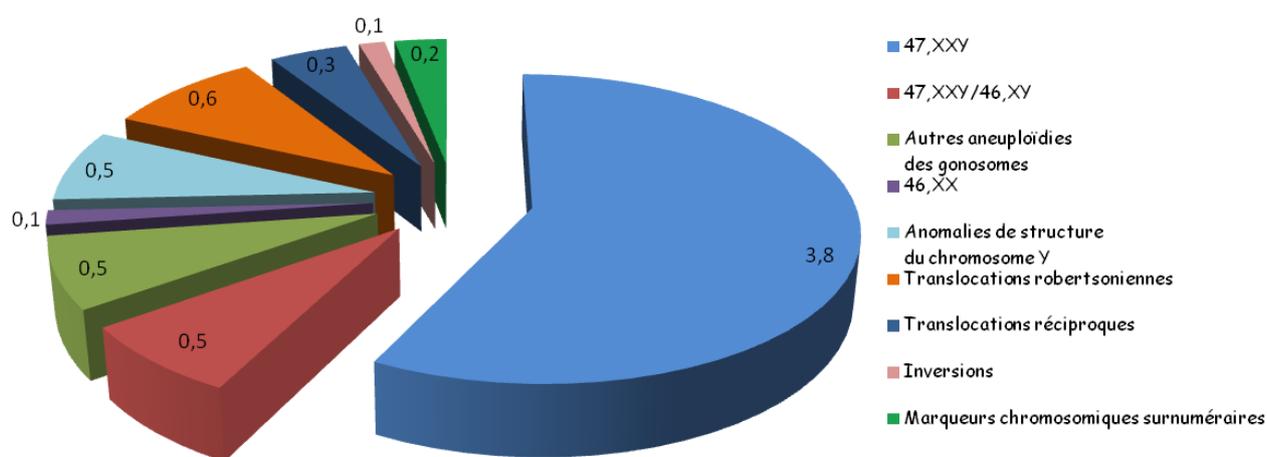


Figure 33 : Fréquences des anomalies chromosomiques rapportées chez 8952 patients infertiles (valeurs indiquées en pourcentage).

Dans la population d'hommes présentant une oligozoospermie, soit 3710 patients, 4,2% ont une anomalie chromosomique. La formule chromosomique 47,XXY est retrouvée chez 0,4% de ces patients, le caryotype 47,XXY en mosaïque (ou variants) dans 0,6% des cas. Une anomalie de structure du chromosome Y est décelée chez 0,3% des patients, 1,4% ont une translocation robertsonienne, 1% une translocation réciproque, 0,3% une inversion et 0,2% un marqueur chromosomique surnuméraire (Figure 34).

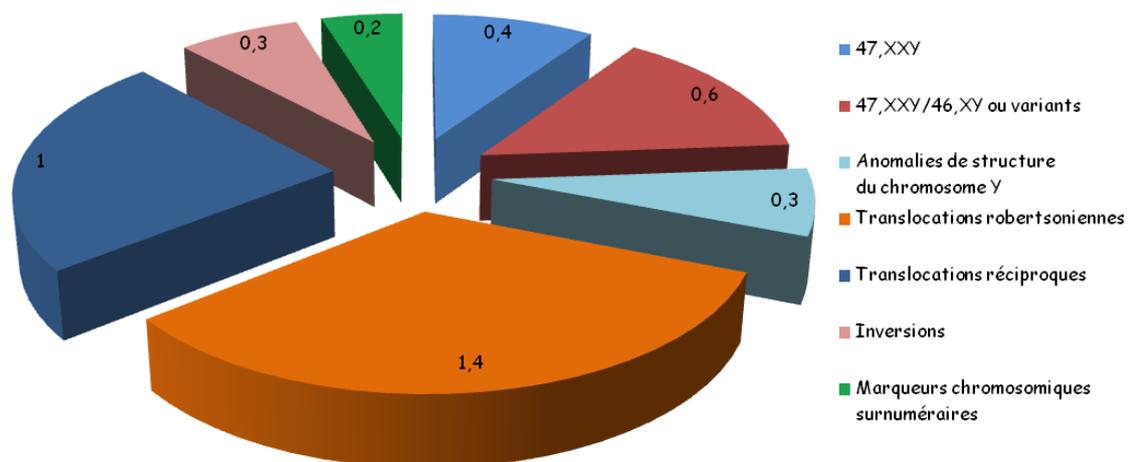


Figure 34 : Fréquences des anomalies chromosomiques rapportées chez 3710 patients oligospermes (valeurs indiquées en pourcentage).

Chez ces patients présentant une oligozoospermie, les anomalies de structure autosomiques sont prépondérantes et plus précisément, les translocations robertsoniennes.

D'autre part, dans cette population, le taux d'anomalies chromosomiques apparaît lié à la concentration spermatique. Ainsi, le taux d'anomalies chromosomiques est de 5% pour une concentration spermatique de moins de  $1 \times 10^6$ /mL, de 3,6% pour une concentration spermatique de 1 à  $5 \times 10^6$ /mL, de 4% entre 5 et  $10 \times 10^6$ /mL et de 2,1% entre 10 et  $20 \times 10^6$ /mL (Figure 35).

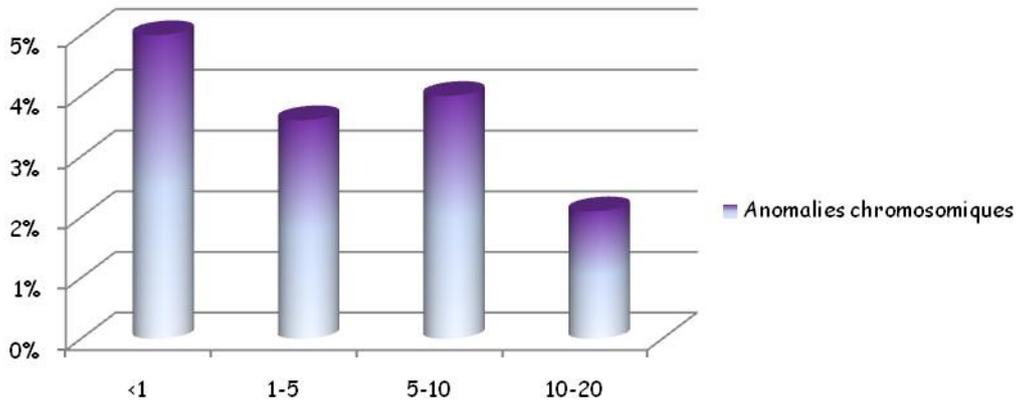


Figure 35 : Fréquences des anomalies chromosomiques constitutionnelles en fonction de la concentration spermatique ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) chez 3710 patients avec une oligozoospermie.

En considérant les hommes présentant une azoospermie, soit une analyse sur 2580 patients, le taux d'anomalies chromosomiques est de 13,48%. La formule chromosomique est 47,XXY pour 10,04% des patients, 47,XXY/46,XY en mosaïque (ou variants) pour 1,20%. Dans cette population d'hommes infertiles, 1,20% des patients ont une anomalie de structure du chromosome Y, 0,19% ont une translocation robertsonienne, 0,62% une translocation réciproque, 0,19% une inversion et 0,04% un marqueur chromosomique surnuméraire (Figure 36).

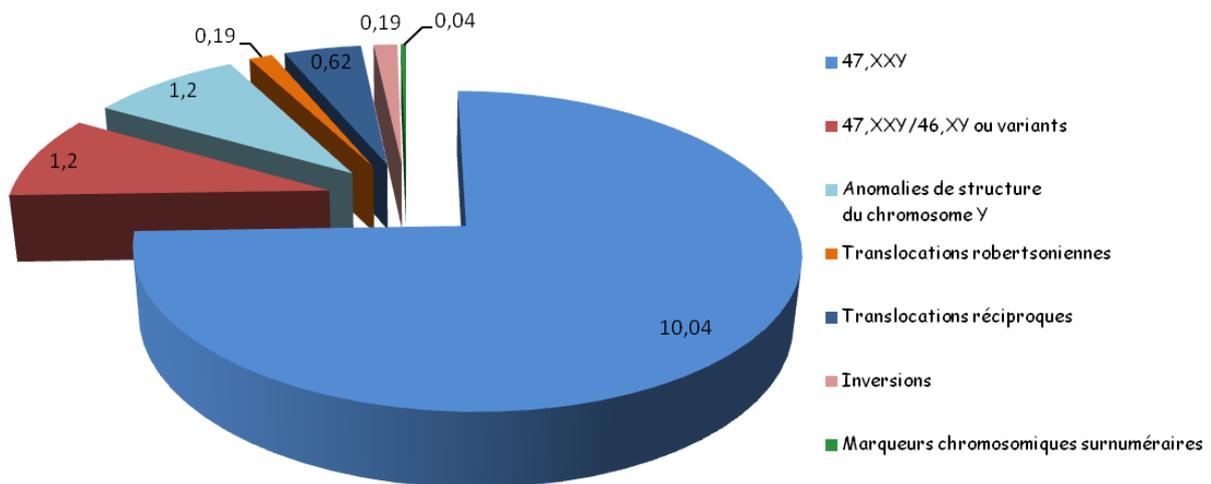


Figure 36 : Fréquences des anomalies chromosomiques rapportées chez 2580 patients azoospermes (valeurs indiquées en pourcentage).

Chez ces patients présentant une azoospermie, les anomalies du nombre des gonosomes sont prépondérantes.

En regroupant des études réalisées chez des hommes infertiles, soit 15242 patients, nous observons que les translocations robertsoniennes sont 9 fois plus fréquentes et les translocations réciproques sont 6 fois plus fréquentes dans cette population que chez les nouveau-nés. De même, la fréquence des inversions (péricentriques ou paracentriques), en dehors de l'inversion péricentrique impliquant l'hétérochromatine du chromosome 9 est multipliée par 13 chez les hommes infertiles.

D'autre part, nous avons analysé des publications rapportant la présence de microdélétions du chromosome Y chez des patients ayant une oligozoospermie ou une azoospermie.

Pour 2967 patients oligospermes, 124 ont une microdélétion du chromosome Y soit un taux de 4,2%. Ces anomalies ont été réparties selon la concentration spermatique. Ainsi, si la concentration spermatique est inférieure ou égale à  $1 \times 10^6$ /mL, 6,4% des patients ont une microdélétion du chromosome Y, si la concentration est comprise entre 1 et  $5 \times 10^6$ /mL, 0,5% ont une microdélétion du chromosome Y et si la concentration est comprise entre 5 et  $20 \times 10^6$ /mL, alors 1,3% ont une microdélétion du chromosome Y (Figure 37).

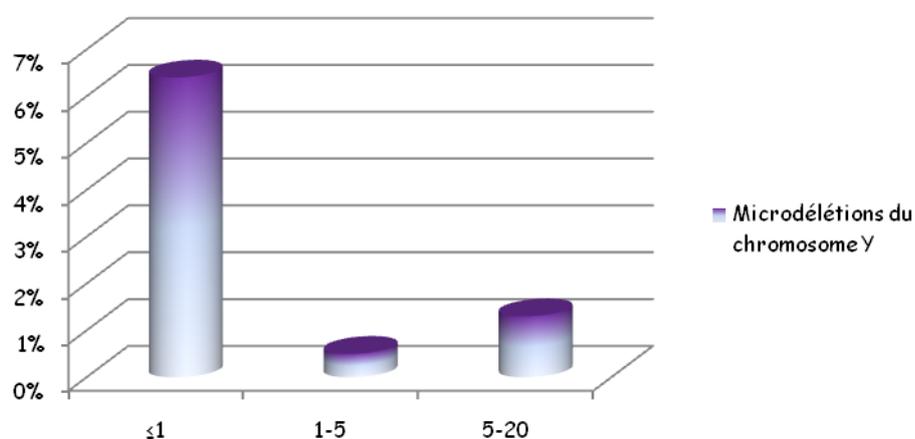


Figure 37 : Fréquences des microdélétions du chromosome Y en fonction de la concentration spermatique ( $\times 10^6$ /mL) chez 2967 patients avec une oligozoospermie.

De plus, nous avons déterminé la distribution des différentes délétions de AZF (a, b, c, a+b, b+c et a+b+c) parmi les patients qui ont à la fois une oligozoospermie et une microdélétion du chromosome Y précisée (n=78). Les microdélétions touchent essentiellement AZFc (76,92%). Le taux est de 1,28% pour AZFb, 19,23% pour AZFb+c et 2,57% pour AZFa+b+c. Aucune microdélétion de AZFa ni de AZFa+b n'a été mise en évidence (Figure 38).

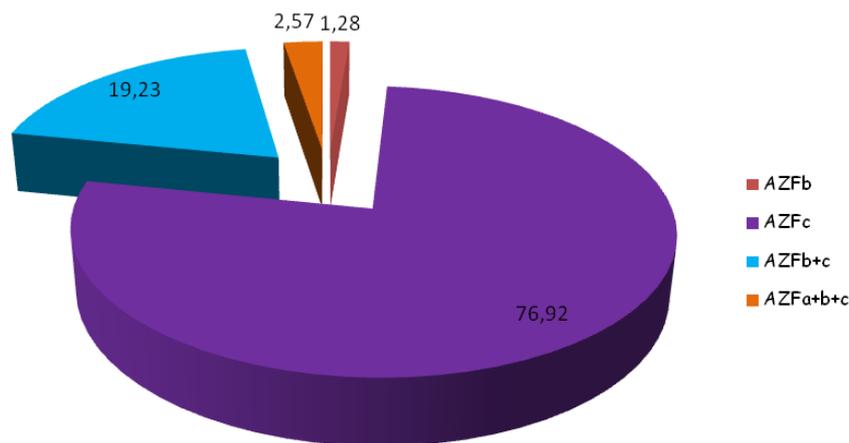


Figure 38 : Distribution des différentes microdélétions du chromosome Y (n=78) chez des patients avec une oligozoospermie (valeurs en pourcentage).

Nous avons regroupé des publications concernant les recherches de microdélétions du Y chez des patients azoospermes, sur 2757 patients au total, 276 ont une microdélétion du chromosome Y soit un taux de 10,01%. Parmi ces patients ayant une microdélétion du chromosome Y précisée (n=199), la distribution des différentes microdélétions de AZF est (Figure 39) : AZFa - 2,5%, AZFb - 10,1%, AZFc - 54,8%, AZFa+b - 3%, AZFb+c - 20,6% et AZFa+b+c - 9%.

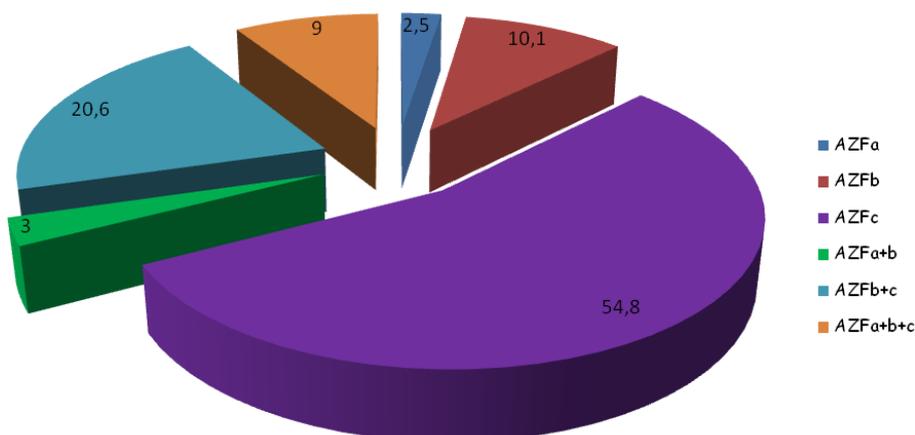


Figure 39 : Distribution des différentes microdélétions du chromosome Y chez des patients avec une azoospermie (valeurs en pourcentage).

Les anomalies chromosomiques et les microdélétions du chromosome Y peuvent entraîner des perturbations méiotiques allant jusqu'à un arrêt complet de la méiose. De plus, les anomalies chromosomiques peuvent entraîner des perturbations de la ségrégation méiotique et ainsi produire des gamètes chromosomiquement déséquilibrés. Cela peut également se produire lorsque le caryotype lymphocytaire est normal.

## Chapitre de livre 1

Chromosomal abnormalities in male infertility



Cytogenetics and Infertility, 2006: 27-52 ISBN: 81-7895-203-3  
Editor: Marc De Braekeleer

## 3 Chromosomal abnormalities in male infertility

M. De Braekeleer<sup>1,2</sup>, A. Perrin<sup>1</sup> and F. Morel<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France  
<sup>2</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, France

### Abstract

*Many factors are known to influence spermatogenesis, making the causes of male infertility difficult to evaluate. Chromosomal aberration is perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis. The existence of chromosomal abnormalities in male sterility was suspected by Ferguson-Smith et al. (1957). In the 30 years following that finding, a few studies were conducted before the advent of the chromosomal banding techniques whereas most of them were performed after the banding techniques were introduced to human cytogenetics.*

The frequency of somatic chromosomal abnormalities is increased in infertile males. The relative risk of carrying a specific karyotypic aberration depends of the status of the male investigated (azoospermic versus oligozoospermic). Males with azoospermia are much more likely to have a sex chromosome abnormality, either numerical or structural, than those with oligozoospermia. On the contrary, males with oligozoospermia are more likely to have an autosomal rearrangement (translocations, inversions, supernumerary markers) than those with azoospermia.

Some 8% of infertile males having a constitutional normal karyotype show some type of meiotic chromosome abnormality. This rate could be higher among males selected on strict inclusion criteria such as severe oligospermia (sperm count  $\leq 1.5$  million/ml) or in vitro fertilisation (IVF) failures.

Y chromosome microdeletions represent the most frequent genetic abnormality in azoospermia and severe oligozoospermia (sperm count  $\leq 1$  million/ml), 10% of the these males carrying a deletion of at least one AZF region. However, there is still no clear genotype-phenotype correlation and Y chromosome microdeletions cannot be predicted on the basis of clinical findings or even the results of semen analysis.

Predicting a chromosomal abnormality or the presence of a Y chromosome microdeletion from sperm disturbance (numeration, morphology, motility) is impossible. Therefore, all infertile males should have a cytogenetic analysis completed by a search for Y chromosome microdeletion, when appropriate. Detection of a chromosomal abnormality or a Y chromosome microdeletion has to lead to genetic counselling.

## Introduction

Many factors are known to influence spermatogenesis, making the causes of male infertility difficult to evaluate. Male infertility has been associated with several genetic and non-genetic conditions, including chromosomal abnormalities, Y chromosome microdeletions, cystic fibrosis, hypogonadotropic hypogonadism, undescended testes, anatomical abnormalities of the genital tract, varicocele, etc. [1,2]. Chromosomal aberration is perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis [3]. Some aberrations are inherited while others arise *de novo* in the sperm-producing cells.

Idiopathic oligozoospermia (less than 20 millions spermatozoa/ml) is the most common cause of male infertility. It is believed that 3 to 4% of men have severe defects in spermatogenesis, resulting in oligozoospermia, a contributing factor to a fifth of infertile couples [4,5].

The existence of chromosomal abnormalities in male sterility was suspected by Ferguson-Smith et al. (1957) when they found a Barr body in 10

of the 91 males they studied for azoospermia or severe oligozoospermia [6]. Two years later, Jacobs and Strong (1959) showed the chromosomal constitution of these men with Klinefelter's syndrome to be 47,XXY [7].

In the 30 years following that finding, a few studies were conducted before the advent of the chromosomal banding techniques [8-10] whereas most of them were performed after the banding techniques were introduced to human cytogenetics (see, for example, [11-18]).

The largest series reported without banding techniques included 1363 male partners in barren couples [8]. The results showed 70 males to have a sex chromosome numerical abnormality, 16 to have an autosomal structural abnormality and four to have an extra chromosome. They also showed a correlation between the mean sperm concentration of the ejaculate and the frequency of chromosomal abnormality. A total of 21.6% of the azoospermic males had an aberrant karyotype while 3.9% of the males having a sperm count between 1 and  $10 \times 10^6$ /ml and 2.2% with a sperm count between 21 and  $40 \times 10^6$ /ml had an abnormal karyotype.

## Somatic chromosomal abnormalities

Determination of the frequencies of the several types of somatic chromosomal abnormalities is made difficult by the lack of consistency between the published series [3]. Different ascertainment procedures have been used in the surveys reported, which make a comparison of results difficult. In some, men attending infertility clinics were selected on the basis of a low sperm count while, in others, analysis was carried out on unselected cases. Furthermore, when the sperm count was taken into account, some workers only reported on azoospermic males, others on oligozoospermic males with a different upper limit ( $10$  to  $40 \times 10^6$ /ml). Smith and Steinberger (1977) reported that it was not unusual for a woman to become pregnant even with her husband having a sperm count less than  $20 \times 10^6$ /ml; they suggested that oligozoospermia should be used to characterise those men with a sperm count less than  $10 \times 10^6$ /ml [19]. However, their suggestion was not accepted by all workers and it is now agreed to consider as oligozoospermic a male with a sperm count less than  $20 \times 10^6$ /ml. Finally, the presentation of the chromosome results in some surveys included karyotypes with minor abnormalities or polymorphisms.

The results of 11 surveys of infertile males are summarised in Table 1. They include both azoospermic and oligozoospermic men, regardless of the sperm count for the latter category. Overall, 604 of the 8952 males reported (6.7%) have an abnormal karyotype, more than 50% of them having a 47,XXY constitution. Table 2 presents the cytogenetic results of 28 series of azoospermic men. Sex chromosome abnormalities are the most frequent aberrations observed in these men, 10% having an homogeneous 47,XXY

**Table 1.** Chromosome abnormalities reported in series of infertile males (including azoospermic and oligozoospermic men).

Reference	Number of patients	Number of abnormal	47,XXX	46,XXY/47,XXY	Other sex chrom num anomaly	Y chrom structural anomaly	46,XX	Rob T	Rec T	Inv	+mar
[14]	2347	198	139	0	6	15	3	25	5	1	2
[88]	353	72	2	2	2	3	0	2	2	0	0
[44]	242	10	2	2	2	0	0	2	1	0	0
[15]	2372	51	24	0	7	2	0	4	10	0	4
[89]	281	75	37	1	6	1	2	3	5	0	2
[90]	57	17	9	0	1	1	0	2	3	1	2
[12]	200	18	13	0	1	2	0	2	0	0	0
[91]	173	39	12	14	8	1	1	0	0	0	0
[92]	123	29	11	9	5	1	0	0	0	0	0
[93]	1790	110	49	12	3	14	0	9	2	2	2
[94]	1210	57	17	1	2	2	0	4	2	2	4
TOTAL	8952	694	342	42	44	42	8	54	29	7	14
In %	6.7	3.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.6	0.3	0.1	0.2

Chrom: chromosome  
Num: numerical  
Rob T: Robertsonian translocation  
Rec T: reciprocal translocation  
Inv: inversion  
+mar: supernumerary marker

**Table 2.** Chromosome abnormalities reported in series of azoospermic males.

Reference	Number of patients	47,XXX	Mosaic and variant 47,XXX	Y chrom structural anomaly	Rob T	Rec T	Inv	+mar
[95]	49	1	0	0	0	0	1	0
[96]	37	3	0	0	0	1	0	0
[97]	11	0	0	1	0	0	0	0
[98]	40	2	0	3	0	0	0	0
[99]	87	0	0	0	1	1	0	0
[100]	87	23	2	1	0	0	0	0
[101]	77	5	0	3	0	0	0	0
[102]	82	15	0	0	0	0	1	0
[103]	50	2	1	1	0	0	0	0
[104]	142	6	2	0	0	0	0	0
[105]	54	3	0	1	0	0	0	0
[106]	58	11	0	1	1	0	0	0
[107]	244	24	0	4	0	1	2	0
[108]	19	1	1	0	0	0	0	0
[109]	103	4	0	0	0	2	0	0
[11]	383	49	1	1	1	4	0	0
[16]	106	7	6	4	0	0	0	0
[18]	68	12	1	1	0	1	0	1
[11]	36	1	2	1	1	0	0	0
[110]	33	6	0	0	0	0	0	0
[111]	53	13	3	0	0	0	0	0
[112]	163	31	0	7	0	0	0	0
[113]	81	4	3	0	0	0	0	0
[114]	20	3	2	0	0	0	0	0
[43]	356	21	6	0	0	2	0	0
[115]	34	1	0	0	0	1	0	0
[116]	53	9	0	0	0	0	0	0
[117]	54	2	1	0	0	2	0	0
TOTAL	2580	259	31	31	5	16	5	1
In %	10.04	1.20	1.20	1.20	0.19	0.62	0.19	0.04

Chrom: chromosome  
Rob T: Robertsonian translocation  
Rec T: reciprocal translocation  
Inv: inversion  
+mar: supernumerary marker

**Table 3.** Chromosome abnormalities reported in series of oligozoospermic males (frequencies expressed in %).

Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	Number of patients	47,XXX	Mosaic and variant 47,XXX	Y chrom structural anomaly	Rob T	Rec T	Inv	+mar
<1	397	1.3	0.8	0.0	1.3	1.3	0.0	0.3
<5	269	0.0	1.1	0.0	1.9	2.2	0.4	0.0
1-5	252	0.0	0.0	0.0	2.0	1.6	0.0	0.0
5-10	101	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	0.0
5-20	473	0.0	0.0	0.5	1.3	1.3	0.2	0.0
<10	959	0.7	1.3	0.6	1.9	0.8	0.6	0.6
10-20	146	0.0	0.0	0.0	1.4	0.7	0.0	0.0
<20	1113	0.4	0.4	0.2	1.0	0.4	0.3	0.0
TOTAL	3710	0.4	0.6	0.3	1.4	1.0	0.3	0.2

Chrom: chromosome  
Rob T: Robertsonian translocation  
Rec T: reciprocal translocation  
Inv: inversion  
+mar: supernumerary marker

karyotype. Cytogenetic analysis of 3710 oligozoospermic males is available in the literature (Annexe 1). One hundred fifty-seven men (4.23%) present a chromosomal abnormality, most of them having a Robertsonian or a reciprocal translocation (Table 3). No correlation exists between the probability of having an abnormality involving an autosomal pair of chromosomes and the sperm count while Klinefelter's syndrome (homogeneous, mosaic or variant) is associated with a very low sperm count (less than 1 million spermatozoa/ml).

A total of 617 males with a 47,XXX constitution (4.05%) is found among the 15242 men karyotyped. This is 38 times higher than the frequency reported in newborn series (0.105%). Klinefelter's syndrome is mainly associated with azoospermia (10.04%) but is also seen with a high frequency (over 1%) in severe oligozoospermia (sperm count < 1x 10<sup>6</sup>/ml). Mosaic and variant 47,XXX constitution is not an unusual finding and is also more likely to be seen in azoospermic and severe oligozoospermic males (respectively, 1.2 and 0.8%). The gonadal defect in XXY males appears to be related to germ cell survival and sex chromosome constitution. It is thought that the testicular atrophy seen in patients with Klinefelter's syndrome is due to the failure of the germ cells containing two X chromosomes to survive [20]. Indeed, Mikamo *et al.* (1968) found the number of spermatogonia in the testes of three XXY boys to be included between 1 and 24% of the control values; however, little or no sign of spermatogenic activity remained at puberty [21]. Although a comprehensive analysis is impossible, the severity of the oligozoospermia or the presence of azoospermia is presumably dependent on the frequencies of the several cell lines involved in the mosaicism.

Annexe 1. Chromosome abnormalities reported in series of oligozoospermic males.

Reference	Nr	Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	47,XXY	Mosaic and variant 47,XXY	Y chrom structural anomaly	Rob T	Rec T	Inv	+mar
[108]	111	<1	0	1	0	0	1	0	0
[95]	149	<1	0	0	0	2	1	0	0
[96]	113	<1	5	0	0	3	3	0	1
[97]	24	<1	0	2	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>397</b>	<b>&lt;1</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
[104]	38	<5	0	0	0	0	0	0	0
[107]	231	<5	0	3	0	5	6	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>269</b>	<b>&lt;5</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
[95]	94	1-5	0	0	0	2	1	0	0
[97]	39	1-5	0	0	0	0	1	0	0
[98]	27	1-5	0	0	0	2	0	0	0
[101]	92	1-5	0	0	0	1	2	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>252</b>	<b>1-5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
[107]	61	5-10	0	0	1	0	1	1	0
[97]	40	5-10	0	0	0	0	1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>101</b>	<b>5-10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
[95]	81	5-20	0	0	2	1	0	0	0
[150]	295	5-20	0	0	1	4	5	0	0
[98]	20	5-20	0	0	0	0	1	0	0
[101]	77	5-20	0	0	0	1	0	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>473</b>	<b>5-20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
[17]	569	<10	3	6	2	14	5	5	4
[16]	390	<10	4	6	4	4	3	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>959</b>	<b>&lt;10</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
[107]	112	10-20	0	0	0	2	1	0	0
[97]	34	10-20	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>146</b>	<b>10-20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
[11]	34	<20	0	3	1	0	0	0	0
[14]	47	<20	0	0	0	2	0	0	0
[43]	464	<20	0	0	6	1	1	0	0
[117]	108	<20	1	0	0	1	0	0	0
[99]	204	<20	2	0	0	0	1	2	0
[100]	34	<20	1	1	0	1	1	0	0
[103]	136	<20	0	0	0	1	0	0	0
[106]	68	<20	0	0	1	0	0	0	0
[109]	18	<20	0	0	0	0	1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>1113</b>	<b>&lt;20</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>0</b>

The frequency of Y chromosome structural rearrangements is higher than that observed in newborn series. For the present purposes, only pericentric inversions, dicentric and deletions of the euchromatin part of the long arm are considered. These rearrangements are seen in azoospermic and oligozoospermic patients (respectively, 1.2 and 0.3%). Failure of pairing between the X and Y chromosomes was reported in a few cases of Y chromosome structural rearrangement, including a dicentric Y chromosome [22], a ring Y chromosome [23] and a pericentric inversion of the Y chromosome [22]. In the 1970s, several oligozoospermic males were found to have a deletion in the euchromatic part of the long arm of the Y chromosome [24,25], which led to the identification of several azoospermia factors (see below).

Robertsonian translocations are seen in 0.73% (111/15242) of the males investigated for infertility, which is nine times higher than the frequency reported in newborn studies (0.085%). It is worth noting that Robertsonian translocations are rarely found in azoospermia (0.19%) but frequently seen in severe oligozoospermia (1.4%). The chromosomes involved in these Robertsonian translocations are known in 101 of the 111 cases. A 13;14 translocation is seen in 73 cases and a 14;21 translocation in 10 cases, which is comparable to the numbers reported in newborn series. Although Robertsonian translocations are more likely to be found in cytogenetic studies of infertile men, their role in oligozoospermia is not clear. Indeed, the testicular histology of such male carriers shows a variable picture ranging from severe impairment to near-normality [26]. Furthermore, the infertile male carriers of a Robertsonian translocation have usually fertile male relatives carrying the same rearrangement.

The probability of finding a reciprocal translocation is six times higher in series of infertile men than in series of newborns (0.092). Indeed, 0.53% of the infertile males carry a reciprocal translocation compared with 0.092% of the newborns. A search in the literature combined with the retrieval of infertile males from the Mendelian Cytogenetics Network Database (<http://www.mcndb.org>) brings a total of 398 patients with a reciprocal translocation, including several three- and four-way translocations. All 48 chromosome arms of a haploid karyotype are involved in translocation (Figure 1). Their distribution, using the Monte Carlo simulations [27,28], shows six arms to be more rearranged than expected on the basis of their relative length ( $p > 0.05$ ); they are 1p, 1q, 9p, 9q, 14q, and Yq. In 2004, Bache *et al.* reported an excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility, the largest number of breakpoints being located in band 1q21 [29]. However, FISH mapping using several BACs (Bacterial Artificial Chromosome) revealed that they did not involve the same region at the molecular level.

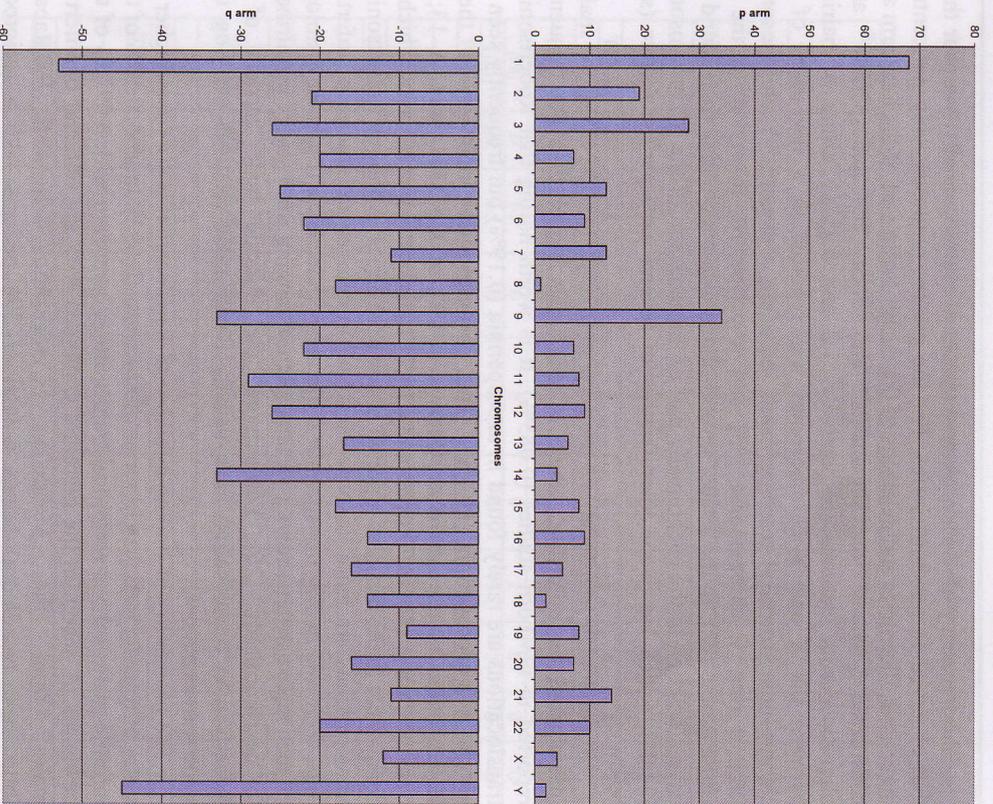


Figure 1. Distribution of reciprocal translocations among infertile males.

It is known that some reciprocal translocations are associated with failure or impairment of sperm production (see, for example, [30-32]). Lyon and Meredith (1966), who first showed that some translocations not involving the sex chromosomes caused male sterility because of spermatogenic impairment, noted that such translocations tended to give a high proportion of chain configurations at the metaphase of the first meiotic division rather than rings

[33]. A correlation was even found between the percentage of chain configuration at meiotic metaphase I and the severity of effect on the sperm count [15,34-39].

Reciprocal translocations involving a sex chromosome and an autosome are rare among infertile men (Figure 1). Lifschytz and Lindsley (1972) postulated that the asynchronous control of X chromosomal and autosomal gene activity was necessary for normal spermatogenesis. Therefore, chromosomal aberrations that interfere with this control in primary spermatocytes will also interfere with normal spermatogenesis [40]. Translocations involving the Y chromosome and an autosome are characterised by a germ-cell maturation arrest resulting in azoospermia or severe oligozoospermia [39,41,42].

Inversions, both pericentric and paracentric, excluding the pericentric inversions involving the heterochromatin of chromosome 9, are rarely found in infertile men (24/15242 - 0.16%). The frequency of inversions shows a 13 times increase among infertile males compared to newborns. A search in the literature combined with the retrieval of infertile males from the Mendelian Cytogenetics Network Database (<http://www.mcndb.org>) brings a total of 99 patients with an inversion (67 pericentric and 32 paracentric) (Figure 2). Pericentric inversions of chromosomes 1, 3, and 10 are present in more than 10 infertile men each. Chromosome 10 is of special interest as six patients have a  $inv(10)(p11q21-22)$  and 4 a  $inv(10)(q11q21)$ . Moreover, the 10q21-q22 region is also involved in inversions observed in women karyotyped before ICSI and is broken in 24 reciprocal translocations seen in infertile men. Therefore, whether this region of the long arm of chromosome 10 harbors one or several genes essential for fertility remains to be explored.

A supernumerary marker is seen in 0.14% (22/15242) of the males investigated for infertility, which is six times higher than the frequency reported in newborn studies (0.023%). The probability of finding a supernumerary marker is higher among oligozoospermic than azoospermic men.

Few reports on male infertility mention chromosomal polymorphisms (or variants). These minor chromosomal abnormalities are considered to have no clinical effect. Micic *et al.* (1984) reported an incidence of 9.4% of chromosomal variants [43] while Abransson *et al.* (1982) reported an incidence of 4.4% of chromosome polymorphisms, most of them being enlarged Y chromosome (Yq+) [44]. Moreau and Teyssier (1982) found 10% of infertile males to have D and G variants to be compared with 4% of control men [45]. At the present time, there is no evidence that a relationship may exist between minor autosomal polymorphisms and male infertility.

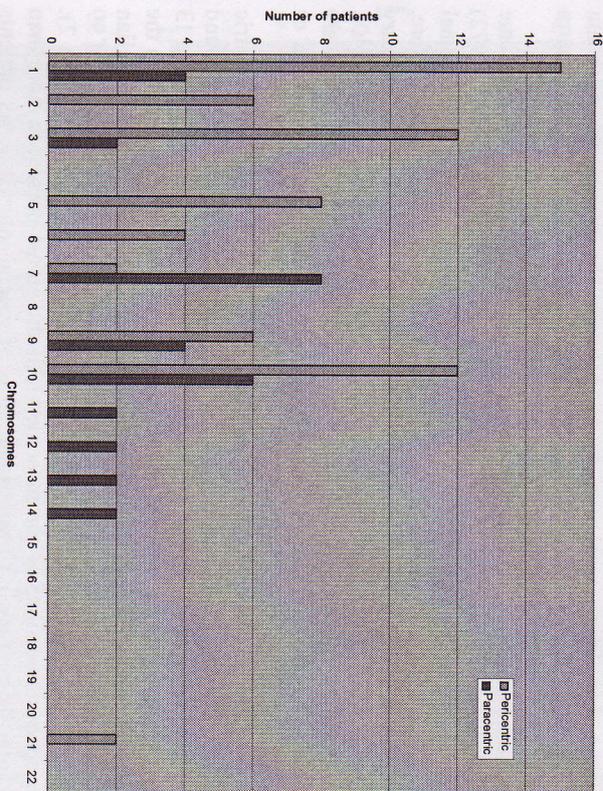


Figure 2. Distribution of inversions among infertile males.

## Meiotic abnormalities

The prevalence of constitutional chromosomal abnormalities is higher among infertile males than in the general population. They can lead to a more or less severe meiotic arrest or segregate abnormally during meiosis and produce chromosomally unbalanced spermatozoa (see next chapter). Cytogenetic errors can also arise during meiosis in infertile men with a normal karyotype [3].

Meiotic studies have been performed using two different approaches, the older studies being based on classical solid staining and the more recent on immunostaining of the synaptonemal complexes and fluorescent *in situ* hybridisation [46-49].

Meiotic chromosome abnormalities have been reported in several series of infertile males using the staining method (Table 4) [3]. Overall, 7.9% of the 2270 males studied show some type of meiotic chromosome abnormality. These abnormalities include, among others, a low chiasma count, the presence of univalents (sign of desynapsis), bivalent fragmentation, asymmetrical bivalents and polyploidy. A full description of the several types of meiotic chromosome abnormalities found in infertile males is given in Koufischer et al. (1982) [50]. Although the technique was fast, cheap, reliable and easy to

Table 4. Meiotic chromosome abnormalities reported in several series of infertile males using a solid staining method.

References	Number of cases studied	Number of cases with meiotic chromosome abnormalities
[8]	30	1
[22]	50	5
[118]	18	11
[119]	50	3
[34]	118	8
[120]	154	7
[117]	200	34
[121]	10	5
[122]	90	5
[50]	450	52
[53]	1100	48
<b>TOTAL</b>	<b>2270</b>	<b>179 (7.9%)</b>

perform, the interest of these studies was controversial. Some authors found them useful [51], others did not [52]. Although some authors thought, at the beginning of the 1980s, that meiotic chromosome abnormalities in males with a normal karyotype did not play a major role in infertility [52], there is now evidence that the abnormalities of the meiotic chromosomes seen in men explain their infertility [53,54].

The incidence of synaptonemal anomalies among infertile males is variable, depending upon the inclusion criteria of the population studied and the methodology applied. More recently, a few studies have tried to analyse more homogeneous populations. Gonsalves et al. (2004) found that 10% of males with non-obstructive azoospermia had lower recombination frequencies than normospermic men [55]. Egozue et al. (2000) observed meiotic anomalies among 18 of the 102 patients (17.6%) with a severe oligoasthenozoospermia (sperm count  $\leq 1.5$  million/ml) [56].

Molecular cytogenetic techniques (fluorescent *in situ* hybridisation) offer the advantage of identifying and characterising each bivalent in metaphase I. They also allow the interpretation of metaphase II figures [46-49]. However, these techniques are time-consuming and very expensive; therefore, their use is limited to research purposes.

Meiotic chromosome analysis is useful and could be performed, as part of the evaluation of male infertility, in selected patients. As proposed by Egozue et al. (2005), the best candidates would be males with a normal karyotype and a long history of unexplained infertility, including those with severe oligoasthenozoospermia (sperm count  $\leq 1.5$  million/ml) or in vitro fertilisation (IVF) failures [54].

## Y Chromosome microdeletions

The long arm of the Y chromosome is involved in male sexual development and spermatogenesis. It contains at least 15 gene families supposedly involved in the control of spermatogenesis [57-62]. The premeiotic pairing process of the sex chromosomes along the AZF (azoospermia factor) chromatin is essential for proper meiosis [63].

Spermatogenesis is a complex differentiation process resulting in major biochemical, physiological and morphologic changes regulated by many genes and sensitive to environmental factors. It involves different genes regulating mitotic and meiotic cell divisions, as well as subsequent differentiation to mature spermatozoa.

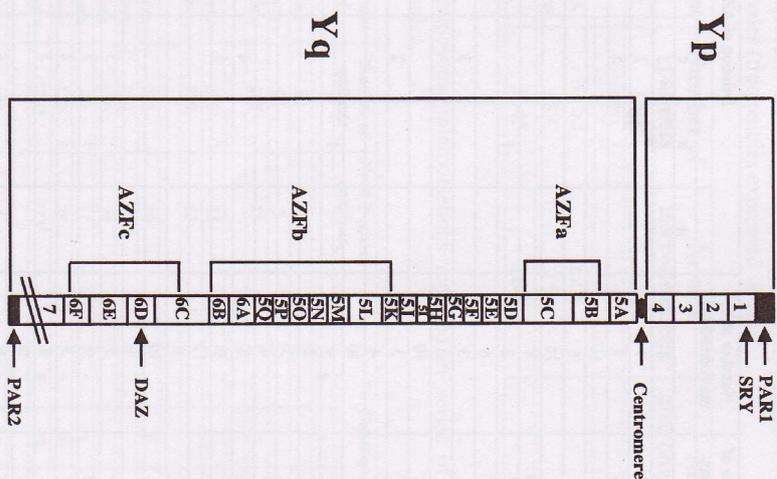
The Y chromosome is genetically highly unstable. The high spontaneous loss of genetic material is due, not only to the presence of highly repetitive sequences, but also to the lack of recombination of a large part of the chromosome during meiosis.

In 1976, Tiepolo and Zuffardi showed that deletions in the non fluorescent portion of the long arm of the Y chromosome were associated with spermatogenic failure [25]. In 1992, Vollrath *et al.* established the first STS (Sequence Tagged Site) interval map of the Y chromosome using 110 STS loci in band Yq11, which they subdivided into 23 intervals (5A-5Q, 6A-6F) (Figure 3) [64]. In 1996, Vogt *et al.* mapped several azoospermia factors (AZF) to different regions of band Yq11, respectively AZFa, AZFb and AZFc in the proximal, middle and distal regions of Yq11 [58]. More recently, a fourth region (AZFd) was described by Kent-First *et al.* [65].

The identification of Y chromosome microdeletions has a diagnostic, prognostic and preventive value. This is why, although they cannot be evidenced by cytogenetic techniques, there are considered here. Indeed, Y chromosome microdeletions are searched for using a panel of STS, as recommended notably by the European Academy of Andrology, for the regions AZFa, AZFb and AZFc. Therefore, microdeletions located outside the regions covered by the panel are not detected and, in these cases, the males are considered to have no Y microdeletion. However, it is known that genes associated with impaired spermatogenesis are located in the regions that are not currently tested [66].

Many studies have tried to determine the prevalence of Y chromosome microdeletions among infertile males. Unfortunately, there is no consensus regarding how the men should be divided in categories, so that we identified 15 different categories from azoospermia to sperm concentration up to  $20 \times 10^6$  spermatozoa/ml. In a few studies, patients could not even be classified according to a sperm count category.

The incidence of Y chromosome microdeletions in infertile males varies between studies. These differences are mostly related to study design



**Figure 3.** Schematic representation of the Y chromosome (PAR: pseudo-autosomal region; SRY: sex-determining region Y; AZF: azoospermia factor; DAZ: deleted in azoospermia).

(inclusion criteria) and to the location and number of STSs used, although methodological problems and population variations cannot be excluded.

The mean incidence of Y chromosome microdeletions in 2757 azoospermic males reported in the literature is 10% (Table 5). AZFa is deleted, alone or in combination, in 14.6%, AZFb in 42.7%, and AZFc in 84.4% of the azoospermic men (Figure 4). In 10 studies, azoospermic and oligospermic men are combined, with the highest sperm concentration value varying from 1 to  $20 \times 10^6$ /ml (Annexe 2). The overall incidence of Y chromosome microdeletions is 6.7% among these 2445 males, the highest figure (9.3%) being observed in males having a sperm count less than 1 million spermatozoa/ml (Table 6). Although the incidence of Y chromosome microdeletions is 4.2% among

**Table 5.** Y chromosome microdeletions in series of azoospermic males.

Reference	Number of patients	Number of Y microdeletions	Deletion of AZF					
			a	b	c	a+b	b+c	a+b+c
[123]	108	4			3		1	
[124]	108	7			2		5	
[109]	105	7		1	5			1
[125]	50	10						
[87]	26	6						
[126]	83	15						4
[127]	139	4						
[128]	39	2	1					
[129]	16	6		1				
[130]	74	3			3			
[108]	19	0						
[711]*	18	10				1		9
[131]	44	3			2		1	
[132]	51	4			4			
[77]	51	10						1
[133]	71	4		1			2	
[134]	14	2						1
[105]	50	5						
[135]	19	4			4			4
[136]	40	8			4			2
[106]	42	6		3	1			
[68]	89	12						
[137]	9	1						
[138]	73	10						
[139]	22	1						
[140]	59	5			5			5
[140]	135	9			3			5
[141]	15	3		1	2			2
[75]	92	8	1		3			2
[142]	33	0						
[103]	50	8			8			
[74]	27	6	1		4			1
[143]	27	6			6			
[104]	134	8			5			3
[144]	44	2						
[145]	73	9			8			1
[92]	73	7		1	3		3	
[146]	218	18			17			
[147]	54	14	2		10		1	4
[148]	3	1		9				1
[79]	3	0						
[102]	94	11			8			2
[95]	50	1		1			1	
[96]	37	3			3			
[97]	13	0						3
[98]	40	3						
[149]	46	5		1	4			
[101]	77	5						2
<b>TOTAL</b>	<b>2757</b>	<b>276</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>109</b>	<b>6</b>	<b>41</b>	<b>18</b>
<b>In %</b>		<b>10.01</b>	<b>2.5</b>	<b>10.1</b>	<b>54.8</b>	<b>3.0</b>	<b>20.6</b>	<b>9.0</b>

\* Sertoli cell-only syndrome

**Table 6.** Y chromosome microdeletions reported in series of azoospermic and oligozoospermic males (frequencies expressed in %).

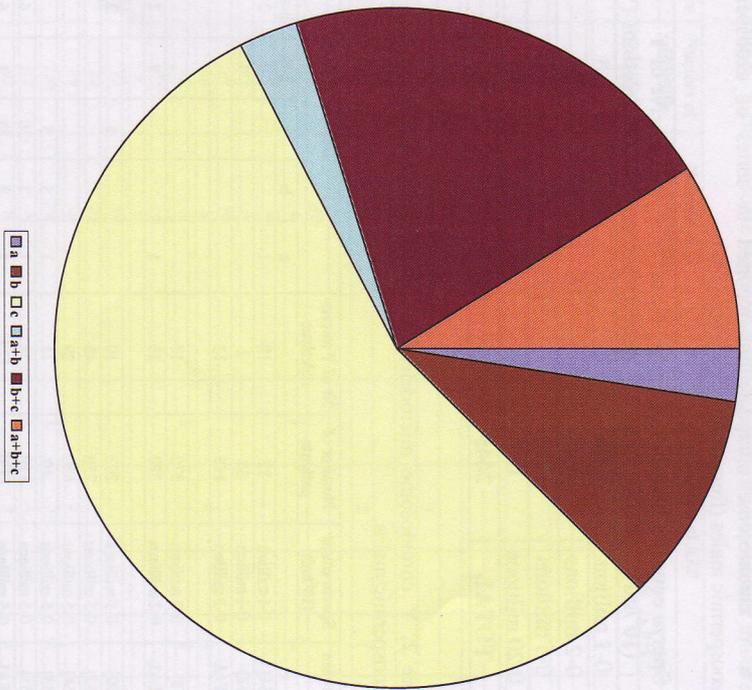
Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	Number of patients	Nr of Y microdeletions	Nr of Y microdeletions (%)
0-1 million	140	13	9.3
0-2 millions	370	13	3.5
0-5 millions	1752	123	7.0
0-20 millions	183	15	8.2
<b>TOTAL</b>	<b>2445</b>	<b>164</b>	<b>6.7</b>

**Annexe 2.** Y chromosome microdeletions reported in series of azoospermic and oligozoospermic males.

Reference	Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	Number of patients	Nr of Y microdeletions	Deletion of AZF					
				a	b	c	a+b	b+c	a+b+c
[151]	0-1 million	82	10		1		6	2	1
[152]	0-1 million	58	3				3		
<b>TOTAL</b>	<b>0-1 million</b>	<b>140</b>	<b>13</b>				<b>9</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
[58]	0-2 millions	370	13						
<b>TOTAL</b>	<b>0-2 millions</b>	<b>370</b>	<b>13</b>	<b>1</b>			<b>9</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
[150]	0-5 millions	202	10				8		2
[153]	0-5 millions	750	45						
[154]	0-5 millions	650	29						
[155]	0-5 millions	40	11		1		5	5	
[155]	0-5 millions	110	28		1		3	10	4
<b>TOTAL</b>	<b>0-5 millions</b>	<b>1752</b>	<b>123</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>23</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
[91]	0-20 millions	133	8				4		3
[156]	0-20 millions	50	7						
<b>TOTAL</b>	<b>0-20 millions</b>	<b>183</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>3</b>			

oligoospermic men, major differences exist between the 5 categories considered (Annexe 3). Indeed, males having a sperm count less than 1 million have a 6.4% risk of being carrier of a Y chromosome microdeletion (58/912) whereas males whose sperm count is included between 1 and 20 millions/ml have a 1% risk (10/965) (Table 7). AZFa is deleted, alone or in combination, in 2.6%, AZFb in 23.1%, and AZFc in 98.7% of the oligozoospermic men (Figure 5).

In summary, 6 to 10% of the males having less than one million spermatozoa/ml carry a Y chromosome microdeletion, which is rare in men having a sperm count higher than one million/ml (about 1%). AZFa is more likely to be deleted in azoospermic patients (associated with Sertoli cell-only syndrome) while AZFc is deleted in some 90% of the infertile males.



**Figure 4.** Distribution of the Y chromosome microdeletions among azoospermic males.

Y chromosome microdeletions represent the most frequent genetic abnormality in azoospermia and severe oligozoospermia. Although different AZF regions can be deleted, there is still no clear genotype-phenotype correlation, apparently identical microdeletions being associated with different tubular damage and similar testicular anomalies with different types of microdeletions [62,65,67-70]. Deletions of AZFa are frequently observed in idiopathic Sertoli cell-only syndrome (azoospermia, small testes, elevated FSH, normal level of testosterone, absence of germ cells in the testes) [71] and less frequently in oligozoospermia. Deletions of AZFb and AZFc can be seen in conditions varying from Sertoli cell-only syndrome to mild oligozoospermia. Deletions of AZFd are associated with mild oligozoospermia to normozoospermia with abnormal sperm morphology [65]. Therefore, Y chromosome microdeletions cannot be predicted on the basis of clinical findings or even the results of semen analysis.

### Annexe 3. Y chromosome microdeletions reported in series of oligozoospermic males.

Reference	Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	Number of patients	Nr of Y micro- deletions	Deletion of AZF						
				a	b	c	a+b	b+c	a+b+c	
[95]	≤1 million	151	2							
[96]	≤1 million	113	5							
[97]	≤1 million	32	1							
[101]	≤1 million	47	1							
[148]	≤1 million	8	2							
[146]	≤1 million	116	12							
[143]	≤1 million	51	3		1					
[144]	≤1 million	63	9							
[139]	≤1 million	42	2					1		1
[130]	≤1 million	62	2						2	
[108]	≤1 million	111	7							7
[132]	≤1 million	21	3							
[77]	≤1 million	30	4							
[124]	≤1 million	20	2							1
[157]	≤1 million	35	2							
[125]	≤1 million	10	1							
<b>TOTAL</b>	<b>≤1 million</b>	<b>912</b>	<b>58</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
[124]	1.5 millions	12	1							
[130]	1.5 millions	32	0							
[132]	1.5 millions	17	1							
[139]	1.5 millions	26	0							
[143]	1.5 millions	23	0							
[95]	1.5 millions	94	0							
[97]	1.5 millions	47	0							
[98]	1.5 millions	27	0							
[101]	1.5 millions	92	0							
<b>TOTAL</b>	<b>1.5 millions</b>	<b>370</b>	<b>2</b>							
[79]	≤5 millions	26	2					2		
[74]	≤5 millions	91	3					3		
[104]	≤5 millions	38	1					1		
[145]	≤5 millions	28	4					4		
[140]	≤5 millions	47	4					4		
[140]	≤5 millions	19	0							
[141]	≤5 millions	50	2					2		
[75]	≤5 millions	86	2					2		
[142]	≤5 millions	64	0							
[138]	≤5 millions	18	1							
[127]	≤5 millions	53	0							
[129]	≤5 millions	22	5							
[131]	≤5 millions	86	3					3		
[123]	≤5 millions	121	5					5		
[87]	≤5 millions	30	3							
[126]	≤5 millions	39	5							
<b>TOTAL</b>	<b>≤5 millions</b>	<b>818</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
[79]	5-20 millions	14	0							
[155]	5-20 millions	20	0							

1551	5-20 millions	20	0																	
1431	5-20 millions	25	0																	
1391	5-20 millions	27	0																	
1411	5-20 millions	62	2																	
751	5-20 millions	48	0																	
1311	5-20 millions	39	0																	
1321	5-20 millions	9	0																	
1241	5-20 millions	10	0																	
871	5-20 millions	42	4																	
1261	5-20 millions	7	1																	
951	5-20 millions	81	0																	
971	5-20 millions	79	1																	
981	5-20 millions	20	0																	
1011	5-20 millions	92	0																	
<b>TOTAL</b>	<b>5-20 millions</b>	<b>595</b>	<b>8</b>																	
1031	≤20 millions	136	2																	
921	≤20 millions	10	1																	
1281	≤20 millions	17	0																	
1091	≤20 millions	28	1																	
1351	≤20 millions	14	2																	
1061	≤20 millions	67	10																	
<b>TOTAL</b>	<b>≤20 millions</b>	<b>272</b>	<b>16</b>																	

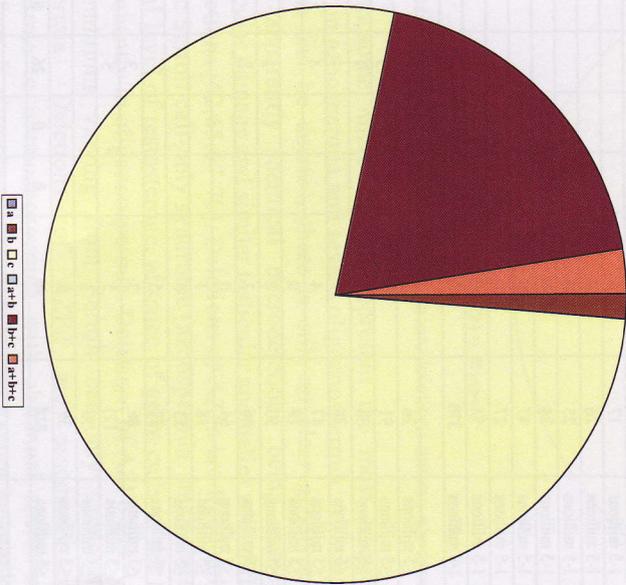


Figure 5. Distribution of the Y chromosome microdeletions among oligozoospermic males.

Table 7. Y chromosome microdeletions reported in series of oligozoospermic males (frequencies expressed in %).

Sperm count ( $10^6/ml$ )	Number of patients	Number of Y microdeletions	Number of Y microdeletions (%)
<1	912	58	6.4
<5	818	40	4.9
1-5	370	2	0.5
5-20	595	8	1.3
<20	272	16	5.9
<b>TOTAL</b>	<b>2967</b>	<b>124</b>	<b>4.2</b>

Identifying the type of microdeletion is very important because it has implications on the success rate of testicular sperm retrieval in azoospermic patients [70,72]. Several studies found that the ICSI outcomes with sperm from men carrying a AZFc microdeletion were comparable to those with a normal Y chromosome [69,73-77]. However, van Golde *et al.* found a significantly lower rate of fertilisation and poorer embryo quality among 8 men with a AZFc microdeletion compared with those having a normal Y chromosome [78].

Vertical transmission of a Y microdeletion from father to son through ICSI has now been reported in several cases [79-83]. No instance of a son not inheriting a Y microdeletion from his father has been reported, suggesting that the microdeletion is present in a homogeneous and not a mosaic state in the sperm of the father. A few instances of transmission of a Y microdeletion from a fertile father to his infertile sons have also been reported [84-87].

## Conclusions

The frequency of somatic chromosomal abnormalities is increased in infertile males. The relative risk of carrying a specific karyotypic aberration depends of the status of the male investigated (azoospermic versus oligozoospermic). Males with azoospermia are much more likely to have a sex chromosome abnormality, either numerical or structural, than those with oligozoospermia. On the contrary, males with oligozoospermia are more likely to have an autosomal rearrangement (translocations, inversions, supernumerary markers) than those with azoospermia. This explains why the distribution and the incidence of the several types of chromosomal abnormalities among males enrolled in a ICSI program are closer to those of oligozoospermic rather than azoospermic males.

Some 8% of infertile males having a constitutional normal karyotype show some type of meiotic chromosome abnormality. This rate could be higher among males selected on strict inclusion criteria such as severe oligoasthenozoospermia (sperm count  $\leq 1.5$  million/ml) or in vitro fertilisation

(IVF) failures. Therefore, meiotic chromosome analysis is useful and could be performed, as part of the evaluation of male infertility, in selected patients.

Following the identification that deletions in the non fluorescent portion of the long arm of the Y chromosome were associated with spermatogenic failure, three regions located in band Yq11, AZFa, AZFb and AZFc, have been found to be deleted in infertile males. Y chromosome microdeletions represent the most frequent genetic abnormality in azoospermia and severe oligozoospermia (sperm count  $\leq 1$  million/ml), 10% of these males carrying a deletion of at least one AZF region. However, there is still no clear genotype-phenotype correlation and Y chromosome microdeletions cannot be predicted on the basis of clinical findings or even the results of semen analysis.

Predicting a chromosomal abnormality or the presence of a Y chromosome microdeletion from sperm disturbance (numeration, morphology, motility) is impossible. Therefore, all infertile males should have a cytogenetic analysis completed by a search for Y chromosome microdeletion, when appropriate.

Detection of a chromosomal abnormality or a Y chromosome microdeletion has to lead to genetic counselling. The couple must be informed of the risks of the planned infertility treatment (IVF or ICSI): possible fertilisation or implantation failure, increased abortion risk, potential birth of a child with an unbalanced chromosomal abnormality, risk of transmitting a genetic defect possibly leading to infertility, etc.

## References

- Diemer, T. and Desjardins, C. 1999, *Hum. Reprod. Update*, 5, 120.
- Huyh, T., Mollard, R., and Trounson, A. 2002, *Hum. Reprod. Update*, 8, 183.
- De Braekeleer, M. and Dao, T.N. 1991, *Hum. Reprod.*, 6, 245.
- Van Zyl, J.A., Menkveld, R., van Kotze, T.J., Retief, A.E., and van Niekerk, W.A. 1975, *Int. J. Fertil.*, 20, 129.
- Hull, M.G., Glazener, C.M., Kelly, N.J., Conway, D.I., Foster, P.A., Hinton, R.A., Coulson, C., Lambert, P.A., Watt, E.M., and Desai, K.M. 1985, *Br. Med. J.*, 291, 1693.
- Ferguson-Smith, M.A., Lennox, B., Mack, W.S., and Stewart, J.S.S. 1957, *Lancet*, ii, 167.
- Jacobs, P.A. and Strong, J.A. 1959, *Nature*, 183, 302.
- Kjessler, B., 1966. Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertile clinic. Monographs in Human Genetics. S. Karger, Basel.
- Phillip, J., Skakkebaek, N.E., Hammen, R., Johnsen, S.G., and Rebbe, H. 1970, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 49, 235.
- Dutrillaux, B., Le Lortier, G., Salat, J., and Rotman, J. 1971, *Presse Méd.*, 79, 1231.
- Laurent, C., Papathanassiou, Z., Haour, P., and Cognat, M. 1973, *Lyon Méd.*, 229, 883.
- Kouischer, L. and Schoysman, R. 1974, *Clin. Genet.*, 5, 116.
- Chandley, A.C., Edmond, P., Christie, S., Gowans, L., Fletcher, J., Frackiewicz, A., and Newton, M. 1975, *Ann. Hum. Genet.*, 39, 231.
- Tiepolo, L., Zuffardi, O., Fraccaro, M., and Giariola, A., 1981. Chromosome abnormalities and male infertility. G. Prague, E.S.E. Hafez, C. Conti, and A. Fabbrini (Eds.), *Oligozoospermia: Recent Progress in Andrology*. Raven Press, New York, pp. 233-245.
- Chandley, A.C. 1984, *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 6, 1.
- Retief, A.E., Van Zyl, J.A., Menkveld, R., Fox, M.F., Kotze, G.M., and Brusnick, J. 1984, *Hum. Genet.*, 66, 162.
- Bourrouillou, G., Dastugue, N., and Colombies, P. 1985, *Hum. Genet.*, 71, 366.
- Coco, R., Gallego, M.S., Brigo, S., Carre, C., and Nicholson, R. 1986, *Medicina (Buenos Aires)*, 46, 303.
- Smith, K.D. and Steinberger, E., 1977. What is oligozoospermia? P. Troen and H.R. Nankin (Eds.), *The testis in normal and infertile men*. Raven Press, New York, pp. 489-503.
- Burgoyne, P.S. 1978, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 18, 317.
- Mikamo, K., Aguericif, M., Hazeghi, P., and Martin-du-Pain, R. 1968, *Fertil. Steril.*, 19, 731.
- Mellree, M.E., Price, W.H., Court Brown, W.M., Selby-Tulloch, W., Newsam, J.E., and MacLean, N. 1966, *Lancet*, ii, 69.
- Chandley, A.C. and Edmond, P. 1971, *Cytogenetics*, 10, 295.
- Neu, R.L., Bartlow, H.J., and Gardner, L.I. 1973, *Fertil. Steril.*, 24, 811.
- Tiepolo, L. and Zuffardi, O. 1976, *Hum. Genet.*, 34, 119.
- Chandley, A.C., 1975. Human meiotic studies. A.E.H. Emery (Ed.), *Modern Trends in Human Genetics*. Butterworths, London, pp. 31-82.
- De Braekeleer, M. and Smith, B. 1988, *Ann. Hum. Genet.*, 52, 63.
- De Braekeleer, M. and Dao, T.N. 1990, *Hum. Reprod.*, 5, 519.
- Bache, I., Van Assche, E., Cingoz, S., Bugge, M., Turner, Z., Hjorth, M., Lundsteen, C., Lespinnasse, J., Winther, K., Niebuhr, A., Kalscheuer, V., Liebaers, I., Bonduelle, M., Tournaye, H., Ayuso, C., Barbi, G., Blennow, E., Bourrouillou, G., Brondum-Nielsen, K., Bruun-Petersen, G., Croquette, M.F., Dahoun, S., Dallapiccola, B., Davison, V., Delobel, B., Duba, H.C., Duprez, L., Ferguson-Smith, M., Fitzpatrick, D.R., Grace, E., Hansmann, J., Hulten, M., Jensen, P.K.A., Jonveaux, P., Kristoffersson, U., Lopez-Pajares, I., McGowan-Jordan, J., Murken, J., Otera, M., Parkin, T., Passarge, E., Ramos, C., Rasmussen, K., Schempp, W., Schubert, R., Schwinger, E., Shabai, F., Smith, K., Stallings, R., Stefanova, M., Tranebjerg, L., Turleau, C., Birger van der Hagen, C., Vekemans, M., Kokalj-Vokac, N., Wagner, K., Wahlstrom, J., Zelante, L., and Tommerup, N. 2004, *Eur. J. Hum. Genet.*, 12, 993.
- Chandley, A.C., Serranez, H., and Fletcher, J. 1976, *Cytogenet. Cell Genet.*, 17, 98.
- Martin, R.H., Hildebrand, K., Balkan, W., Long-Simpson, L., Barclay, L., and Ko, E. 1988, *Genome*, 30, s252.
- Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M.J., Herry, A., Amice, V., Amice, J., and De Braekeleer, M. 2004, *Int. J. Andrology*, 27, 200.
- Lyon, S. and Meredith, J., 1966. Reciprocal translocations as a cause of male sterility. Monographs in Human Genetics. S. Karger, Basel.
- Chandley, A.C., McLean, N., Edmond, P., Fletcher, J., and Watson, G.S. 1976, *Ann. Hum. Genet.*, 40, 165.

35. Laurent, C., Biéumont, M.C., Cognat, M., and Durillaux, B. 1977, *Hum. Genet.*, 39, 123.
36. San Roman, C., Sordo, M.T., and Garcia-Sagredo, J.M. 1979, *J. Med. Genet.*, 16, 56.
37. Léonard, C., Bisson, J.P., and David, G. 1979, *Arch. Androl.*, 2, 269.
38. Blattner, W.A., Kistenmacher, M.L., Tsai, S., and Punnett, H.H. 1978, *Am. J. Hum. Genet.*, 30, A74-A70.
39. Faed, M.J.W., Lamont, M.A., and Baxby, K. 1982, *J. Med. Genet.*, 19, 49.
40. Lifschytz, E. and Lindsley, D.L. 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 182.
41. Smith, A., Fraser, I.S., and Elliot, G. 1979, *Ann. Génét.*, 22, 189.
42. Laurent, C., Chandley, A.C., Durillaux, B., and Speed, R.M. 1982, *Cytogenet. Cell Genet.*, 33, 312.
43. Micic, M., Micic, S., and Diklic, V. 1983, *Clin. Genet.*, 25, 33.
44. Abramsson, L., Beckman, G., Duchek, M., and Nordenson, I. 1982, *J. Urol.*, 128, 52.
45. Moreau, N. and Teyssier, M. 1982, *Arch. Androl.*, 9, 307.
46. Barlow, A.L. and Hulten, M.A. 1996, *Chromosome Research*, 4, 562.
47. Codina-Pascual, M., Kraus, J., Speicher, M.R., Oliver-Bonet, M., Murcia, V., Sarquella, J., Egozcue, J., Navarro, J., and Benet, J. 2004, *Cytogenet. Genome Res.*, 107, 18.
48. Oliver-Bonet, M., Lieht, T., Nietzel, A., Heller, A., Starke, H., Claussen, U., Codina-Pascual, M., Pujol, A., Abad, C., Egozcue, J., Navarro, J., and Benet, J. 2003, *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 879.
49. Sarrate, Z., Blanco, J., Egozcue, S., Vidal, F., and Egozcue, J. 2004, *Fertil. Steril.*, 82, 712.
50. Konlischer, L., Schoysman, R., and Gillerto, Y. 1982, *J. Génét. Hum.*, 30, 81.
51. Templado, C., Marina, S., Coll, M.D., and Egozcue, J. 1980, *Hum. Genet.*, 53, 335.
52. Skakkebaek, N.E., 1981. *Cytogenetics in male hypogonadism*. H.Burger and D.deKretser (Eds.), The testis. Raven Press, New York, pp. 401-417.
53. Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F., and Marina, S. 1983, *Hum. Genet.*, 65, 185.
54. Egozcue, J., Sarrate, Z., Codina-Pascual, M., Egozcue, S., Oliver-Bonet, M., Blanco, J., Navarro, J., Benet, J., and Vidal, F. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 337.
55. Gonsalves, J., Sun, F., Schlegel, P.N., Turek, P.J., Hopps, C.V., Greene, C., Martin, R.H., and Reijo Pera, R.A. 2004, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 2875.
56. Egozcue, S., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barril, P.N., and Egozcue, J. 2000, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 307.
57. Lahn, B.T. and Page, D.C. 1997, *Science*, 278, 675.
58. Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegart, O., Hirschmann, P., Kieseewetter, F., Köhn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H.M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Gröne, H.-J., Jung, A., Engel, W., and Haidl, G. 1996, *Hum. Mol. Genet.*, 5, 933.
59. McElreavey, K., Krausz, C., Parrat, C., and Fellous, M. 2002, *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 30, 405.
60. McElreavey, K., Krausz, C., and Bishop, C.E. 2000, *Probl. Cell. Differ.*, 28, 211.
61. Vogt, P.H. 2005, *Hum. Reprod. Update*, 11, 319.

62. Vogt, P.H. 1998, *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 739.
63. Armstrong, S.J., Kirkham, A.J., and Hulten, M.A. 1994, *Chromosome Research*, 2, 445.
64. Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., and et al. 1992, *Science*, 258, 52.
65. Kent-First, M., Muallem, A., Shultz, J., Pryor, J., Roberts, K., Nollen, W., Meisner, L., Chandley, A., Gouchey, G., Jorgensen, L., Havighurst, T., and Grosch, J. 1999, *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 27.
66. Vinci, G., Raicu, F., Popa, O., Coccos, R., and McElreavey, K. 2005, *Mol. Hum. Reprod.*, 11, 295.
67. Foresta, C., Moro, E., and Ferlin, A. 2001, *Hum. Reprod.*, 16, 1543.
68. Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., and et al. 1995, *Nature Genet.*, 10, 383.
69. Oates, R.D., Silber, S., Brown, L.G., and Page, D.C. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 2813.
70. Hopps, C.V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G.D., Rosenwaks, Z., and Schlegel, P.N. 2003, *Hum. Reprod.*, 18, 1660.
71. Foresta, C., Ferlin, A., Garolla, A., Moro, E., Pistorello, M., Barbaux, S., and Rossato, M. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 302.
72. Brandell, R.A., Mielnik, A., Liotta, D., Ye, Z., Vecek, L.L., Palermo, G.D., and Schlegel, P.N. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 2812.
73. Choi, J.M., Chung, P., Vecek, L., Mielnik, A., Palermo, G.D., and Schlegel, P.N. 2004, *Fertil. Steril.*, 81, 337.
74. Kihaike, P.E., Kisanaga, R.E., Aoki, K., Kumasako, Y., Misumi, J., and Utsunomiya, T. 2004, *Mol. Reprod. Dev.*, 68, 176.
75. Peterlin, B., Kunelj, T., Sinkovec, J., Gligorovska, N., and Zorn, B. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 17.
76. Mulhall, J.P., Reijo, R., Alagappan, R., Brown, L., Page, D., Carson, R., and Oates, R.D. 1997, *Hum. Reprod.*, 12, 503.
77. Silber, S.J., Alagappan, R., Brown, L.G., and Page, D.C. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 3332.
78. Van Golde, R.J.T., Wezels, A.M.M., de Graaf, R., Tuerlings, J.H.A.M., Braat, D.D.M., and Kremer, J.A.M. 2001, *Hum. Reprod.*, 16, 289.
79. Cram, D.S., Ma, K., Bhasin, S., Arias, J., Pandjaitan, M., Chu, B., Audrins, P., Saunders, D., Quinn, F., deKretser, D., and McLachlan, R. 2000, *Fertil. Steril.*, 74, 909.
80. Kleinman, S.E., Yockey, L., Ganzu, R., Hauser, R., Botchan, A., Paz, G., Lessing, J.B., Yaron, Y., and Yavez, H. 1999, *J. Androl.*, 20, 394.
81. Komori, S., Kato, H., Kobayashi, S.I., Koyama, K., and Isojima, S. 2002, *J. Hum. Genet.*, 47, 465.
82. Tse, J.Y., Yeung, W.S., Lau, E.Y., Ng, E.H., Tam, P.C., So, W.W., Tang, M.H., Lau, E.T., and Ho, P.C. 2001, *Chinese Med J.*, 114, 97.
83. Kent-First, M.G., Kol, S., Muallem, A., Ofir, R., Manor, D., Blazer, S., First, N., and Iiskovitz-Eldor, J. 1996, *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 943.
84. Gatta, V., Stuppia, L., Calabrese, G., Morizio, E., Guanciali-Franchi, P., and Palka, G. 2002, *J. Med. Genet.*, 39, e27.
85. Chang, P.L., Sauer, M.V., and Brown, S. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 2689.
86. Kuhnert, B., Gromoll, J., Kostova, E., Tschanter, P., Luejens, C.M., Simoni, M., and Nieschlag, E. 2004, *Hum. Reprod.*, 19, 886.

87. Pryor, J.L., Kent-First, M., Muallem, A., Van Bergen, A.H., Nollen, W.E., Meisner, L., and Roberts, K.P. 1997, *N. Engl. J. Med.*, 336, 534.
88. Warter, S. 1981, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 10, 133.
89. Millet, D., Plachot, M., Lety, M.A., de Grouchy, J., and Netter, A. 1975, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 4, 701.
90. Ford, J. 1977, *Records Adelaide Child. Hosp.*, 1, 287.
91. Dada, R., Gupta, N.P., and Kucheria, K. 2004, *J. Biomed. Tech.*, 15, 176.
92. Dada, R., Gupta, N.P., and Kucheria, K. 2003, *J. Biosci.*, 28, 163.
93. Nakamura, Y., Kitamura, M., Nishimura, K., Koga, M., Kondoh, N., Takeyama, M., Matsumiya, K., and Okuyama, A. 2001, *Int. J. Urol.*, 8, 49.
94. Pandiyan, N., and Jeguer, A.M. 1996, *Hum. Reprod.*, 11, 2604.
95. Bor, P., Hindkjaer, J., Kolvraa, S., and Ingerslev, H.J. 2002, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 19, 224.
96. Dohle, G.R., Halley, D.J.J., Van Hemel, J.O., van den Ouweland, A.M.W., Pieters, M.H.E.C., Weber, R.F.A., and Goovaerts, L.C.P. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 13.
97. van der Ven, K., Montag, M., Peschka, B., Leygraaf, J., Schwanitz, G., Haidl, G., Krebs, D., and van der Ven, H. 1997, *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 699.
98. Quilter, C.R., Svennevik, E.C., Serhal, P., Ralph, D., Bahadur, G., Stanhope, R., Sutterlin, M., Delhanty, J.D.A., and Taylor, K.E. 2003, *Fertil. Steril.*, 79, 301.
99. Cortes-Gutierrez, E.I., Cerda-Flores, R.M., Davila-Rodriguez, M.I., Hernandez-Herrera, R., Vargas-Villarreal, J., and Leal-Garza, C.H. 2004, *Arch. Androl.*, 50, 261.
100. Basaran, S., Engur, A., Aytan, M., Karaman, B., Ghanbari, A., Toksoy, G., Yuksel, A., Cankat, D., Kervancioglu, E., Wolhnik, B., Bahceci, M., and Yuksel-Apak, M. 2004, *Fetal Diagn. Ther.*, 19, 313.
101. Cruger, D.G., Agetholm, I., Byriel, L., Fedder, J., and Bruun-Petersen, G. 2003, *Clin. Genet.*, 64, 198.
102. Lin, Y.M., Chen, C.W., Sun, H.S., Hsu, C.C., Chen, J.M., Lin, S.J., Lin, J.S.N., and Kuo, P.L. 2000, *Urology*, 56, 1041.
103. Oliva, R., Margari, E., Ballesca, J.L., Carrio, A., Sanchez, A., Mila, M., Jimenez, L., Alvarez-Vijande, J.R., and Ballesca, F. 1998, *Fertil. Steril.*, 70, 506.
104. Ambasudhan, R., Singh, K., Agarwal, J.K., Singh, S.K., Khanna, A., Sah, R.K., Singh, I., and Raman, R. 2003, *J. Biosci.*, 28, 605.
105. Nagafuchi, S., Naniki, M., Nakahori, Y., Kondoh, N., Okuyama, A., and Nakagome, Y. 1993, *J. Urol.*, 150, 1155.
106. Stuppia, L., Gatta, V., Calabrese, G., Franchi, P.G., Morizio, E., Bombieri, C., Mingarelli, R., Sforza, V., Frajese, G., Tenaglia, R., and Palka, G. 1998, *Hum. Genet.*, 102, 566.
107. Yoshida, A., Miura, K., and Shirai, M. 1997, *Urol. Int.*, 58, 166.
108. Kremer, J.A.M., Tuerlings, J.H.A.M., Meuleman, E.J.H., Schoute, F., Mariman, E., Smeets, D.F.C.M., Hoefsloot, L.H., Braat, D.D.M., and Merkus, H.M.W.M. 1997, *Hum. Reprod.*, 12, 687.
109. Kleinman, S.E., Yogeve, L., Gamzu, R., Hauser, R., Botchan, A., Lessing, J.B., Paz, G., and Yavetz, H. 2005, *Hum. Reprod.*, 14, 33.
110. Tallentire, J.L., Marmor, D., Delafontaine, D., Van den Akker, J., Portnoi, M.F., Le Portier, N., and Roux, C. 1979, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 8, 293.
111. Mendez, H.M.M., Breda, D.J., Souto, C.A.V., and Salzano, F.M. 1982, *J. Génét. Hum.*, 30, 5.
112. Rivas, F., Garcia-Esquivel, L., Diaz, M., Rivera, H., and Cantu, J.M. 1985, *J. Génét. Hum.*, 35, 291.
113. Sulawski, J.M., Dang, T.P., Ferguson, K.A., Ward, S.P., and Ladda, R.L. 1980, *Obstet. Gynecol.*, 55, 469.
114. Lambert, J.C., Ferrari, M., Donzeau, M., and Ayrault, N. 1980, *Rev. Médit. Sci. Méd.*, 5, 139.
115. Faed, M.J.W., Robertson, J., Lamont, M.A., Macintosh, W., Grievy, J., Baxby, K., James, G.B., and Crowder, A.M. 1979, *J. Reprod. Fertil.*, 56, 209.
116. Rao, M.M. and Rao, D.M. 1977, *Fertil. Steril.*, 28, 209.
117. Hendry, W.F., Polani, P.E., Pugh, A.C.B., Sommerville, I.F., and Wallace, D.M. 1976, *Br. J. Urol.*, 47, 899.
118. Skakkebaek, N.E., Bryant, J.I., and Philip, J. 1973, *J. Reprod. Fertil.*, 35, 23.
119. Hulten, M., Solari, A.J., and Skakkebaek, N.E. 1974, *Hereditas*, 78, 105.
120. Ferguson-Smith, M.A., 1976, *Meiosis in the human male*, P.L. Pearson and K.R. Lewis (Eds.), *Chromosomes Today*, Volume 5, Wiley, New York, pp. 33-41.
121. Lamont, M.A., Faed, M.J.W., and Baxley, K. 1981, *J. Clin. Pathol.*, 34, 145.
122. Mitic, M., Micie, S., and Ilie, V. 1981, *Andrologia*, 13, 499.
123. Van Landuyt L., Lissens, W., Stouffs, K., Toumaye, H., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. 2000, *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 291.
124. Girardi, S.K., Mietnik, A., and Schlegel, P.N. 1997, *Hum. Reprod.*, 12, 1635.
125. Najmabadi, H., Huang, V., Yen, P., Subbarao, M.N., Bhasin, D., Banaag, L., Naseeruddin, S., de Kretser, D.M., Baker, H.W.G., McLachlan, R.I., Loveland, K.A., and Bhasin, S. 1996, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1347.
126. Krausz, C., Quintana-Murci, L., Barbaux, S., Siffroi, J.P., Roubia, H., Delafontaine, D., Souleyreau-Therville, N., Arvis, G., Antoine, J.M., Erdel, E., Taar, J.P., Tar, A., Jandrier, E., Plessis, G., Bourgeron, T., Dadoune, J.P., Fellous, M., and McElreavey, K. 1999, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 3606.
127. Osterlund, C., Segersteen, E., Arver, S., and Pousette, A. 2000, *Int. J. Andrology*, 23, 225.
128. Friel, A., Houghton, J.A., Maher, M., Smith, T., Noel, S., Nolan, A., Egan, D., and Glennon, M. 2001, *Int. J. Andrology*, 24, 31.
129. Foresta, C., Ferlin, A., Garolla, A., Rossato, M., Barbaux, S., and De Bortoli, A. 1997, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 1075.
130. Simoni, M., Gromoll, J., Dworniczak, B., Ahsagen, K., Kamischke, A., Carami, C., Meschede, D., Behre, H.M., Horst, J., and Nieschlag, E. 1997, *Fertil. Steril.*, 67, 542.
131. Liow, S.L., Ghadessy, F.J., Ng, S.C., and Yong, E.L. 1998, *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 763.
132. Qureshi, S.J., Ross, A.R., Ma, K., Cooke, H.J., McIntyre, M.A., Chandley, A.C., and Hargreave, T.B. 1996, *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 775.
133. Okutan-Emonts, O., Pehlivan, S., Tavmergen, E., Tavmergen-Goker, E.N., and Ozkinay, F. 2004, *Genet. Counselling*, 15, 199.
134. Vogt, P., Chandley, A.C., Hargreave, T.B., Keil, R., Ma, K., and Sharkey, A. 1992, *Hum. Genet.*, 89, 491.

135. Stuppia, L., Mastropimiano, G., Calabrese, G., Pella, R., Tenaglia, R., and Palka, G. 1996. *Cytogenet. Cell Genet.*, 72, 155.
136. Kim, S.W., Kim, K.D., and Paick, J.S. 1999. *Fertil. Steril.*, 72, 349.
137. Kobayashi, K., Mizuno, K., Hida, A., Komaki, R., Tomita, K., Matsushita, I., Namiki, M., Iwamoto, T., Tamura, S., Minowada, S., Nakahori, Y., and Nakagome, Y. 1994. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1965.
138. Nakahori, Y., Kuroki, Y., Komaki, R., Kondoh, N., Namiki, M., Iwamoto, T., Toda, T., and Kobayashi, K. 1996. *Hum. Res.*, 46, 20.
139. Krausz, C., Bussani Mastellone, C., Granchi, S., MeElreavey, K., Searcelli, G., and Forti, G. 1999. *Hum. Reprod.*, 14, 1717.
140. Tse, J.Y.M., Yeung, W.S.B., Ng, E.H.Y., Cheng, L.N., Zhu, H.B., Teng, X.M., Liu, Y.K., and Ho, P.C. 2002. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 19, 376.
141. Kerr, N.J., Zhang, J., Sin, F.Y.T., Benny, P., and Sin, I.L. 2000. *N. Z. Med. J.*, 113, 468.
142. Tzschach, A., Thamm, B., Imthurn, B., Weber, W., Alexander, H., Glander, H.J., and Froster, U. 2001. *Arch. Androl.*, 47, 167.
143. Krausz, C., Rapert-De Meyts, E., Frydelund-Larsen, L., Quintana-Murci, L., MeElreavey, K., and Skakkebaek, N.E. 2001. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2638.
144. Kato, H., Komori, S., Nakata, Y., Sakata, K., Kanazawa, R.I., Handa, M., Kobayashi, S.I., Koyama, K., and Isojima, S. 2001. *J. Hum. Genet.*, 46, 110.
145. Junjiang, F.U., Luyun, L.I., and Guangxiu, L.U. 2002. *Chinese Med. J.*, 115, 72.
146. Chang, H.S., Yeh, S.D., Wu, C.C., Huang, B.C., Tsai, H.J., and Fang, C.L. 2004. *Asian J. Androl.*, 6, 369.
147. Fujisawa, M., Shirakawa, T., Kanzaki, M., Okada, H., Arakawa, S., and Kamidono, S. 2001. *Fertil. Steril.*, 76, 491.
148. Raicu, F., Popa, L., Apostol, P., Cimponeriu, D., Dan, L., Ilinca, E., Dracea, L.L., Marinescu, B., and Gavrilă, L. 2003. *J. Cell. Mol. Med.*, 7, 43.
149. Madgar, I., Green, L., Kent-First, M., Weissenberg, R., Gershoni-Baruch, R., Goldman, B., and Friedman, E. 2002. *Clin. Genet.*, 62, 203.
150. Clementini, E., Palka, C., Iezzi, I., Stuppia, L., Guanciali Franchi, P., and Tiboni, G.M. 2005. *Hum. Reprod.*, 20, 437.
151. Loginova, I.A., Nagomai, I.I., Shlykova, S.A., Petrova, L.I., Rybakova, M.V., Kuznetsova, T.V., and Baranov, V.S. 2003. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 37, 74.
152. Int' Veld, P.A., Halley, D.J.J., Van Hemel, J.O., Niemeijer, M.F., Dohle, G., and Weber, R.F.A. 1997. *Lancet*, 350, 490.
153. Foresta, C., Garolla, A., Bartoloni, L., Bettella, A., and Ferlin, A. 2005. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 152.
154. Katz, M.G., Chu, B., McLachlan, R., Alexopoulos, N.I., de Kreuser, D.M., and Cran, D.S. 2002. *Mol. Hum. Reprod.*, 8, 589.
155. Foresta, C., Moro, E., Garolla, A., Onisto, M., and Ferlin, A. 1999. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 3660.
156. Stuppia, L., Gatta, V., Mastropimiano, G., Pompetti, F., Calabrese, G., Franchi, P.G., Morizio, E., Mingarelli, R., Nicolai, M., Tenaglia, R., Improta, L., Sforza, V., Bisceglia, S., and Palka, G. 1997. *J. Med. Genet.*, 34, 881.
157. Reijo, R., Alagappan, R.K., Patrizio, P., and Page, D.C. 1996. *Lancet*, 347, 1290.

La première partie développée rapporte l'étude de la ségrégation méiotique chez des patients infertiles dont le caryotype est normal. Nous nous intéresserons exclusivement à des patients présentant une importante tératozoospermie. Nous étudierons également la fragmentation de l'ADN spermatique.

La deuxième partie traite de l'étude de la ségrégation méiotique dans les gamètes de patients dont le caryotype est anormal ainsi que du taux de fragmentation de l'ADN dans les frottis de sperme de ces mêmes patients. Le but est de déterminer si ce taux de fragmentation de l'ADN est corrélé au type d'anomalie de structure ou encore au pourcentage de gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

## **Partie 1 : Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN spermatique chez des patients avec un caryotype lymphocytaire normal mais une très sévère tératozoospermie**

Les analyses cytogénétiques réalisées sur des produits de fausses couches du premier trimestre de grossesse ont montré qu'au moins 60% d'entre elles étaient associées à des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes (Boue & Boue, 1973). De ce fait, nous pouvons nous attendre à ce que les gamètes humains puissent être porteurs de telles anomalies. Il a été montré que les hommes infertiles avec des paramètres spermatiques anormaux ont un taux d'aneuploïdie supérieur à celui trouvé chez les hommes fertiles (Machev *et al.*, 2005; Miharu, 2005). Toutefois, il reste difficile de savoir si ces augmentations sont dues à l'oligozoospermie et/ou à l'asthénozoospermie et/ou à la tératozoospermie.

---

**Article 1 : Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature**

A. Perrin, F. Morel, L. Moy, D. Collet, V. Amice, M. De Braekeleer. *Fertility and Sterility*. 2008, 90(4),1201.e13-1201.e17

---

**Article 2 : Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia**

A. Perrin, N. Louanjli, N. Douet-Guilbert, P. May-Panloup, Y. Ziane, T. Louanjli, M.J. Le Bris., C. Le Roy, N. Guéganic, V. Amice, M. De Braekeleer, F. Morel (soumis à *Human Reproduction*)

---

**Résultats :**

Les études portent sur 11 patients présentant une tératozoospermie très sévère (moins de 19% de formes normales). Huit d'entre eux ont une oligoasthénotératozoospermie et 3 ont une asthénotératozoospermie. Les 4 patients avec un nombre important de gamètes macrocéphales et multiflagellés (Photo 21) ont plus de 99% de leurs spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés pour les chromosomes étudiés. Chez les patients ayant une globozoospermie ou une tératozoospermie due à différentes anomalies (anomalies de la tête, de l'acrosome, du flagelle), les taux d'aneuploïdies sont quelques fois significativement augmentés par rapport au groupe témoin mais de façon très modérée.

Nous avons également étudié, par la technique TUNEL, la fragmentation de l'ADN spermatique chez ces 11 patients. Elle est augmentée, en moyenne, de 12 fois par rapport à notre groupe témoin (14,6% *versus* 1,2%).

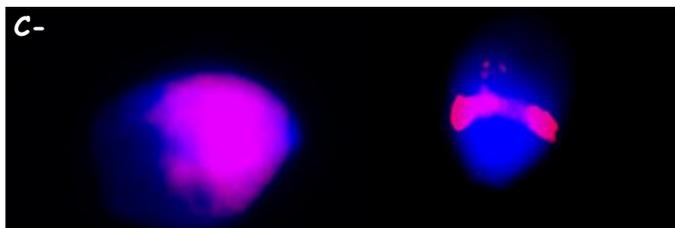
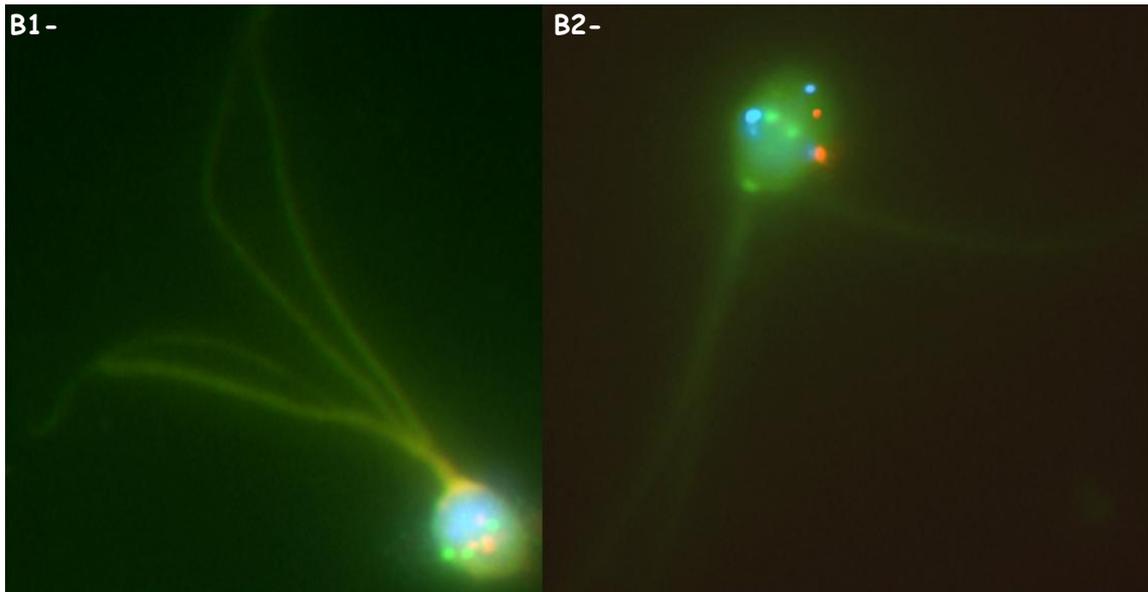
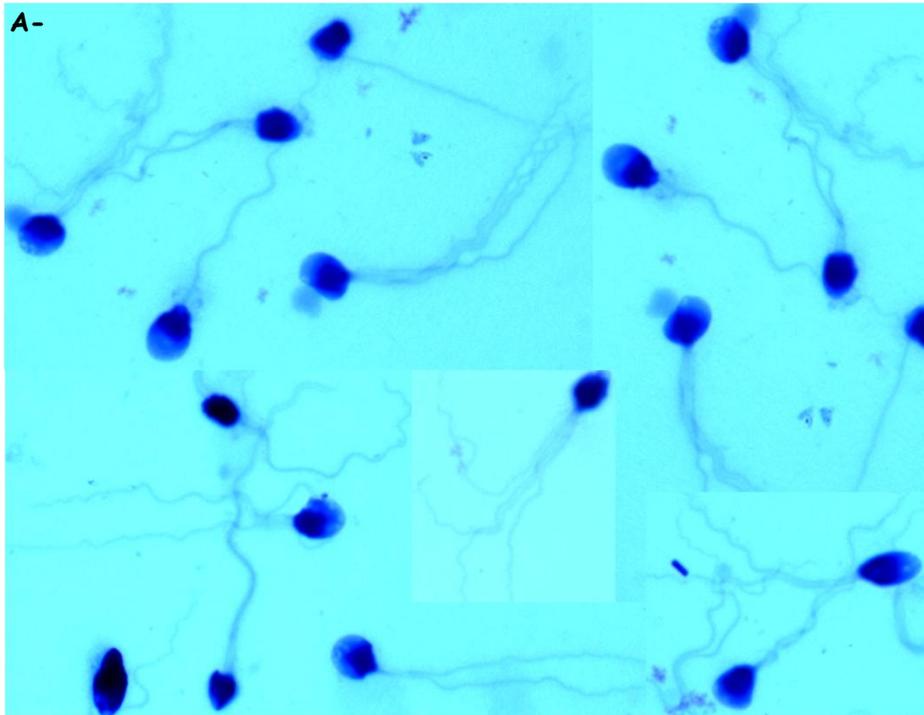


Photo 21 : Spermatozoïdes du patient P1 après coloration au May Grünwald-Giemsa (A-), après FISH (B1- LSI 13q14/21q22, spectrum vert/orange ; B2- CEPX, CEPY et pool de BACs en 18q11.1q11.2 avec respectivement les spectrum vert, orange et aqua) et après TNUEL (C-).

## Discussion :

L'étude de l'équipement chromosomique de ces patients infertiles a consisté en l'analyse des chromosomes 13, 18, 21, X et Y. Ils sont étudiés en diagnostic parce qu'une aneuploïdie de ces derniers est compatible avec l'évolution d'une grossesse et surtout la viabilité d'un fœtus susceptible d'être affecté par des malformations et/ou des retards mentaux sévères (trisomie 13 - syndrome de Patau -, trisomie 18 - syndrome d'Edwards -, trisomie 21 - syndrome de Down), des troubles de la fertilité associés ou non à des troubles psychiques et/ou des difficultés d'apprentissage (monosomie X - syndrome de Turner -, caryotype 47,XXY - syndrome de Klinefelter - , caryotype XYY).

Nous avons montré que la présence d'une tératozoospermie très sévère n'est pas forcément une contre-indication à la tentative d'ICSI. Une tératozoospermie très sévère n'est pas synonyme d'équipement chromosomique déséquilibré. Cependant, les gamètes macrocéphales et multiflagellés ne doivent pas être utilisés en ICSI car ils sont tous chromosomiquement déséquilibrés. Cela a été montré pour les patients ayant 62%, 78%, 83% et 72% de spermatozoïdes macrocéphales avec respectivement 8%, 40%, 39% et 17% de flagelles multiples. Les spermatozoïdes macrocéphales ne peuvent pas être utilisés en ICSI, car ils ne passent pas dans la micropipette utilisée. Nos résultats corroborent le fait que, chez ces patients, mêmes les spermatozoïdes qui ne sont pas macrocéphales, et qui pourraient donc être prélevés et injectés dans un ovocyte, ont un équipement chromosomique déséquilibré (Guthauser *et al.*, 2006; Achard *et al.*, 2007). Pour les patients qui n'ont pas ce type bien particulier de tératozoospermie, le recours à l'ICSI est tout à fait possible. Néanmoins, ces patients ont un risque d'avoir un ADN spermatique fragmenté.

Ainsi, les échecs d'AMP peuvent s'expliquer par le fort taux de gamètes déséquilibrés pour certains patients. Pour d'autres, ce pourrait être la fragmentation de l'ADN spermatique.

Nous recommandons de réaliser, en diagnostic, à la fois une FISH et une analyse de la fragmentation chez les patients présentant une très sévère tératozoospermie.

## Article 1

Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report  
and review of the literature

# Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature

Aurore Perrin, M.Sc.,<sup>a</sup> Frédéric Morel, Ph.D.,<sup>a,b</sup> Ludovic Moy, M.D.,<sup>c</sup> Daniel Colleu, M.D.,<sup>c</sup> Véronique Amice, M.D.,<sup>b</sup> and Marc De Braekeleer, M.D., Ph.D.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest; <sup>b</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire, Morvan, Brest; and <sup>c</sup>Clinique de la Sagesse, Rennes, France

**Objective:** To determine the meiotic segregation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa.

**Design:** Analysis of sperm nuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH).

**Setting:** University hospital.

**Patient(s):** A 34-year-old man with 100% morphologically abnormal spermatozoa.

**Intervention(s):** Dual-color FISH for chromosomes 13 and 21 and triple-color FISH for chromosomes X, Y, and 18 were performed.

**Main Outcome Measure(s):** Aneuploidy rates.

**Result(s):** More than 99% of the spermatozoa had abnormal content for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21. Diploidy, triploidy, and tetraploidy rates were found to be 18.42%, 6.14%, and 33.99% in triple-color FISH and to be 16.09%, 16.28%, and 38.95% in dual-color FISH.

**Conclusion(s):** Our results and those from other investigators show that large-headed, multiple-tailed spermatozoa are associated with a high rate of polyploidy and aneuploidy. Intracytoplasmic sperm injection should not be recommended to those patients, not only because of its low success rate but also because of its high genetic risk. (Fertil Steril® 2008;90:1201.e13–e17. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Aneuploidy, large-headed spermatozoa, multiple-tailed spermatozoa, meiotic segregation, male infertility, FISH

Men with azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia (OAT) have a higher risk of carrying a constitutional chromosomal aberration than do fertile men (1, 2). Furthermore, chromosomal aneuploidies are more frequent in spermatozoa among infertile men with a normal karyotype (1, 3). Several investigators also have reported an association between chromosomal aneuploidies and morphological defects in spermatozoon heads (4–7).

In 1977, Nistal et al. (8) reported on an infertile man in whom a high number of spermatozoa showed low motility and had irregular large heads, with a variable number of tails ( $\leq 4$  flagella). Men presenting with teratozoospermia associated with large heads and multiple-flagella spermatozoa are now considered to have the *macrocephalic sperm head syndrome*, also known as *meiotic division deficiency* (9). This

condition accounts for  $<1\%$  of male infertility, its frequency being estimated at 0.27% (10).

Quantification of the DNA content in four infertile men with large-headed and multiple-tailed spermatozoa revealed a large increase in nuclear volume (11). Several infertile men with large-headed, multiple-tailed spermatozoa have now been reported, and the chromosomal content of their spermatozoa has been analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH). In the present study, we report on our FISH results in a patient with large-headed, multiple-tailed spermatozoa and review the literature.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A couple (34-y-old man and 29-y-old woman) presented with a 4-year history of infertility. Both partners had a normal blood lymphocyte karyotype. An ICSI attempt had been scheduled some months earlier but was canceled because all the spermatozoa were macrocephalic and had multiple tails. Before this study, the patient was informed about the investigations and gave his consent.

Received June 28, 2007; revised and accepted September 10, 2007.

A. P. is the recipient of a doctoral studentship from the Région Bretagne (Rennes, France).

Reprint requests: Marc De Braekeleer, M.D., Ph.D., Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France (FAX: 33-(0)298-01-81-89; E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr).

Sperm concentration and motility were evaluated according to the recommendations of the World Health Organization (12), and sperm morphology was evaluated by strict criteria (13). The characteristics of sperm examination are given in Table 1. The multiple anomalies index (the total number of anomalies divided by over the total number of abnormal spermatozoa) was 2.3 (normal value, 1.6) (14).

### Analysis of Aneuploidy

The sperm sample was washed in phosphate-buffered saline, and 20  $\mu$ L of sperm was dropped and fixed on a slide with Carnoy's solution (methanol-acetic acid; 3:1, vol/vol). The sperm nuclei were partially decondensed for 3 minutes by using a solution of NaOH (1 mol/L), then they were washed in 2 $\times$  SSC for 10 minutes.

The sperm sample was analyzed by using dual FISH (chromosomes 13 and 21) with a specific cocktail probe of 13q14 and 21q22 (Abbott, Rungis, France) and by using triple FISH (chromosomes X, Y, and 18) with specific aliphoid probes of the X chromosome (probe DXZ1, spectrum green; Abbott), Y chromosome (probe DYZ3, spectrum orange; Abbott), and chromosome 18 (D18Z1, spectrum aqua; Abbott).

Before hybridization, the sperm DNA slides were immersed in a jar of 2 $\times$  SSC-0.4% NP40 solution for 30 minutes at 37°C and then were passed through an ethanol series of increasing concentrations before being allowed to air dry.

The denaturation was performed simultaneously on sperm nuclei and probes for 1 minute at 72°C. The slides were incubated overnight at 37°C. Posthybridization washes included 40 seconds in 0.4 $\times$  SSC-0.3% NP40 at 72°C, followed by 15 seconds in 2 $\times$  SSC-0.1% NP40 at room temperature.

The slides were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole and observed by using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Le Pecq, France), with the appropriate set of

filters. Subsequent image acquisition was performed by using a CCD camera with Isis (In Situ Imaging System; MetaSystems, Altlusheim, Germany) (15-18).

### RESULTS

Table 2 shows the results of the meiotic segregation study. A total of 2,156 spermatozoa could be analyzed, 1,124 in triple-color FISH and 1,032 in dual-color FISH. When dual FISH (13, 21) and triple FISH (X, Y, 18) were used, only 1.07% and 0.71% of the spermatozoa were found to have normal chromosomal content, respectively.

More than 99% of the spermatozoa had abnormal content for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21. Diploidy, triploidy,

**TABLE 2**  
Results of sperm aneuploidy in a patient with large-headed multiple-tailed spermatozoa.

Parameter	Frequency (%)
X-18 <sup>a</sup>	0.62
Y-18 <sup>a</sup>	0.09
X-Y-18-18	13.17
X-X-18-18	3.11
Y-Y-18-18	2.14
X-X-Y-18-18-18	3.29
X-Y-Y-18-18-18	2.85
X-X-Y-Y-18-18-18-18	33.99
X-X-Y-Y-18-18	7.03
X-Y-18	5.69
X-X-Y-18-18	4.8
X-Y-Y-18-18	3.74
X-X-Y-18	3.47
X-Y-18-18-18	3.11
X-Y-Y-18	2.05
X-Y-18-18-18-18	1.96
X-X-Y-Y-18-18-18	1.96
X-X-Y-Y-18	1.69
X-18-18	1.16
Others	4.08
13-21 <sup>a</sup>	1.07
13-13-21-21	16.09
13-13-13-21-21-21	16.28
13-13-13-13-21-21-21-21	38.95
13-13-13-21-21-21-21	5.62
13-13-21-21-21-21	4.55
13-13-13-13-21-21-21	3.49
13-13-21-21-21	2.71
13-13-13-21-21	2.52
13-13-13-13-21-21	2.62
13-21-21	1.07
Others	5.03

<sup>a</sup> Normal.

Perrin. Aneuploidy in large-headed spermatozoa. Fertil Steril 2008.

**TABLE 1**  
Light-microscope characteristics of sperm examination.

Characteristic	Data
Volume (mL)	9
Concentration (per mL)	2.8 $\times$ 10 <sup>6</sup>
Abnormal forms (%)	100
Vital spermatozoa (%)	40
Progressively motile (%)	0
Shaking (%)	13
Abnormal acrosome (%)	42
Macrocephalic forms (%)	62
Abnormal flagella (%)	54
Cytoplasmic droplets in midpiece (%)	22

Perrin. Aneuploidy in large-headed spermatozoa. Fertil Steril 2008.

and tetraploidy rates were found to be 18.42%, 6.14%, and 33.99% in triple-color FISH and to be 16.09%, 16.28%, and 38.95% in dual-color FISH.

## DISCUSSION

Abnormal sperm morphology is classified as defects in the head, midpiece, or tail of the spermatozoon (12). No relationship was found between the rates of morphologically and chromosomally abnormal spermatozoa in studies using the human sperm–hamster oocyte fusion model (19). However, the results could have been biased by a decreased fertilizing capacity of the morphologically abnormal spermatozoa. After human sperm injection into mouse oocytes, Lee et al. found in 1996 (5) that some head morphological defects could be associated with chromosomal abnormalities. Using FISH, several investigators found no association between the frequency of morphologically and chromosomally abnormal sperm (6, 20–22), except in one specific condition. Indeed, high frequencies of aneuploid and polyploid sperm have been found in men with teratozoospermia that is caused by large-headed, multiple-tailed sperm.

In 1996, Yurov et al. (23) found in an infertile man that 40% of his spermatozoa were large headed. They found that the majority of these macrocephalic spermatozoa contained a diploid chromosomal content, whereas the majority of normal-sized spermatozoa had a haploid content. In 1997, In't Veld et al. (24) reported a man with OAT whose spermatozoa had a large head, one to three tails, and no acrosomal cap. Virtually all his sperm cells had chromosomal abnormalities, with 40% diploidy and 24% triploidy.

High rates of aneuploidy and diploidy (40% and 30%, respectively) were seen in spermatozoa with enlarged heads and two tails, from six men (25). Semen analysis of an infertile man showed severe teratozoospermia associated with head and tail malformations in 100% of the spermatozoa, including 70% of large-headed forms (26). On the basis of a three-color FISH, the rate of aneuploidy was found to be 99.2%, including 19.4% diploidy and 10.2% triploidy (26).

In 2000, Viville et al. (6) assessed the sperm chromosomal status of four men presenting with 100% teratozoospermia. One of them had 64% macrocephalic spermatozoa that had multiple flagella. Some 90% of the spermatozoa analyzed were aneuploid (67%) or diploid (22%) (6). A patient with OAT was found to have 100% large-headed spermatozoa, with 72% carrying multiple tails and 38% having an irregular acrosomal cap. Three-color FISH showed 21.6% of the sperm cells to be diploid, 62.4% to be triploid, 13.3% to be tetraploid, and 2.7% to be hyperploid ( $>4n$ ) (27). In 2002, Devillard et al. (28) analyzed the sperm chromosomal content of three men with  $>95\%$  large-headed, multiple-tailed spermatozoa. On the basis of several FISH studies, those investigators concluded that nearly all the sperm were aneuploid, with a high rate of triploid and tetraploid sperm.

In 2003, Vicari et al. (29) analyzed the sperm chromosomal content of three teratozoospermic men with 100% morphologically abnormal forms, including 19% to 54% large-headed spermatozoa, by using dual-color and triple-color FISH. All three men had a higher sperm aneuploidy rate compared with normal control men. Furthermore, those investigators found a relationship between the aneuploidy rate and the rate of large-headed spermatozoa (29).

The incidence of sperm chromosomal aneuploidy was assessed by three-color FISH in three men with total teratozoospermia that was caused by a high frequency of double-headed sperm (24%–31%), large-headed sperm (54%–76%), multiple tails (49%–76%), and acrosomal cap defects (72%–80%) (30). The proportion of sperm with disomy, trisomy, and tetrasomy for chromosome 18 and the sex chromosomes was found to be between 76% and 100% (30). Large-headed and multiple-tailed spermatozoa were observed in almost 100% of sperm from a man with total teratozoospermia (31). After dual-color (chromosomes 13 and 21) and triple-color (chromosome 18 and sex chromosomes) FISH analysis, nearly all of the sperm cells were found to be chromosomally abnormal, including 10% that were diploid, 17% that were triploid, and 18% that were tetraploid (31).

In 2006, Guthausen et al. (32) used three-color FISH (X, Y, 18) to analyze the chromosomal sperm content in two teratozoospermic men who were showing 82% and 91% of macrocephalic spermatozoa. All spermatozoa from both men studied were diploid or polyploid. The few spermatozoa ( $<0.2\%$ ) with normal head size that were compatible with aspiration in an intracytoplasmic sperm injection pipette were selected for FISH analysis. Only 1 of the 28 selected spermatozoa for patient 1 and 5 of the 51 for patient 2 were found to have a normal haploid chromosomal content for the three chromosomes investigated (32).

In 2007, Achard et al. (33) used dual-color and triple-color FISH to analyze the sperm chromosomal content of four oligoasthenozoospermic men with a sperm subpopulation that varied from 19% to 50% large-headed spermatozoa. All four men had a higher sperm polyploidy and aneuploidy rate compared with normal control men, varying from 25.6% to 71.7%. Furthermore, those investigators found a population of apparently normal-sized spermatozoa to be aneuploid (33).

Large-headed spermatozoa can arise as a result of division failure during meiosis I or II and/or cytokinesis defect (34). Because several nuclei are seen in the macrocephalic spermatozoa that is studied by electron microscopy, a disturbance of meiosis I and/or II could explain the large head size (11, 27, 28). Indeed, it has been shown that spermatid differentiation can occur despite meiotic division abnormalities and can result in large-headed, multiple-tailed spermatozoa, leading to diploid and/or tetraploid chromosomal content (35, 36). Cytokinesis failure also could result in large-headed spermatozoa, which may explain the high frequency of triploid spermatozoa that has been observed in some patients (26, 27).

Our results are consistent with the hypothesis that a chromosomal segregation defect during meiosis I and II is associated with a cytokinesis failure. Indeed, high rates of diploid, triploid, and tetraploid spermatozoa were found in both dual- and triple-FISH experiments.

Rates of diploidy, triploidy, and tetraploidy vary among patients and publications. Although technical differences in the experimental setup could explain these results, differences in genetic background also could account for these findings. It is likely that different causes underlie this phenotype. Indeed, meiosis and spermatogenesis are two very complex processes involving numerous genes (9).

The genetic basis of meiotic division syndrome has been approached by studying *Drosophila* male sterile mutants (9, 37–39) and knockout mice presenting anomalies of spermatogenesis associated with infertility (40–43).

However, until recently, studies that explored candidate genes in human beings yielded negative or inconclusive results. In 2007, Dieterich et al. (44) reported a genome-wide microsatellite scan of 14 men with large-headed spermatozoa, 4 of whom were born from first-degree cousins. A homozygous mutation consisting of a cytosine deletion in exon 3 of the gene encoding aurora kinase C (*AURKC*) was identified in all 14 patients. Triple-color FISH (chromosomes 18, X, and Y) performed on spermatozoa from five *AURKC*-deficient patients showed that only 8% of the spermatozoa analyzed had a haploid content. It was hypothesized that *AURKC* deficiency impaired chromosomal segregation and that these spermatozoa then experienced cytokinesis failure (44).

Tasdemir et al. (45) and Kahraman et al. (46) showed that although ICSI could be the sole approach that would overcome the infertility caused by teratozoospermia that is associated with 100% abnormal head morphology, the implantation and ongoing pregnancy rates were very low.

However, ICSI should not be recommended to patients presenting large-headed spermatozoa, not only because of its low success rate but also because of its high genetic risk (6, 24, 28–32). Furthermore, patients who have OAT with a subpopulation of large-headed spermatozoa should have their sperm chromosomal content determined to investigate whether they have a higher rate of sperm aneuploidy and, therefore, are at an increased risk of having implantation failure or a chromosomally abnormal embryo.

## REFERENCES

- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245–50.
- De Braekeleer M, Perrin A, Morel F. Chromosomal abnormalities in male infertility. In: De Braekeleer M, ed. *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006:27–52.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, et al. Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M, ed. *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006:53–112.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996;28:167–75.
- Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 1996;11:1942–6.
- Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? *Hum Reprod* 2000;15:2563–6.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4:1–5.
- Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977;26:111–8.
- Escalier D. Genetic approach to male meiotic division deficiency: the human macronuclear spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1–7.
- Achard V, Guichaoua MR. Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales polyflagelles et assistance médicale à la procréation. *Andrologie* 2005;15:185–8.
- Escalier D. Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Biol Cell* 1983;48:65–74.
- World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118–23.
- Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988;11:379–94.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, et al. Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004;81:682–5.
- Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, et al. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;28:372–9.
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136–41.
- Morel F, Bernicot I, Herry A, Le Bris MJ, Amice J, Parent P, et al. An increased incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 2003;79:126–8.
- Martin RH, Rademaker A. The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mutat Res* 1988;207:159–64.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, et al. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999;105:266–72.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351–65.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004;19:2052–9.
- Yurov YB, Saias MJ, Vorsanova SG, Erny R, Soloviev IV, Sharonin VO, et al. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996;2:665–8.
- In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 1997;12:752–4.
- Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998;13:3406–13.

26. Weissenberg R, Aviram A, Golan R, Lewin LM, Levron J, Madgar I, et al. Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod* 1998;4:61–6.
27. Benzacken B, Gavelle FM, Martin-Pont B, Dupuy O, Lievre N, Hugues JN, et al. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure. *Hum Reprod* 2001;16:2646–51.
28. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002;17:1292–8.
29. Vicari E, De Palma A, Burrello N, Longo G, Grazioso C, Barone N, et al. Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl* 2003;24:598–603.
30. Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003;79:212–5.
31. Mateu E, Rodrigo L, Prados N, Gil-Salom M, Remohi J, Pellicer A, et al. High incidence of chromosomal abnormalities in large-headed and multiple-tailed spermatozoa. *J Androl* 2006;27:6–10.
32. Guthauser B, Vialard F, Dakouane M, Izard V, Albert M, Selva J. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril* 2006;85:750.e5–7.
33. Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Mercier G, Porcu G, Saias-Magnan J, Metzler-Guillemain C, et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. *J Androl* 2007;28:600–6.
34. Escalier D, Bermudez D, Gallo JM, Viellefond A, Schrevel J. Cytoplasmic events in human meiotic arrest as revealed by immunolabelling of spermatocyte proacrosin. *Differentiation* 2002;51:233–43.
35. Mori C, Allen JW, Dix DJ, Nakamura N, Fujioka M, Toshimori K, et al. Completion of meiosis is not always required for acrosome formation in *HSP70-2* null mice. *Biol Reprod* 1999;61:813–22.
36. Escalier D. What are the germ cell phenotypes from infertile men telling us about spermatogenesis? *Histol Histopathol* 1999;14:959–71.
37. Maines J, Wasserman S. Regulation and execution of meiosis in *Drosophila* males. *Curr Top Dev Biol* 1998;37:301–32.
38. Fuller MT. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9:433–44.
39. Hackstein JHP, Hochstenbach R, Pearson PL. Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends Genet* 2000;16:565–72.
40. Grootegoed JA, Baarends WM, Roest HP, Hoeijmakers JHJ. Knockout mouse model and gametogenic failure. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:161–6.
41. Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. Male infertility genetics—the future. *J Androl* 2001;22:738–46.
42. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002;(Suppl 4):s41–9.
43. Escalier D. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* 2006;12:449–61.
44. Dieterich K, Rifo RS, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007;39:661–5.
45. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Kahraman S, Biberoglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 1997;12:1214–7.
46. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sozen E, Can B, et al. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:726–30.

## Article 2

Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia



Draft Manuscript For Review. Reviewers should submit their review at <http://mc.manuscriptcentral.com/humrep>

**STUDY OF ANEUPLOIDY AND DNA FRAGMENTATION IN GAMETES OF PATIENTS WITH SEVERE TERATOZOOSPERMIA.**

Journal:	<i>Human Reproduction</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Articles
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Perrin, Aurore; Faculte de Medecine, Laboratoire de cytogenetique Louanjli, N.; LABOMAC Douet-Guilbert, N; Laboratoire de Cytogenetique, Faculte de medecine May-Panloup, P.; CHU Angers Ziane, Y.; LABOMAC Louanjli, T.; LABOMAC Le Bris, ML; Faculte de Medecine, Laboratoire de cytogenetique Le Roy, C; CHU Brest Guéganic, N.; Laboratoire de Cytogenetique, Faculte de medecine Amice, V; CHU Morvan, service de cytogénétique de Braekeleer, Marc; Laboratoire de cytogenetique, Faculte de Medecine Morel, Frederic; Laboratoire de Cytogenetique, Faculte de medecine
Keywords:	ANEUPLOIDY, DNA DAMAGE, MALE INFERTILITY
Specialty:	Infertility



**STUDY OF ANEUPLOIDY AND DNA FRAGMENTATION IN GAMETES OF  
PATIENTS WITH SEVERE TERATOZOOSPERMIA**

**Perrin A.<sup>1,2</sup>, Louanjli N.<sup>3</sup>, Douet-Guilbert N.<sup>1,2,4</sup>, May-Panloup P.<sup>5</sup>, Ziane Y.<sup>3</sup>, Louanjli T.<sup>3</sup>, Le Bris M.J.<sup>4</sup>, Le Roy C.<sup>4</sup>, Gueganic N.<sup>1</sup>, Amice V.<sup>4</sup>, De Braekeleer M.<sup>1,2,4</sup>, Morel F.<sup>1,2,4</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Brest, Brest, France.

<sup>2</sup> INSERM U613, Brest.

<sup>3</sup> Biologie Médicale et Biologie de la Reproduction, LABOMAC, Casablanca, Maroc.

<sup>4</sup> Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHU Brest, Brest.

<sup>5</sup> Laboratoire de Fécondation In Vitro, CHU Angers, Angers, France.

**Corresponding author:** Pr Marc De Braekeleer  
Laboratoire de Cytogénétique  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
Université de Bretagne Occidentale  
22, avenue Camille Desmoulins  
CS 93837  
F-29238 Brest cedex 3  
France

Phone: + 33 (0)298 01 64 76  
Fax: + 33 (0)298 01 81 89  
E-mail: [marc.debraekeleer@univ-brest.fr](mailto:marc.debraekeleer@univ-brest.fr)

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Sperm aneuploidy is frequent in infertile men whose sperm parameters are poor. The use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) can help these men. Some authors found an association between sperm morphology and the frequency of sperm chromosomal and others did not. Moreover, the presence of spermatozoa with DNA fragmentation in ejaculates of infertile men is more frequent than in fertile controls. The aims of our study were to study meiotic segregation in ejaculated sperm to determine if severe teratozoospermia should prevent the use of ICSI due to a high production of spermatozoa with chromosomal aneuploidy and to study DNA fragmentation of gametes in order to determine if DNA integrity was worst in patients with severe teratozoospermia.

**METHODS:** We included 10 infertile males with less than 19% with normal morphological sperm. The analysis of aneuploidy was realized by FISH (13q14/21q22 and chromosomes X, Y and 18) and DNA fragmentation using the TUNEL assay.

**RESULTS:** We have found 0.47 to 100% of gametes with abnormal chromosomal equipment depending upon the type of teratozoospermia. The TUNEL assay showed that patients with severe teratozoospermia had a rate of DNA fragmentation 12 times higher than control men (14.6% *versus* 1.2%).

**CONCLUSIONS:** Sperm morphology is not a good predictor of chromosomal equipment. Depending upon the patients, infertility could be explained by an abnormal chromosomal equipment and/or by an increased rate of DNA fragmentation. So, we recommend to evaluate the rate of aneuploidy and of DNA fragmentation in the gametes of patients with severe teratozoospermia.

## **KEY WORDS**

Teratozoospermia – DNA fragmentation – aneuploidy

## INTRODUCTION

Sperm aneuploidy is frequent in the male infertile population in which sperm parameters are poor, in comparison to the general population (De Braekeleer and Dao 1991; Vialard et al. 2008). Defects in spermatogenesis are known to be associated with meiotic disturbances. Infertile patients with severe spermogram abnormalities can still procreate thanks to *in vitro* fecundation (IVF) methods using an intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The subjective choice of the gamete for microinjection is made with respect to its motility and morphology. However, these criteria cannot exclude the presence of a chromosomal abnormality. One might expect that a change in chromosome content could be associated with morphological defects in sperm heads (Lee et al. 1996; Sun et al. 2006). Still, some authors found no significant association between sperm morphology and sperm chromosomal aneuploidy (Rives et al. 1999; Vegetti et al. 2000).

DNA damage, particularly in the form of DNA fragmentation, appears to be one of the main causes of male infertility in natural as well as in assisted conception (Avendano et al. 2009b). Indeed, the presence of spermatozoa with DNA fragmentation in ejaculates of infertile men is more frequent than in fertile controls (Tarozzi et al. 2007).

Our study concerns infertile patients with severe teratozoospermia. On the one hand, we studied meiotic segregation in ejaculated sperm to determine if severe teratozoospermia should prevent the use of ICSI due to a high production of spermatozoa with chromosomal aneuploidies. On the other hand, we analyzed DNA fragmentation in gametes in order to determine if DNA integrity was worst in patients with severe teratozoospermia compared to a fertile group.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

Ten infertile males (one from the Ivory Coast, two from Turkey and seven from Morocco) were included in the study. They were referred because of a two-year or more infertility history. Sperm concentration and motility were evaluated according to the World Health Organization recommendations; sperm morphology was evaluated using strict criteria (David et al. 1975; World Health Organization 1999). Fertile men served as control subjects. The characteristics of the controls were described in previously published reports (Douet-Guilbert et al. 2005; Perrin et al. 2008a). All the patients were informed about the investigations and gave their consent before this study.

### **Aneuploidy analysis**

The sperm samples were analyzed using dual FISH with a specific cocktail probe of 13q14/21q22 (spectrum green/spectrum orange, respectively) (Kreatech, Strasbourg, France) and triple FISH (chromosomes X, Y and 18) with specific alphoid probes of the X chromosome (DXZ1, spectrum green; Abbott, Rungis, France) and Y chromosome (DYZ3, spectrum orange; Abbott). For chromosome 18, we used a pool of bacterial artificial chromosome (BAC) clones localized in 18q11.1-q11.2 (RP11-96C18, RP11-1035O2, RP11-746M23, RP11-311F3, RP11-446A4, RP11-510P5, RP11-1076F2; UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>). BAC clones were labeled by nick translation with an Aqua fluorochrome (Atto425 Nick Translation, Euromedex, Mundolsheim, France).

The sperm samples were first washed in phosphate-buffered saline solution and sperm was dropped and fixed on a slide with Carnoy's solution. The sperm nuclei were partially decondensed using a solution of NaOH (1 mol/L) and then washed in 2xSSC (Saline Sodium Citrate).

Before hybridization, the sperm DNA slides were immersed in a jar of 2xSSC/0.4% NP40 solution and passed through an ethanol series of increasing concentrations (70°/90°/100°) before being allowed to air-dry. Denaturation was performed simultaneously on sperm nuclei and probes for 1 minute at 70°C. After an incubation overnight at 37°C, the slides were washed in 0.4xSSC/0.3% NP40 then in 2xSSC/0.1% NP40. The slides were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and observed using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (In Situ Imaging System; MetaSystems, Altussheim, Germany), as previously described (Perrin et al. 2008b). The analysis was realized using strict selection criteria (Morel et al. 2000).

#### **Analysis of DNA fragmentation using the TUNEL assay**

Briefly, the slides were immersed in a jar containing a 2xSSC/0.4% NP40 solution and then immediately passed through an ethanol series of increasing concentrations. Sperm DNA fragmentation was detected by the ApopTag Red Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, equilibration buffer was put on the slides, and a mix of reaction buffer and terminal deoxyribonucleotidyl transferase was added. The slides were incubated in a dark humidified chamber at 37°C. They were then incubated in a Stop/Wash Buffer and washed with 1xPBS (phosphate buffered saline). A mix of blocking

solution and antidigoxigenin-rhodamine was added to the slides before incubation at 37°C. The slides were washed in 1xPBS. They were air-dried and counterstained with DAPI. The slides were analyzed using a Zeiss AxioPlan Microscope. Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with in situ imaging system. Only spermatozoa with a flagellum were counted. A total of 500 sperm heads of each sample was analyzed. A spermatozoon was considered to contain either normal (blue fluorescence) or fragmented (partial or total red fluorescence) DNA (Perrin et al. 2008a).

### **Statistical analyses**

Data statistical analysis was carried out using the SPSS 15.0 program (SPSS, Paris, France). Values were compared by a Chi<sup>2</sup> test. A P value of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant.

## **RESULTS**

### **Patients' characteristics**

For each patient, the semen sample showed severe teratozoospermia (with at least 80% of morphologically abnormal spermatozoa). The characteristics of sperm examination are given in table 1. Eight patients had oligoasthenoteratozoospermia and two asthenoteratozoospermia. Sperm concentration varied from 0.7 to  $75 \times 10^6$  per mL. The proportion of viable spermatozoa was found to be included between 47 and 75%, progressive motility between 0 and 22% and abnormal morphology between 81 and 100%.

The characteristics of teratozoospermia are given in table 2. Patients P1, P2 and P3 had a majority of macrocephalic forms (78%, 83% and 72% respectively) with double flagella (30%, 27% and 10% respectively) and even more (10%, 12% and 7% respectively). Patient P4 had 88% of microcephalic forms and 100% spermatozoa with abnormal acrosome. This patient had globozoospermia. He had no gametes with two or more flagella. For patients P5 to P10, the majority of abnormalities concerned sperm heads. The proportion of macrocephalic forms was found to vary from 0 to 23% and that of double flagella between 0 and 4%. These patients had no gametes with more than two flagella.

### **Analysis of aneuploidy**

The aneuploidy study in triple-FISH was done on 576 to 5123 spermatozoa. For dual-FISH, this study was realized on 1000 to 5118 spermatozoa. Tables 3 and 4 show the results for triple-FISH (X, Y and 18) and dual-FISH (13 and 21).

With triple FISH, diploidy, triploidy and tetraploidy rates were found to be 0.99%, 18.12% and 44.55% for patient P1, 4.52%, 9.99% and 35.65% for patient P2, and 3.47%, 18.23% and 43.23% for patient P3. With dual FISH, diploidy, triploidy and tetraploidy rates were found to be 2.37%, 18.5% and 48.95% for P1, 2.01%, 13.34% and 41.39% for P2, and 4.38%, 14.69%, 41.15% for P3. More than 99% of the spermatozoa of patients P1, P2 and P3 had an abnormal content for chromosomes X, Y, 13, 18 and 21.

A statistically significant increase in disomies 21, X, Y and XY was found for P4 (globozoospermia) compared with the controls.

A significant increase in disomies 18, 21, X, and Y was found for patient P5, in disomy 21 for P7, in disomy 18, 21, XY and diploidy for P8, in disomy 13 and diploidy for P9 and in diploidy for P10. No statistically significant difference in the disomy and diploidy rates was observed for patient P6.

### **Analysis of DNA fragmentation using the TUNEL assay**

The proportion of sperm with DNA fragmentation varied from 4.4% (P2) to 28% (P3), with a mean of  $14.6 \pm 9.03\%$  (Table 5). The rate of DNA fragmentation was significantly higher in the group of infertile patients than in the control group ( $P < 0.001$ ), the mean DNA fragmentation percentage among the control men being  $1.20 \pm 0.95\%$ .

## **DISCUSSION**

The objectives of our study were to study aneuploidy and analyze DNA fragmentation in ejaculated sperm of patients with severe teratozoospermia (less than 19% sperm with normal morphology).

For patients P1, P2 and P3, more than 99% of spermatozoa had an abnormal chromosomal content. These results are in accordance with the literature, showing that most of the gametes are chromosomally abnormal among men who have a majority of macrocephalic spermatozoa (Achard et al. 2007; Perrin et al. 2008a; Sun et al. 2006; Viville et al. 2000). Moreover, a few studies also indicate that even apparently normal sized spermatozoa in these men have an abnormal karyotype (Achard et al. 2007; Guthauser et al. 2006). It is evident that the use of ICSI must be forbidden for patients with an abnormal chromosomal equipment in all gametes.

In 2007, Dieterich *et al.* found an homozygous deletion of a single nucleotide (c.144delC) in the aurora kinase C (*AURKc*) coding sequence in patients with gametes having large heads, a variable number of tails and an abnormal chromosomal equipment. This deletion resulted in a truncated protein lacking the kinase domain. This default in turn lead to total cytokinesis failure and to male infertility with production of large-headed multiflagellar polyploidy spermatozoa (Dieterich *et al.* 2007). Moreover, in 2009, they showed that 34 patients with at least 95% of abnormal forms and an average of 80% of large-headed spermatozoa had the c.144delC mutation except for two patients who were compound heterozygotes for c.144delC mutation and a new mutation in exon 6 (c.686G>C). This new mutation was responsible for the replacement of a cystine by a tyrosine (p.Cys229Tyr) (Dieterich *et al.* 2009). Furthermore, no mutation was found in 28 patients with a moderate phenotype and 5 to 75% of large-headed gametes (Dieterich *et al.*,2009). They estimated the prevalence of infertility by large-headed gametes in North Africans to be 1 in 10 000 males (Dieterich *et al.* 2009). Unfortunately, no DNA from patients P1 to P3 was available to sequence the *AURKc* gene.

Globozoospermia is found in less than 0.1% of male infertile patients (Machev *et al.* 2005). Globozoospermia was observed in patient P4, who had a slight increase in disomy for chromosomes X, Y, XY and 21 but not for chromosome 13. These results are in accordance with the literature. In the study of Carrell *et al.* (1999), two patients showed a significant increase in aneuploidy frequency and two did not (Carrell *et al.* 1999). Martin *et al.* (2003) also observed a significant increase in XY disomy (Martin *et al.* 2003) and Morel *et al.* (2004) observed a slight increase in disomy for chromosome 13 and 21 in two patients with globozoospermia (Morel *et al.* 2004). The increase in aneuploidy frequency appears to be

small or nonexistent in patients with globozoospermia. Therefore, it is not an indication against the use of ICSI.

For the other patients (P5 to P10), the aneuploidy rate was slightly increased for some chromosomes, but not for others. Several studies have shown an increased frequency of aneuploidy in spermatozoa of males with a normal karyotype and oligozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia (Calogero et al. 2001;Pang et al. 1999;Pfeffer et al. 1999). Moreover, men carrying a translocation with a normal sperm count do not have an increased rate of sperm aneuploidy (Douet-Guilbert et al. 2005;Pellestor et al. 2001). Only patient P6 had no increase in aneuploidy rate in any of the chromosomes studied, although he had 100% sperm with abnormal morphology, including 91% with an abnormal head.

Some authors stated that sperm morphology could actually predict the outcome of natural or assisted conception, whereas others attempted to improve criteria defining good morphology using high-magnification methods of sperm selection for microinjection (Antinori et al. 2008;Vanderzwalmen et al. 2008). Nagy *et al.* (1995) showed that neither concentration nor morphology influenced ICSI outcome (Nagy et al. 1995). Some authors assumed that sperm morphology did not reflect chromosomal material, so ICSI was possible even if no sperm with normal morphology was found (Sun et al. 2006;Tasdemir et al. 1997).

Our results indicate that sperm morphology is not a good predictor of chromosomal equipment. FISH analysis on gametes is necessary for patients with severe teratozoospermia. The probability of conceiving a child with a chromosomal abnormality following ICSI may not be increased for patients with severe teratozoospermia than for those with OAT integrated in an ICSI program.

DNA fragmentation was observed, on average, in  $14.6 \pm 9.03\%$  of spermatozoa using the TUNEL technique. The rate of DNA fragmentation was significantly higher in our teratozoospermic patients than in the control group. This increase was present whatever the type of teratozoospermia. It has been reported that the rate of sperm DNA fragmentation was higher in infertile men with abnormal sperm parameters than in fertile men (Lopes et al. 1998; Sergerie et al. 2005). Several studies attempted to correlate DNA fragmentation rate with sperm characteristics. It was correlated to necrozoospermia and teratozoospermia but inversely correlated to sperm quality, motility and concentration (Appasamy et al. 2007; Benchaib et al. 2003; Borini et al. 2006; Guerin et al. 2005; Varum et al. 2007). DNA fragmentation was evaluated by TUNEL in a patient with globozoospermia (Vicari et al. 2002). An increased proportion of spermatozoa with DNA fragmentation was found, which was also the case in our patient P4, the proportion being 9.6% compared to 1.2% in controls.

It is consequently possible during ICSI to use a spermatozoon with fragmented DNA to fertilize an oocyte. Sperm DNA fragmentation actually concerns a significant part of the infertile population. Sixteen per cent of the population having repetitive reproductive failures has an increased rate of DNA fragmentation (Guerin et al. 2005). Some studies showed that couples with repeated spontaneous miscarriages had poorer sperm DNA integrity when compared to fertile couples (Lin et al. 2008) and suggested harmful consequences such as fertilization and implantation failures or miscarriages (Aitken and De Iuliis 2007; Benchaib et al. 2007; Tavalae et al. 2009). Avendano *et al.* (2009) demonstrated that spermatozoa with an apparently normal morphology can still exhibit significant DNA fragmentation (Avendano et al. 2009b). They also showed that DNA fragmentation in morphologically normal sperm

negatively impacted embryo quality and probability of pregnancy in ICSI cycles (Avendano et al. 2009a).

Even if most of the gametes have a normal chromosomal equipment, an increase in the rate of DNA fragmentation could explain the infertility problems experienced by our patients. Given our results, we recommend the rates of aneuploidy and DNA fragmentation to be evaluated in the gametes of men with severe teratozoospermia.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A. Perrin is the recipient of a Ph.D. studentship from the “région Bretagne”.

## REFERENCES

Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Mercier G, Porcu G, Saias-Magnan J, Metzler-Guillemain C and Guichaoua MR. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. *J Androl* 2007;**28**:600-606.

Aitken RJ and De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:727-733.

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D and Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:835-841.

Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey AR, Ozturk O, Groome NP, Serhal P and Jauniaux E. Relationship between male reproduction hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:159-165.

Avendano C, Franchi A, Duran H and Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2009a.

Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S and Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009b;**91**:1077-1084.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H and Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;**18**:1023-1028.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B and Francois GJ. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;**87**:93-100.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C and Coticchio G. Sperm DNA fragmentation paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;**21**:2876-2881.

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G and D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001;**16**:1172-1179.

Carrell DT, Emery BR and Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;**71**:511-516.

David G, Bisson JP, Czyglick F and et al. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1975;**4**:17-36.

De Braekeleer M and Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;**6**:245-250.

Dieterich K, Rifo RS, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sele B, Jouk PS et al. Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nature Genet* 2007;**39**:661-665.

Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, Prisant N, Zoghmar A, Guichaoua MR, Koscinski I et al. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 2009;**18**:1301-1309.

Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, De Braekeleer M and Morel F. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;**28**:372-379.

Guerin P, Matillon C, Bleau G, Levy R and Menezo Y. Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome. *Gynécologie Obstétrique Fertilité* 2005;**33**:665-668.

Guthauser B, Vialard F, Dakouane M, Izard V, Albert M and Selva J. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril* 2006;**85**:750.e5-750.e7.

Lee JD, Kamiguchi Y and Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 1996;**11**:1942-1946.

Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, Lu CH, Sun FJ and Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008;**90**:352-359.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J and Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;**69**:528-532.

Machev N, Gosset P and Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:352-357.

Martin RH, Greene C and Rademaker AW. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril* 2003;**79**:1662-1664.

Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, Duban B, Marchetti C, Delobel B, Le Bris MJ, Amice V and De Braekeleer M. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:835-838.

Morel F, Roux C and Bresson JL. Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men by multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:566-570.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P and Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;**10**:1123-1129.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA and Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;**14**:1266-1273.

Pellestor F, Imbert I, Andreo B and Lefort G. Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 2001;**16**:1155-1164.

Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M and Morel F. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2008a.

Perrin A, Morel F, Moy L, Colleu D, Amice V and De Braekeleer M. Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature. *Fertil Steril* 2008b;**90**:1201-1207.

Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S and Kearns WG. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;**72**:472-478.

Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G and Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999;**105**:266-272.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F and Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;**20**:3446-3451.

Sun F, Ko E and Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 2006;**4**:1-5.

Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C and Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:746-757.

Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Kahraman S and Biberoglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 1997;**12**:1214-1217.

Tavalaee M, Razavi S and Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009;**91**:1119-1126.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:617-627.

Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A and Ramalho-Santos J. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007;**87**:572-583.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I and Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;**15**:351-365.

Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, Wainer R, Bergere M, Albert M, Bailly M, de Mazancourt P and Selva J. Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. *J Assist Reprod Genet* 2008;**25**:539-545.

Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R and Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities. *Hum Reprod* 2002;**17**:2128-2133.

Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P and Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? *Hum Reprod* 2000;**15**:2563-2566.

World Health Organization *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. New York, USA: Cambridge University Press, 1999.

**Table 1. Light-microscope characteristics of sperm sample for 10 infertile patients.**

<b>Characteristics</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>
Concentration (x10 <sup>6</sup> per mL)	25	9.8	1.1	75	1.4	2.1	0.8	1.1	0.7	4.8
Progressively motile (%)	5	5	5	10	11	22	5	22	9	0
Abnormal morphology (%)	99	100	99	100	90	100	97	81	88	100
Spermogram	A T	OA T	OA T	AT	OA T	OA T	OA T	OA T	OA T	OA T

O: oligozoospermia, A: asthenozoospermia, T: teratozoospermia

**Table 2. Details of teratozoospermia for 10 infertile patients**

		<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>
Abnormal heads (%)	Total	98	99	94	100	80	91	90	58	71	93
	Macrocephalic forms	78	83	72	3	7	0	23	0	6	0
Multiple flagella (%)	Two flagella	30	27	10	0	4	4	4	0	0	1
	More two flagella	10	12	7	0	0	0	0	0	0	0

**Table 3. Number of analyzed gametes and results of sperm aneuploidy for chromosomes X, Y, 18 in 10 patients with a severe teratozoospermia and in the control group.**

Patients	Nr. of analyzed gametes	X-18	Y-18	Disomy X	Disomy XY	Disomy Y	Disomy 18	Diploidy	Triploidy	Tetraploidy	Others
P1 (%)	1010	0*	0.10*	0	0	0	0.40*	0.99*	18.12*	44.55*	35.84*
P2 (%)	2522	0*	0.08*	0.12	0.71*	0	0.04	4.52*	9.99*	35.65*	48.89*
P3 (%)	576	0*	0*	0	0.52*	0	0	3.47*	18.23*	43.23*	34.55*
P4 (%)	5123	48.35	50.46	0.27*	0.35*	0.23*	0.12	0.14	0	0	0.08
P5 (%)	5071	50.03	48.69	0.38*	0.06	0.21*	0.35*	0.28	0	0	0
P6 (%)	5102	49.98	49.45	0.16	0.04	0.10	0.06	0.21	0	0	0
P7 (%)	1353	48.12	51.15	0.22	0	0.07	0.14	0.30	0	0	0
P8 (%)	1130	46.73	52.12	0.09	0.27*	0	0.27*	0.18	0	0	0.34*
P9 (%)	1021	50.34	48.58	0.10	0	0	0.10	0.39	0	0	0.49*
P10 (%)	1000	49.20	49.60	0.1	0	0.20	0	0.90*	0	0	0
Controls (%)	20874	50.58	48.76	0.09	0.08	0.07	0.06	0.34	0	0	0.02

In bold: normal chromosomal equipment; \*: statistically significant difference compared to the control group

**Table 4. Number of analyzed gametes and results of sperm aneuploidy for chromosomes 13 and 21 in 10 patients with a severe teratozoospermia and in the control group.**

<b>Patients</b>	<b>Nr of analyzed gametes</b>	<b>13-21</b>	<b>Disomy 13</b>	<b>Disomy 21</b>	<b>Diploidy</b>	<b>Triploidy</b>	<b>Tetraploidy</b>	<b>Others</b>
P1 (%)	1097	0.09*	0.09	0.09	2.37*	18.51*	48.95*	29.90*
P2 (%)	2585	0*	0.27	0.40*	2.01*	13.34*	41.39*	42.59*
P3 (%)	1300	0*	0.15	0.31*	4.38*	14.69*	41.15*	39.32*
P4 (%)	5042	98.47	0.08	1.11*	0.12	0	0	0.22*
P5 (%)	5015	99.04	0.24	0.36*	0.36	0	0	0
P6 (%)	5118	99.53	0.14	0.20	0.19	0	0	0
P7 (%)	1117	98.57	0.36	0.80*	0.27	0	0	0
P8 (%)	1042	96.74	0.29	0.38*	0.77*	0	0	1.82*
P9 (%)	1020	97.65	0.39*	0.29	0.98*	0	0	0.69*
P10 (%)	1000	98.90	0.10	0.20	0.40	0	0	0.40*
Controls (%)	18736	99.47	0.14	0.15	0.30	0	0	0

In bold: normal chromosomal equipment; \*: statistically significant difference compared to the control group

**Table 5: Results of DNA fragmentation by the TUNEL assay in spermatozoa from 10 patients with severe teratozoospermia and in the control group.**

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>	<b>Controls</b>
Fragmented nuclei (%)	NT	6.6*	28*	9.6*	8.4*	21.4*	27.5*	15.8*	9.4*	4.4*	1.2

NT: Not tested ; \*: statistically significant increase compared to the control group

*De* : [Marc De Braekeleer](mailto:Marc.De.Braekeleer)

*Date* : 15/07/2009 15:45:35

*A* : [aurore.perrin@univ-brest.fr](mailto:aurore.perrin@univ-brest.fr)

*Sujet* : Fwd: Human Reproduction - Manuscript ID HUMREP-09-0712

>X-Sieve: CMU Sieve 2.3

>X-Virus-Scanned: amavisd-new at univ-brest.fr

>Date: Wed, 15 Jul 2009 09:40:06 -0400 (EDT)

>From: [editorial@humanreproduction.co.uk](mailto:editorial@humanreproduction.co.uk)

>Sender: [onbehalf@scholarone.com](mailto:onbehalf@scholarone.com)

>To: [marc.debraekeleer@univ-brest.fr](mailto:marc.debraekeleer@univ-brest.fr)

>Subject: Human Reproduction - Manuscript ID HUMREP-09-0712

>X-Errors-To: [editorial@humanreproduction.co.uk](mailto:editorial@humanreproduction.co.uk)

>

>15-Jul-2009

>

>Dear Prof. de Braekeleer:

>

>Your manuscript entitled "STUDY OF ANEUPLOIDY AND DNA FRAGMENTATION IN  
>GAMETES OF PATIENTS WITH SEVERE TERATOZOOSPERMIA." has been  
successfully

>submitted online and (where appropriate) will be processed for peer review  
>in Human Reproduction.

>

>Your manuscript ID is HUMREP-09-0712.

>

>Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or  
>when calling the Editorial Office with any queries that may arise. If  
>there are any changes in your contact details or e-mail address, please  
>log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/humrep> and  
>edit your user information as appropriate.

>You can also view the status of your manuscript at any time by checking  
>your "Author Centre"™ after logging in.

>Please note that if your manuscript is accepted for publication in Human  
>Reproduction, you will have the option, at an additional charge, of making  
>your paper freely available online immediately upon publication, under the  
>new "Oxford Open"™ initiative (see  
><http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/about>).

>

>Applicable Oxford Open charges can be found in the Authors'™ Instructions  
>at [http://www.oxfordjournals.org/humrep/for\\_authors/index.html](http://www.oxfordjournals.org/humrep/for_authors/index.html)

>

>

>Thank you for submitting your manuscript to Human Reproduction.

>

>

>Yours sincerely,

>

>Dr Andy Williams

>Managing Editor

>Human Reproduction Editorial Office & [gt;editorial@humanreproduction.co.uk](mailto:editorial@humanreproduction.co.uk)

## **Partie 2 : Ségrégation méiotique chez des patients avec un caryotype lymphocytaire anormal**

### **A- Translocations réciproques équilibrées entre autosomes et ségrégation méiotique chez des patients infertiles**

Les hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée peuvent produire des gamètes avec un déséquilibre chromosomique du fait des modes de ségrégation méiotique particuliers qui se produisent dans les gamètes de ces patients.

---

#### **Article 3 : A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridisation.**

A. Perrin, F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, J. Amice, V. Amice, M. De Braekeleer.  
Andrologia (sous presse)

---

#### **Article 4 : Characterization of a t(2;6) by array-CGH in a couple with recurrent miscarriage: meiotic segregation analysis and implications for assisted reproduction.**

A. Perrin, B. Delobel, J. Andrieux, P. Gosset, N. Guéganic, B. Duban, F. Petit, A. Basinko, M.-J. Le Bris, N. Douet-Guilbert, M. De Braekeleer, F. Morel. (soumis à Fertility and Sterility)

---

#### **Chapitre de livre 2 : Chromosomal abnormalities in spermatozoa.**

F. Morel, N. Douet-Guilbert, A. Perrin, M.-J. Le Bris, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer.  
Cytogenetics and Infertility. Dir : De Braekeleer, M. Transworld Research Network, Trivandrum (India). 2006, 53-112

---

#### **Chapitre de livre 3 : Meiotic segregation of structural chromosomal abnormalities during male gametogenesis using fluorescent *in situ* hybridization.**

A. Perrin, F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer.  
Recent Advances in Human Reproduction. 2008, 1, 11-22

---

## Résultats :

Nous avons étudié la ségrégation méiotique, par FISH, dans les gamètes de 13 patients porteurs de translocations réciproques équilibrées ou apparemment équilibrées en cytogénétique conventionnelle. En fonction de la richesse des éjaculats, entre 546 et 5039 spermatozoïdes ont été analysés par patient. Le taux de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés varie de 34,40% à 49,12%. Ces gamètes sont issus du mode de ségrégation alterne. Ce mode est préférentiel pour la majorité des patients (10/13) puis par ordre décroissant de fréquence, ce sont les modes adjacent I, adjacent II et enfin 3:1. Le patient 46,XY,t(17;19)(q21;p13.3) et le patient 46,XY,t(2;6)(q35;q24) ont des spermatozoïdes préférentiellement issus du mode alterne, puis par ordre décroissant de fréquence, ce sont les modes adjacent I, 3:1 et adjacent II. Chez le patient 46,XY,t(3;8)(q22;q23), les chromosomes ont ségrégué préférentiellement selon le mode adjacent I, suivi des modes alterne, adjacent II et 3:1. Enfin, les gamètes du patient 46,XY,t(4;6)(q34;q16.1) sont issus préférentiellement du mode adjacent I, suivi des modes alterne, 3:1 et adjacent II.

## Discussion :

Le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés varie selon les patients. Sur les 13 patients que nous avons étudiés, il va de 50,88% à 65,60%. Dans la littérature, les taux rapportés varient de 10,77% à 81% (Honda *et al.*, 1999; Geneix *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2004b; Anton *et al.*, 2007; Wiland *et al.*, 2008). Le taux de gamètes déséquilibrés dépend des chromosomes impliqués dans l'anomalie, de la position des points de cassure et de la taille des segments remaniés. De très légères variations de la position des points de cassure ou des microdélétions aux points de cassure ont été évoquées pour expliquer les variations interindividuelles observées chez des patients, sans lien de parenté, ayant apparemment la même translocation réciproque en cytogénétique conventionnelle (Vozdova *et al.*, 2008). En effet, les anomalies chromosomiques de structure mises en évidence peuvent paraître équilibrées en cytogénétique alors qu'une

investigation par CGH-array (comparative genomic hybridization) révèle la présence de microremaniements (exemple du patient 46,XY,t(2;6)(q35;q24)).

De plus, la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde chromosomiquement déséquilibré peut être responsable de l'absence d'implantation de l'embryon formé ou de la formation d'un fœtus non viable, éliminé naturellement par une fausse couche. Cependant, la grossesse peut aller à son terme et aboutir à la naissance d'un enfant avec des malformations et/ou un retard mental, ou devoir être interrompue. Un spermatozoïde déséquilibré du patient 46,XY,t(1;17)(q31;p12) a fécondé un ovocyte normal puisque l'analyse chromosomique de son fœtus a révélé une translocation déséquilibrée (46,XX,der(17)t(1;17)(q31;p12)pat). De plus, le patient 46,XY,t(6;10)(p21;q26), a un garçon viable mais polymalformé. Le caryotype effectué chez l'enfant a révélé une translocation déséquilibrée d'origine paternelle. Il est donc important de déterminer la probabilité d'avoir un fœtus viable. Le site HC Forum<sup>10</sup> a été réalisé notamment pour tenter de répondre à cette question en donnant un risque statistique.

La comparaison de nos données avec celles obtenues par le site web a montré de nombreux résultats discordants. En effet, le site emploie une méthode statistique afin d'évaluer la probabilité des différents modes de ségrégation alors que les analyses FISH ne sont pas des prédictions statistiques mais le reflet de la réalité.

Les analyses réalisées en FISH permettent de quantifier les différents déséquilibres chromosomiques. Une étude de 2003, chez des hommes porteurs d'anomalies de structure, montre qu'au-delà de 65% de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, la probabilité d'obtenir une grossesse après ICSI est nettement diminuée (Escudero *et al.*, 2003).

Ainsi, des analyses permettent d'offrir une évaluation personnalisée des risques encourus par la descendance. Il peut être, par exemple, discuté avec les couples d'un éventuel recours au diagnostic préimplantatoire

<sup>10</sup> :<https://hcforum.imag.fr>

Toutefois, le recours au DPI peut parfois soulever d'importantes questions. En effet, le cas du patient avec la translocation réciproque  $t(2;6)$  a nécessité une réflexion indispensable quant à la stratégie devant être employée pour la sélection des embryons à transférer. En effet, le père présente une translocation réciproque associée à des microdélétions et à un phénotype normal alors que son enfant, porteur de la même anomalie de structure, présente une dysharmonie du développement. La question de savoir s'il est nécessaire de ne sélectionner que les embryons normaux au détriment de ceux porteurs de la translocation associée aux microdélétions a suscité de nombreuses réflexions. Cependant, la pathogénicité des microdélétions n'étant pas prouvée et l'enquête familiale orientant davantage vers une variation du matériel génétique sans conséquence phénotypique, il a été décidé avec le couple, de ne pas faire de sélection entre les embryons normaux et ceux porteurs de la translocation/délétion.

## Article 3

A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridisation

# 2 **A study of meiotic segregation of chromosomes** 3 **in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent** 4 ***in situ* hybridisation**

5 A. Perrin<sup>1,2</sup>, F. Morel<sup>1,2,3</sup>, N. Douet-Guilbert<sup>1,2,3</sup>, M.-J. Le Bris<sup>3</sup>, J. Amice<sup>1,3</sup>, V. Amice<sup>3</sup>  
6 & M. De Braekeleer<sup>1,2,3</sup>

7 1 Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale,  
8 Brest, France;

9 2 INSERM U613, Brest, France;

10 3 Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHU Brest, Brest

## 11 **Keywords**

12 FISH—male infertility—meiotic segregation—  
13 reciprocal translocation—Robertsonian  
14 translocation

## 15 **Correspondence**

16 Pr Marc De Braekeleer, Laboratoire de  
17 Cytogénétique, Faculté de Médecine et des  
18 Sciences de la Santé, Université de Bretagne  
19 Occidentale, 22, avenue Camille Desmoulins,  
20 CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France.  
21 Tel.: +33 (0)298 01 64 76;  
22 Fax: +33 (0)298 01 81 89;  
23 E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

24 Accepted: March 30, 2009

## 25 **Summary**

26 In the infertile male population, there is a 2–20-time higher probability of hav-  
27 ing a structural chromosomal abnormality than in general population. Gener-  
28 ally, these men have a normal phenotype but they can have sperm  
29 abnormalities. As they can produce a variable proportion of unbalanced  
30 gametes, it is important to evaluate the percentage of unbalanced chromosomal  
31 spermatozoa to assess the risk of injecting a chromosomally unbalanced gamete  
32 during ICSI procedure. We report here the meiotic segregation analysis of  
33 chromosomes in spermatozoa of 12 men with a balanced reciprocal transloca-  
34 tion and 4 men with a Robertsonian translocation using a Fluorescent *in situ*  
35 Hybridisation analysis. The frequencies of normal or balanced spermatozoa  
36 ranged from 34.4% to 49.1% in balanced reciprocal translocation carriers. For  
37 Robertsonian translocation, the frequencies of normal or balanced spermatozoa  
38 ranged from 78.4% to 91.2%. These analyses allow us to define the orientation  
39 of genetic counselling according to the results of meiotic segregation obtained.  
40 As a last resort, it could then be discussed of the possibility of having recourse  
41 to donor spermatozoa or adoption.

## 42 **Introduction**

43 In industrialised countries, 15–20% of couples have fertility  
44 problems (De Braekeleer & Dao, 1991b; Wagner &  
45 Stephenson, 1992). In the infertile male population, there is  
46 a 2–20-time higher probability of having a structural  
47 chromosomal abnormality than in general population (De  
48 Braekeleer & Dao, 1991b; Morel *et al.*, 2004a). The two  
49 most frequent structural chromosomal abnormalities are  
50 Robertsonian and balanced reciprocal translocations. A  
51 Robertsonian translocation concerns only acrocentric chro-  
52 mosomes (13, 14, 15, 21 and 22). It consists in the forma-  
53 tion of a chromosome composed of the long arms of two  
54 acrocentrics with loss of their short arms. However, this  
55 loss is without consequence for the carrier because the  
56 short arms of all acrocentrics contain solely nucleolar orga-

57 niser genes. A balanced reciprocal translocation consists in  
58 the exchange of chromosomal material between two  
59 chromosomes. Therefore, a reciprocal translocation does  
60 not change the amount but the order of genetic material.  
61 Generally, these men have a normal phenotype but they  
62 can have sperm abnormalities. Notably, it is known that  
63 carriers of a chromosomal structural abnormality have a  
64 decreased sperm concentration (Vincent *et al.*, 2002).

65 To make up for severe oligozoospermia, these couples  
66 are bound to have recourse to *in vitro* fecundation with  
67 or without intracytoplasmic spermatozoon injection  
68 (ICSI). With the assisted reproductive techniques (ART),  
69 a spermatozoon is chosen according to its mobility and  
70 morphology parameters (Nicolopoulos *et al.*, 2008). How-  
71 ever, these two characteristics are not predictive of the  
72 quality of its chromosomal equipment.

Men with chromosomal structural abnormality can produce a variable proportion of unbalanced gametes. As all spermatozoa have fertilisation capacity regardless of their chromosomal equipment, it is very important to evaluate the percentage of unbalanced chromosomal spermatozoa to assess the risk of injecting a chromosomally unbalanced gamete. Until the late 1980s, the study of meiotic segregation was possible thanks to the heterospecific fecundation of golden hamster oocytes with human spermatozoa. Since 1990, fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) has been used to study the chromosomal equipment of spermatozoa (Morel *et al.*, 2004a, 2006).

We report here the meiotic segregation analysis of chromosomes in spermatozoa of men with carrying a chromosomal translocation using a FISH analysis.

## Patients and methods

### Patients

Patients consulting for different purposes (infertility, repeated miscarriages, structural chromosomal abnormality in family and birth of a malformed child) were included in this study. Standard cytogenetic analysis of lymphocyte chromosomes revealed a chromosomal translocation for each patient.

### Semen analysis

Semen analysis was performed according to WHO guidelines and morphology was examined using strict criteria (World Health Organization, 1999). Prior to the study, all patients were informed of the investigations and gave their written consent.

### Analysis of chromosomal segregation in sperm cells

Sperm samples of all patients were analysed by FISH with a mix of appropriate probes depending upon the structural abnormality and the breakpoints involved in the rearrangement (Table 1). The hybridisation protocol has been previously described (Morel *et al.*, 2004a). The slides were analysed using a Zeiss Axio Plan microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (significant *in situ* imaging system) (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

## Results

### Patients

The karyotypes of all 16 patients are shown in Table 1. There were 12 male patients with a balanced reciprocal translocation between two autosomes (patients 1–12) and 4

male patients with a Robertsonian translocation (patients 13–16).

### Semen analysis

The spermogram parameters of the 16 male patients are shown in Table 2. Five patients had a normal spermogram (patients 4, 5, 8, 10 and 11) and nine had an abnormal spermogram with at least one abnormal parameter (patients 1, 2, 3, 6, 7, 12, 13, 14 and 15) while no information was available for the remaining two patients (patients 9 and 16).

### Analysis of chromosomal segregation in sperm cells

The results of meiotic segregation among the 16 patients are shown in Table 3. Between 546 (patient 6) and 3082 (patient 10) spermatozoa were analysed for males with a balanced reciprocal translocation (Table 3a). The frequencies of normal or balanced spermatozoa ranged from 34.4% (patient 8) to 49.1% (patient 1). Alternate segregation was the preferential mode, followed by adjacent I, adjacent II, and 3 : 1 for 9 patients (1–7, 10 and 11). Adjacent I was the preferential mode, followed by the alternate, adjacent II and 3 : 1 modes for patient 8. The segregation profile was adjacent I, alternate, 3 : 1 and adjacent II for patient 9. Finally, the segregation profile for patient 12 was alternate, adjacent I, 3 : 1 and adjacent II.

Between 1631 (patient 16) and 1846 (patient 15) spermatozoa were analysed for carriers of a Robertsonian translocation (Table 3b). The frequencies of normal or balanced spermatozoa ranged from 78.4% (patient 13) to 91.2% (patient 14). The alternate was the preferential mode of segregation for all four carriers (Table 3b).

Comparison of the first two preferential modes of meiotic segregation between our results (FISH analysis on spermatozoa) and HC Forum (<https://www.hc-forum.net/HCFForum>) led to identical conclusions for three patients (patients 9, 10 and 12) but not for the other nine patients (Table 4).

## Discussion

Robertsonian translocation is the most common structural chromosomal abnormality with an incidence of 1/1085 in newborns. Balanced reciprocal translocation is the second most common aberration with an incidence of 1/1175 births (De Braekeleer & Dao, 1991a). Carriers of a structural chromosomal abnormality, such as reciprocal and Robertsonian translocations, have usually a normal phenotype but they are at a higher risk of producing chromosomally unbalanced gametes.

**Table 1** Karyotype, circumstances of discovery of structural chromosomal abnormality and mix of probes used to perform FISH on spermatozoa of 16 males carriers of a reciprocal or Robertsonian translocation

Patient	Karyotype	Discovery	Mix of probes used to FISH analyses
1	46,XY,t(1;17)(q31;p12)	Analysis on an abortus	Tel1q (Red), tel17p (Green), CEP17 (Aqua)
2	46,XY,t(8;18)(p22;q21)	Hypofertility	CEP8 (Red), tel8p (Green), CEP18 (Aqua)
3	46,XY,t(4;5)(p15;q12)	ICSI appointment	CEP4 (Aqua), LSI EGR1 5q31 (Red), LSI D5S23/D5S721 5p15.2 (Green)
4	46,XY,t(7;22)(q32;q12)	Repeated miscarriages	CEP7 (Aqua), tel22q (Green), TUPLE1 (22q11 – Red)
5	46,XY,t(10;15)(p14;q26)	Repeated miscarriages	CEP15 (Green), tel15q (Red), CEP10(Aqua)
6	46,XY,t(3;13)(q27;q11)	Familial structural chromosomal abnormality	13q14 (Green), tel3q (Red), 3q27 (Yellow)
7	46,XY,t(6;10)(p21;q26)	Repeated miscarriages and birth of a malformed child	Tel6p (Green), tel10p (Red), CEP10 (Aqua)
8	46,XY,t(3;8)(q22;q23)	Known structural chromosomal abnormality and repeated miscarriages	3q27 (Yellow), CEP8 (Aqua), tel8q (Red)
9	46,XY,t(4;6)(q34;q16.1)	Known structural chromosomal abnormality	tel6q (Green), tel4q (Red), CEP4 (Aqua)
10	46,XY,t(13;17)(q22;q23)	Repeated miscarriages	CEP17 (Aqua), 13q14 (Red – AmpliTech), 13qter (Green - AmpliTech)
11	46,XY,t(7;8)(p12;p22)	Repeated miscarriages	tel8p (Green), CEP7(Aqua), CEP8 (Red)
12	46,XY,t(17;19)(q21;p13.3)	ICSI appointment	tel19p (Green), CEP17 (Aqua), BACs en 17q24 (RP11-1064E11 + RP11-118F13 + RP11-467K7 – Red)
13	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	Primary infertility	LSI IGH (Yellow), 13q14 (Green)
14	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	Oligoasthenoteratozoospermia	LSI IGH (Yellow), 13q14 (Green)
15	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	Oligoasthenoteratozoospermia	LSI IGH (Yellow), 13q14 (Green)
16	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	Oligoasthenoteratozoospermia	LSI IGH (Yellow), tel21q (Red)

**Table 2** Results of semen analysis of 16 carriers of a reciprocal or Robertsonian translocation

Patient	Concentration ( $\times 10^6$ ml)	Motility (% of spermatozoa with forward progression)	Morphology (% of spermatozoa with normal form)	Conclusion of spermogram
1	110	40	uk	A
2	15	52	36	A
3	2.1	30	uk	A
4	59	56	40	N
5	104	71	61	N
6	0.2	uk	uk	A
7	64	28	30–50	A
8	138	68	56	N
9	uk	uk	uk	uk
10	51	66	66	N
11	26	51	40	N
12	19	35	9	A
13	5.1	55	24	A
14	0.5	uk	uk	A
15	10.1	41	19	A
16	uk	uk	uk	uk

A, abnormal spermogram (with at least one abnormal parameter); N, normal spermogram; uk, unknown.

In carriers of a balanced reciprocal translocation, during meiosis I, a quadrivalent is formed between the translocated chromosomes and their normal homologues in spermatocytes I at pachytene stage, leading to five modes

of segregation. The sole segregation mode allowing the production of chromosomally normal or balanced gametes is the alternate mode. The other four segregation modes (adjacent I, adjacent II, 3 : 1 and 4 : 0) produce

**Table 3** Results of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of 16 carriers of a reciprocal or Robertsonian translocation

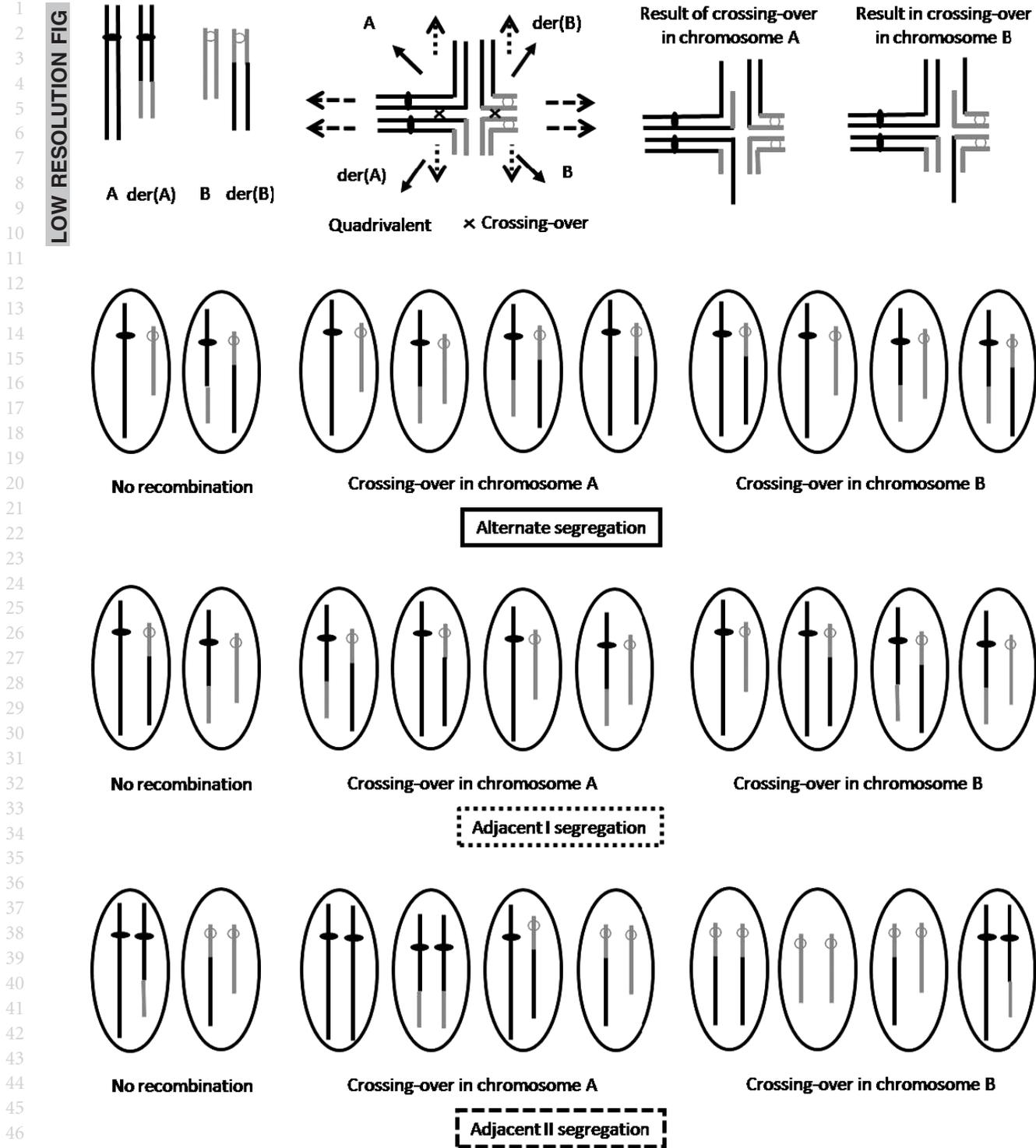
(a) Reciprocal translocations							
Patient	Alternate (%)	Adjacent I (%)	Adjacent II (%)	3 : 1 (%)	Diploidy or 4 : 0 (%)	Others (%)	No. of analysed spermatozoa
1	49.1	34.4	8.5	7.3	0.3	0.4	2036
2	48.4	29.5	16.3	5.3	0.1	0.4	1141
3	45.6	25.7	19.2	8.1	0.5	0.9	1062
4	41.7	35.7	13.0	7.9	0.2	1.5	2619
5	43.4	37.3	10.6	8.3	0.1	0.3	2733
6	34.4	22.7	22.3	16.3	0.4	3.9	546
7	38.6	35.4	15.5	9.3	0.6	0.6	2150
8	34.4	35.8	15.0	13.9	0.2	0.7	1788
9	39.6	40.2	7.5	12.2	0.5	0	583
10	47.3	40.0	7.2	4.9	0.4	0.2	3082
11	45.4	28.2	16.4	8.1	0.4	1.5	2507
12	40.9	25.3	15.8	17.4	0.2	0.4	2504
(b) Robertsonian translocations							
Patient	Alternate (%)	Adjacent (%)	Diploidy or 3 : 0 (%)	Others (%)	No. of analysed spermatozoa		
13	78.4	20.9	0.7	0	1707		
14	91.2	7.7	0.8	0.3	1754		
15	86.7	12.7	0.4	0.2	1846		
16	84.9	14.5	0.6	0	1631		

**Table 4** Comparison of the first two preferential modes of meiotic segregation between our results (FISH on spermatozoa) and those of HC Forum in carriers of a balanced reciprocal translocation

Patient	Laboratory	HC Forum	Conclusion
1	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
2	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
3	Adjacent I	3 : 1	Different
	Adjacent II	Adjacent II	
4	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
5	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
6	Adjacent I	3 : 1	Different
	Adjacent II	Adjacent I	
7	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
8	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
9	Adjacent I	Adjacent I	Identical
	3 : 1	3 : 1	
10	Adjacent I	Adjacent I	Identical
	Adjacent II	Adjacent II	
11	Adjacent I	Adjacent I	Different
	Adjacent II	3 : 1	
12	Adjacent I	Adjacent I	Identical
	Adjacent II	Adjacent II	

chromosomally unbalanced gametes (Morel *et al.*, 2004a). Moreover, if a number of odd recombination takes place in the interstitial segment at the pachytene stage, the alternate segregation produces 50% of spermatozoa with normal (25%) or balanced (25%) equipment and 50% of unbalanced spermatozoa, as gametes produced with adjacent I segregation without recombination. An adjacent I segregation with an interstitial recombination gives the same frequencies of gametes. Finally, an adjacent II with an interstitial recombination gives four gametes with new chromosomal equipment (Fig. 1).

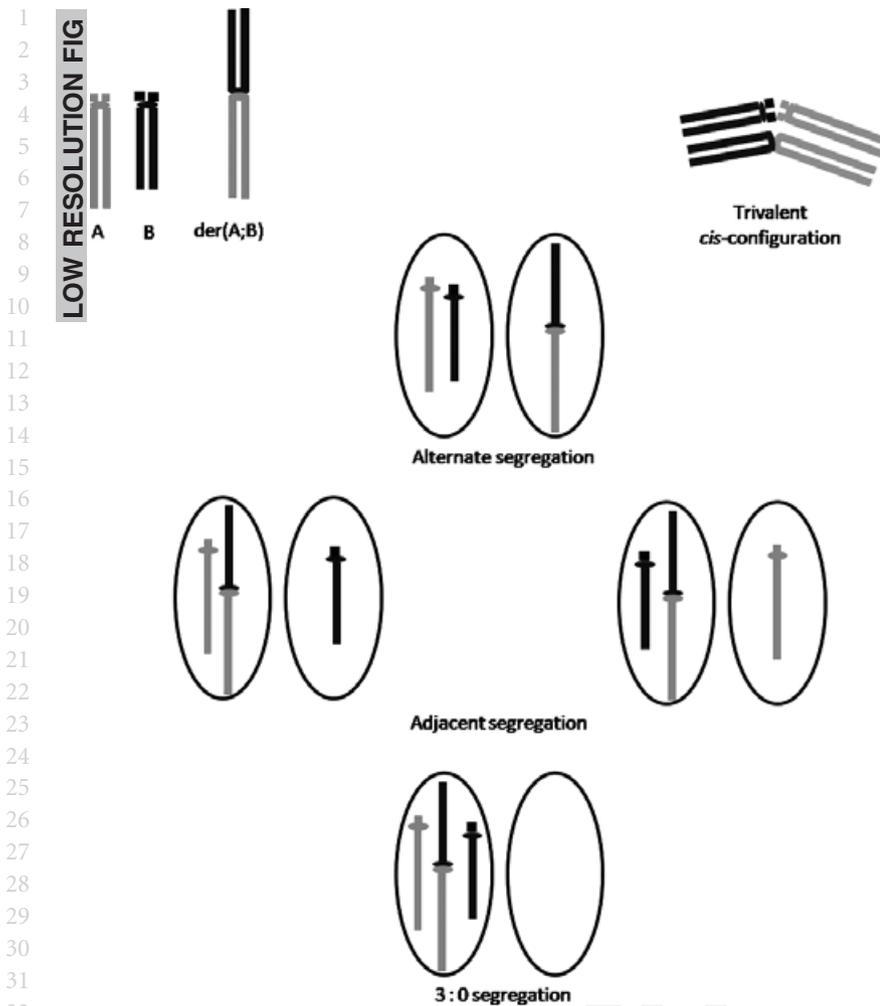
In this study, the alternate mode of segregation prevailed and the majority of chromosomally unbalanced spermatozoa resulted from adjacent I or II modes. The proportions of unbalanced gametes found for the 12 carriers of a balanced reciprocal translocation (50.9–65.6%) are within the brackets reported in the literature (18.6–80.7%) (Morel *et al.*, 2004a; Anton *et al.*, 2007; Wiland *et al.*, 2008). As already shown, the production of unbalanced gametes depends on the chromosomes involved in the translocation, the breakpoints and the size of the translocated segments (Morel *et al.*, 2004a,b). Frequencies of normal and recombinant gametes are likely to depend upon the size of the translocated segments and the number and distribution of chiasmata. Different genetic background and/or submicroscopical differences in breakpoints localisation and/or deletions at the break-



48 **Fig. 1** Illustration of the quadrivalent and three segregation modes in a case of a reciprocal translocation. The corresponding resulting  
49 spermatozoa are schematised with or without crossing-over in the interstitial segments.

51 point sites could also explained the inter-individual variability observed in carriers of an apparently identical reciprocal translocation who are not family relatives.

52 During meiosis I, in spermatocytes I of carriers of a Robertsonian translocation, a trivalent is formed between the derivative chromosome composed of the long arms of  
53



**Fig. 2** Illustration of the trivalent and the various segregation modes in a case of a Robertsonian translocation. The corresponding resulting spermatozoa are schematised.

two acrocentric chromosomes and both normal acrocentric chromosomes of the same pairs. The alternate mode is the sole allowing the production of chromosomally normal or balanced spermatozoa. The other segregation modes (adjacent and 3 : 0) produce unbalanced gametes (Morel *et al.*, 2004a) (Fig. 2).

In this study, the rates of chromosomally unbalanced gametes found in the four carriers of a Robertsonian translocation (8.8–21.6%) are consistent with those reported in the literature (7–40%) (Morel *et al.*, 2001, 2004a; Anton *et al.*, 2007). Wide variations in rates of imbalances have been observed among carriers of a same Robertsonian translocation. In this study, the frequencies of unbalanced spermatozoa, resulting from the adjacent mode of segregation, are included between 7.7% and 20.9% for the three carriers of rob (13;14). In the literature, the frequencies of unbalanced spermatozoa, resulting from the adjacent mode of segregation, were estimated between 8.9% and 23.3% (Escudero *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2000). For the rob (14;21)(q10;q10) carriers, the frequencies of unbalanced

spermatozoa, resulting from the adjacent mode of segregation, were included between 7% and 18% in the literature (Rousseaux *et al.*, 1995; Frydman *et al.*, 2001) and it was 14.5% in our patient. Although we cannot exclude the fact that this variability could be related to technical aspects of FISH and scoring, it could also be the consequence of variations in the formation and/or the breakpoint location and/or the meiotic behaviour of these Robertsonian translocations (Page *et al.*, 1996; Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Moreover, in cases of Robertsonian translocations, the range is not wide as well as cases of reciprocal translocation. The variations stay moderate. As the chromosomes implicated in the Robertsonian translocation formed a trivalent *cis*-configuration, so the alternate segregation mode is favoured and so the production of normal or balanced gametes (Luciani *et al.*, 1984; Perrin *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2008).

If a spermatozoon has a capacity of fertilisation regardless of its chromosomal contents (balanced or not), the higher the production of unbalanced spermatozoa, the

higher the risk of producing a chromosomally unbalanced zygote. If a chromosomally unbalanced spermatozoon fertilises a chromosomally normal oocyte, there could be no implantation or the foetus could be non viable, leading to a spontaneous abortion (Clementini *et al.*, 2005). However, the pregnancy could go to its full term, leading to the birth of a child with malformations and/or mental retardation (as for patients 1 and 7). Therefore, it is important to know whether fertilisation with an unbalanced spermatozoon could lead to a potentially viable foetus. The website HC Forum (<https://www.hc-forum.net/HCForum>) was created to be a supportive tool, a statistical model to estimate the risk of viable foetus with malformations and mental retardation specific to each reciprocal translocation. Comparison of our data with those calculated using the website data showed several results to be discordant.

These analyses allow us to define the orientation of genetic counselling according to the results of meiotic segregation obtained. Indeed, the male partner of a couple has a majority of normal or balanced gametes and a low risk of unbalanced viable foetus could be guided through an ICSI programme more easily than couples in the opposite situation. In 2003, Escudero *et al.* analysed the outcome of pre-implantation genetic diagnosis (PGD) from 11 couples in whom the male had a translocation. They found that, when the chromosomally unbalanced spermatozoa accounted for more than 63% of the total number of spermatozoa, there was no pregnancy (Escudero *et al.*, 2003). It could then be discussed of having recourse to donor spermatozoa or adoption.

## Acknowledgements

Aurore Perrin is the recipient of a doctoral studentship from the "Région Bretagne".

## References

- Anton E, Vidal F, Blanco J (2007) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088–2092.
- Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, Shaffer LG (2002) Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet* 71:1456–1462.
- Clementini E, Palka C, Lezzi I, Stuppia L, Guanciali Franchi P, Tiboni GM (2005) Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 20:437–442.
- De Braekeleer M, Dao TN (1991a) Cytogenetic studies in human spontaneous abortions. In: Assisted Human Reproductive Technology. Hafez ESE (ed). Hemisphere Publ. Co, New York, p 41–45.
- De Braekeleer M, Dao TN (1991b) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250.
- Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 20:599–602.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S (2003) Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 79:1528–1534.
- Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G (2001) Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 16:2274–2277.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 38:14–22.
- Morel F, Roux C, Bresson JL (2001) FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 7:483–488.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M (2004a) Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 27:200–212.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL (2004b) Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81:682–685.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, De Braekeleer M (2006) Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: Cytogenetics and Infertility. De Braekeleer M (ed). Transworld Research Network, Trivandrum (India), p 53–112.
- Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, Ramsay JW (2008) The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 23:240–250.
- Nishikawa N, Sato T, Suzumori N, Sonta S, Suzumori K (2008) Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *Int J Androl* 31:60–66.
- Ogawa S, Araki S, Araki Y, Ohno M, Sato I (2000) Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 15:1136–1139.
- Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KH, Shaffer LG (1996) Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet* 5:1279–1288.
- Perrin A, Douet-Guilbert N, Laudier B, Couet ML, Guerif F, Royere D, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Morel F (2007)

1 Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-  
2 14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: A Case  
3 Report. *Hum Reprod* 22:729–732.

4 Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R,  
5 Delafontaine D, Sele B (1995) Sperm nuclei analysis of a  
6 Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three  
7 plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 96:655–660.

8 Vincent MC, Daudin M, De MP, Massat G, Mieuxset R,  
9 Pontonnier F, Calvas P, Bujan L, Bourrouillou G (2002)  
10 Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm  
11 counts: a 25-year experience. *J Androl* 23:18–22.

Wagner MG, Stephenson PA (1992) Infertility in industrialized  
countries: prevalence and prevention. *Soz Praventivmed*  
37:213–217.

12 Wiland E, Hobel CJ, Hill D, Kurpisz M (2008) Successful  
13 pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for  
14 carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbal-  
15 anced sperm and embryos: a case report. *Prenat Diagn*  
16 28:36–41.

17 World Health Organization (1999) Laboratory Manual for the  
18 Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus  
19 Interaction. Cambridge University Press, New York.

## Article 4

Characterization of a t(2;6) by array-CGH in a couple with recurrent miscarriage: meiotic segregation analysis and implications for assisted reproduction

**CHARACTERIZATION OF A t(2;6) BY ARRAY-CGH IN A COUPLE WITH RECURRENT  
MISCARRIAGE: MEIOTIC SEGREGATION ANALYSIS AND IMPLICATIONS FOR ASSISTED  
REPRODUCTION**

**Perrin A<sup>1,2,3</sup>, Delobel B<sup>4</sup>, Andrieux J<sup>5</sup>, Gosset P<sup>6</sup>, Guéganic N<sup>1</sup>, Duban B<sup>4</sup>, Petit F<sup>4</sup>, Basinko A<sup>1,2,3</sup>, Le  
Bris MJ<sup>3</sup>, Douet-Guilbert N<sup>1,2,3</sup>, De Braekeleer M<sup>1,2,3</sup>, Morel F<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Brest, Brest, France.

<sup>2</sup> INSERM U613, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Brest.

<sup>2</sup> Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHU Brest.

<sup>4</sup> Centre de Génétique Chromosomique, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille, France.

<sup>5</sup> Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France.

<sup>6</sup> Service de Biologie de la Reproduction SIHCUS-CMCO, CHU de Strasbourg, Schiltigheim, France.

**Corresponding author:** Pr Marc De Braekeleer

Laboratoire de Cytogénétique  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
Université de Bretagne Occidentale  
22, avenue Camille Desmoulins  
CS 93837  
F-29238 Brest cedex 3  
France

Phone: + 33 (0)298 01 64 76

Fax: + 33 (0)298 01 81 89

E-mail: [marc.debraekeleer@univ-brest.fr](mailto:marc.debraekeleer@univ-brest.fr)

**Running title:** Meiotic segregation and PGD

**Capsule:** We analyzed the meiotic segregation of a t(2;6)(q35;q24) unbalanced reciprocal translocation. The frequency of normal or “translocation-deletions” spermatozoa was 41.10%. In this study, we discuss couple care-taking modality before ICSI.

## **ABSTRACT**

**Objective:** To characterize a t(2;6) by array-CGH in a couple with recurrent miscarriage, to analyse the meiotic segregation of the t(2;6) and to discuss couple specific care-taking modality before ICSI.

**Results:** Analyses from peripheral blood lymphocytes identified a t(2;6)(q35;q24) unbalanced reciprocal translocation with microdeletions on the der(2) and the der(6). FISH on spermatozoa found that the frequency of normal or “translocation-deletions” spermatozoa resulting from alternate segregation was 41.10%.

**Conclusions:** The pathogenicity of these microdeletions not being proven, the family history orientating more to a variation of genetic equipment, the couple decided not to make a selection between the normal embryos and those translocation-deletion carriers.

## **KEY WORDS**

Microdeletion – Array-CGH - Meiotic segregation - Recurrent miscarriage – Translocation

## **INTRODUCTION**

Miscarriage is a biological phenomenon during which an embryo stops development and is expelled some days or even some weeks after fertilization. Most miscarriages occur before the end of the first trimester of pregnancy. About 15% of the clinically recognized pregnancies end in spontaneous abortion (1).

Recurrent miscarriage is often defined as three or more consecutive pregnancy losses before 24 weeks of gestation (2,3). It affects about 1% of the couples (4,5). The etiology of miscarriage is identified in about 50% of the patients (6,7). Several causes, including parental age, uterine pathology, hereditary thrombophilia, endocrinological disorders, immunological factors, alterations in immune response, infections, nutrition and environmental factors, are responsible for recurrent miscarriages (8).

Genetic factors appear to play the most important role. Studies found 2 to 8% of the couples with recurrent miscarriage to have chromosomal abnormalities (9-11). Reciprocal translocations represent the largest group of abnormalities in couples ascertained for repeated pregnancy losses. In a meta-analysis, De Braekeleer (2006) found 473 patients with a reciprocal translocation among the 37165 individuals reported (1.27%), which is 14.8 times higher than reported in cytogenetic analyses of consecutive newborns (12).

Generally, reciprocal translocation carriers exhibit no particular phenotype but are often affected by reproductive failures because they can produce a significant percentage of gametes with an unbalanced combination of the parental rearrangement. Depending on the chromosomal unbalanced combination, these unbalanced gametes can cause lack of implantation, or early failure of an implanted embryo before clinically recognized pregnancy or repeated spontaneous abortion, or even children with a polymalformation syndrome and/or mental retardation (13,14).

The aims of this study were to characterize a t(2;6) by array-CGH in a couple with recurrent miscarriage, to analyze the meiotic segregation of the translocation and to discuss couple specific care-taking modality before ICSI.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patient's history and cytogenetic analysis**

This 38 year-old man (III-2 in figure 1) consulted for infertility because his 29 year-old wife (III-3) had had three miscarriages without cytogenetic studies performed on these three losses. His wife had a normal karyotype.

During a previous union of the patient, his female partner (III-1) had had six miscarriages and a child (IV-4) with some autistic traits, including difficulties of relation, verbal stereotypy, difficulties of movement, social instability and anxiety. The child had no dysmorphism or malformation. Growth development was normal but he had a minor psychomotor retardation.

The child's karyotype showed an apparently balanced reciprocal translocation, t(2;6)(q35;q24), inherited from his father. Father's semen analysis showed normal parameters with  $36 \times 10^6$  spermatozoa /ml, according to the WHO (15). Prior to this study, the patient was informed of the investigations and gave his consent.

## **Methods**

### Array CGH

Array-CGH (array-comparative genomic hybridization) using a 44K oligonucleotide microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, California) was performed on the father and his son peripheral blood lymphocytes. Array-CGH was performed to assess copy number variation (duplications or deletions) at a resolution of about 100 kb which could have been missed by conventional cytogenetic studies. Array-CGH experiments were performed following standard and manufacturer's recommendations (16).

### Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on peripheral blood lymphocytes

In order to characterize the translocation breakpoints and confirm the results obtained by array-CGH in both father and son, FISH was performed with a panel of bacterial artificial chromosome (BAC) clones mapping from 2q34 to 2q36.1 and from 6q24.2 to 6q24.3. BACs were identified through the Human Genome Browser Database of the Genome bioinformatics Group at the University of California at Santa Cruz (<http://www.genome.ucsc.edu>). Probes were extracted using standard methods and labeled by nick translation. FISH was performed as described elsewhere (17).

### FISH on spermatozoa

Three probes were used to analyze the sperm sample of the t(2;6) carrier: specific alphoid probe of chromosome 6 (D6Z1, AmpliTech, Compiègne, France) labeled in spectrum green, a 6q subtelomere probe (TelVysion 6q, Abbott, Rungis, France) labeled in spectrum orange and a mix of BAC clones localized in 2q37.2 (RP11-367H1, RP11-93H, RP11-341N2) labeled in spectrum aqua (Euromedex, Mundolsheim, France). The hybridization procedure and interpretation have been described elsewhere (18).

## RESULTS

Array-CGH detected a genomic microdeletion of 1.3 Mb at the 6q24.3 breakpoint in the peripheral blood lymphocytes of the father and his son (Figure 2). FISH confirmed the microdeletion found in array-CGH in both males but showed that it was not contiguous to the breakpoint, being located at a distance of 110 kb from the breakpoint.

Screening with BAC clones mapping from 2q34 to 2q36.1 showed the breakpoint to be located in band 2q35. Moreover, FISH using RP11-81G17 and RP11-676M16 found a decrease in intensity of the signals on der(2) and der(6) corresponding to a microdeletion on chromosome 2 not detected by array-CGH. This microdeletion was found in both father and son.

A total of 5039 spermatozoa from the father's semen was analyzed (Table 1). The frequency of normal (23,X or 23,Y) or "translocation-deletions" (23,X,der(2),der(6) or 23,Y,der(2),der(6)) spermatozoa resulting from alternate segregation was 41.10%. The majority of the spermatozoa (58.90%) showed unbalanced chromosomal equipment. Because of adjacent 1 segregation, 38.54% of the spermatozoa were unbalanced. Adjacent 2 segregation led to 9.33% of the nuclei to have an unbalanced chromosomal equipment resulting from 6 different combinations. 10.66% of the spermatozoa segregated in the 3:1 mode whereas 0.12% of the spermatozoa were diploid or segregated in the 4:0 mode.

## DISCUSSION

More than 50% of the spermatozoa of this 46,XY,t(2;6)(q35;q24) carrier were unbalanced. The risk of fetal chromosomal imbalance related to the presence of the translocation is thus 58.90% if we consider the notion, generally accepted by most teams, that the unbalanced spermatozoa are as fertilizing as the normal or balanced spermatozoa (14). This frequency of unbalanced gametes can therefore explain the repeated spontaneous abortions.

In this study, triple FISH did not allow to distinguish spermatozoa with a normal chromosomal equipment from those with a "translocation-deletions" equipment, as they displayed the same pattern of fluorescent signals (one red, one green and one blue). Theoretically there are similar proportions of normal and "translocation-deletion" gametes. So, if pre-implantation genetic diagnosis (PGD) was to be proposed to the couple, is it necessary to select normal embryos to the detriment of those embryos carrying the translocation-deletions? Indeed, the

patient's son, carrying the translocation-deletion, as his father, had some developmental disturbances. Therefore, it cannot be excluded that they are owed to the microdeletion on the der(6) and/or the der(2).

De Gregori et al. (2007) analyzed 59 rearrangements in patients with an abnormal phenotype and found that cryptic deletions were a common finding in reciprocal translocations interpreted as balanced by conventional cytogenetics (19). Moreover, Higgins et al. (2008) found cryptic rearrangements in 15 of 40 carriers of a balanced chromosomal rearrangement with at least one clinically significant congenital anomaly (20). Deletions ranged in size from 500 kb to 12 Mb. They also found that these deletions mapped to the breakpoints in ten patients, but at a distance (0.2Mb to 10Mb) from the breakpoints in five patients. Deletions at the breakpoints could have occurred during the formation of the translocation but deletions at a distance from the breakpoints could be unrelated to the rearrangement or could reflect a more complex mechanism (for example interchromosomal exchange or intrachromosomal deletion) (20).

In our study, the deleted region on the der(2) mapped to the breakpoint; no gene is known in this region. The deleted region on the der(6) mapped at a 110 kb from the breakpoint and contains four genes including *GRM1* and *EPM2A*. Crepaldi *et al.* (2007) found specific expression of an important glutamate receptor (*GRM1*) critically involved in synaptogenesis, neuronal differentiation, synaptic transmission and plasticity (21). *EPM2A* is involved in Lafora disease (22). Lafora disease is classically described as symptoms starting in early adolescence as absence, visual, and myoclonic seizures (23,24).

In our study, the proband's father (II-2) and his brother (III-5) have the same chromosomal abnormality and, except for fertility disturbances, are asymptomatic. Therefore, the pathogenicity of these microdeletions is not proven, the family history orienting more towards a variation of genetic equipment without phenotypic consequence. Moreover, a stringent selection of the embryos would lead to an important reduction of those likely to be transferred. As a consequence, during genetic counseling, the couple decided to make no selection between the normal embryos and those carrying the translocation-deletions. The embryos to be transferred will be those that have inherited either normal chromosomes or both chromosomes (der(2) and der(6)) implicated in the father's translocation.

## REFERENCES

1. Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A. Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* 1980;2:554-6.

2. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. The management of recurrent miscarriage. London, UK: 1998.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of recurrent early pregnancy loss. ACOG practice bulletin. Washington, DC.: American College of Obstetricians and Gynecologists., 2001.
4. Coulam CB. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1991;26:23-7.
5. Scott JR. Recurrent miscarriage: overview and recommendations. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37:768-73.
6. Plouffe L, Jr., White EW, Tho SP, Sweet CS, Layman LC, Whitman GF, McDonough PG. Etiologic factors of recurrent abortion and subsequent reproductive performance of couples: have we made any progress in the past 10 years? *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:313-20.
7. Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994;9:1328-32.
8. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002;8:463-81.
9. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990;5:519-28.
10. Goddijn M, Joosten JHK, Knecht AC, van der Veen F, Franssen MTM, Bonsel GJ, Leschot NJ. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004;19:1013-7.
11. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* 2004;81:367-73.
12. De Braekeleer M. Cytogenetics of couples with repeated pregnancy losses. In: De Braekeleer M, ed. *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006:
13. Benkhalifa M, Kahraman S, Biricik A, Serteyl S, Domez E, Kumtepe Y, Qumsiyeh MB. Cytogenetic abnormalities and the failure of development after round spermatid injections. *Fertil Steril* 2004;81:1283-8.
14. Perrin A, Vialard F, Douet-Guilbert N, Gomes DM, Guthauser B, De Braekeleer M, Selva J, Morel F. Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2009;18:850-5.
15. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. New York, USA: Cambridge University Press, 1999.
16. Basinko A, Perrin A, Nguyen HA, Morel F, Le Bris MJ, Saliou AH, Collet M, Parent P, Benech C, Quemener S, Ferec C, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18. *Am J Med Genet* 2009 (in press)
17. Basinko A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Parent P, Ansquer H, Morel F, De Braekeleer M. Molecular cytogenetic characterization of an 8p22-8p23.2 duplication derived from a maternal intrachromosomal insertion in a child with congenital heart malformation, delayed puberty, and learning disabilities. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2950-4.

18. Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL. Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004;81:682-5.
19. de Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previdere C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007;44:750-62.
20. Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ, Eisenman R, Fan Y, Farra CG, Ferguson HL, Gusella JF, Harris DJ, Herrick SR, Kelly C, Kim HG, Kishikawa S, Korf BR, Kulkarni S, Lally E, Leach NT, Lemyre E, Lewis J, Ligon AH, Lu W, Maas RL, MacDonald ME, Moore SD, Peters RE, Quade BJ, Quintero-Rivera F, Saadi I, Shen Y, Shendure J, Williamson RE, Morton CC. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet* 2008;82:712-22.
21. Crepaldi L, Lackner C, Corti C, Ferraguti F. Transcriptional activators and repressors for the neuron-specific expression of a metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 2007;282:17877-89.
22. Singh S, Ganesh S. Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum Mutat* 2009;30:715-23.
23. Lafora GR. Über das vorkommen amyloider körperchen im innern der ganglienzellen; zugleich ein zum studium der amyloiden substanz im nervensystem. *Virchows Arch Pathol Anat* 1911;205:230-94.
24. Lafora GR, Glueck B. Beitrag zur histopathologie der myoklonischen epilepsie. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 1911;6:1-14.

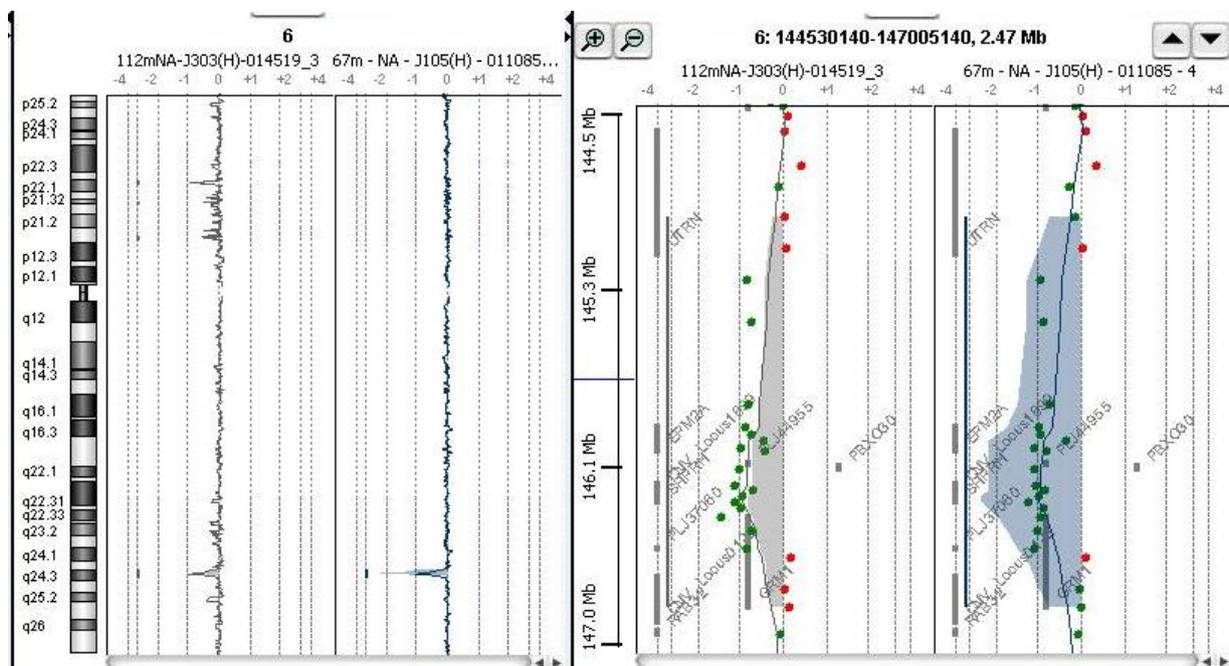
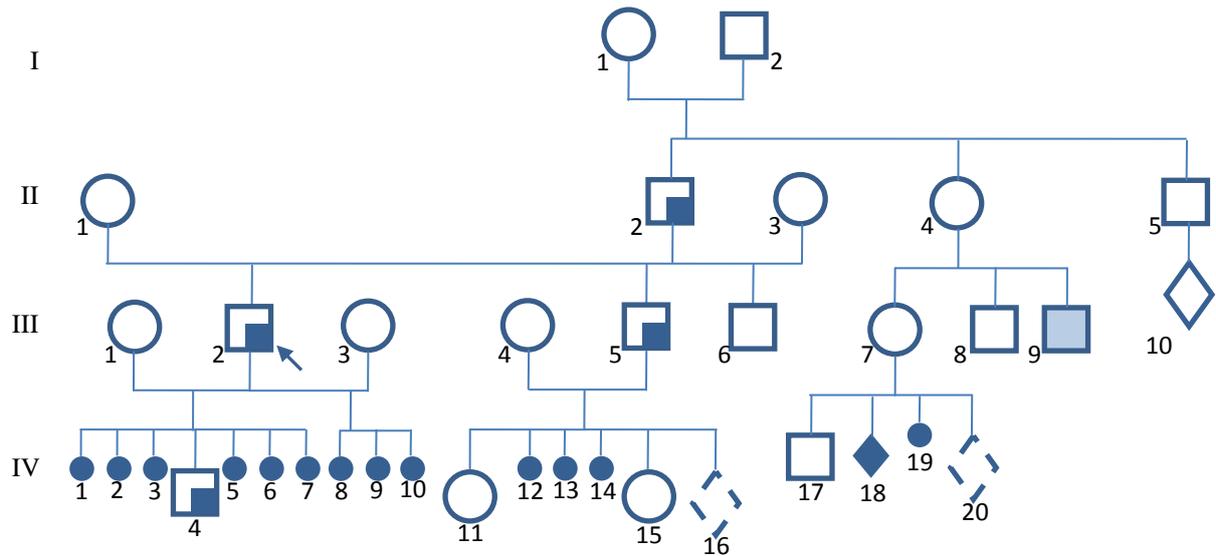
**Table 1. Results of the meiotic segregation in the sample from the 46,XY,t(2;6)(q35;q24) carrier.**

Fluorescent signals	Segregation modes	Chromosomal equipment	n (%) by combination	% by mode
GRA	Alternate	2/6 der(2)/der(6)	2071 (41.10)	41.10
GRR	Adjacent I	der(2)/6	951 (18.87)	38.54
GAA		2/der(6)	991 (19.67)	
RA	Adjacent II		174 (3.45)	
GGRA		2/der(2)	83 (1.65)	
GGAA	Adjacent II + Crossing-over	6/der(6)	50 (0.99)	
GGRR			54 (1.07)	
AA	3:1		55 (1.09)	9.33
RR			54 (1.07)	
GGRAA		2/6/der(6)	6 (0.12)	
R		der(2)	30 (0.60)	
GRAA		2/der(2)/der(6)	64 (1.27)	
GR		6	161 (3.20)	
GRRRA		2/der(2)/6	71 (1.41)	
GA		der(6)	163 (3.23)	
GGRRA		der(2)/6/der(6)	8 (0.16)	10.66
A		2	34 (0.67)	
GGRRAA	4:0 or diploidy		6 (0.12)	0.12
Others			13 (0.25)	0.25

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1.** Pedigree of the carrier of the t(2;6)(q35;q24)

**Figure 2.** Array CGH detected a genomic microdeletion on der(6) in the father and son.



*De* : [Marc De Braekeleer](mailto:Marc.De.Braekeleer)

*Date* : 10/07/2009 09:31:39

*A* : [aurore.perrin@univ-brest.fr](mailto:aurore.perrin@univ-brest.fr)

*Sujet* : Fwd: Fertility and Sterility - Submission Confirmation

>X-Sieve: CMU Sieve 2.3

>X-Virus-Scanned: amavisd-new at univ-brest.fr

>from: "Fertil Steril" <[Fertstert@asrm.org](mailto:Fertstert@asrm.org)>

>sender: [ees.fns.0.23c8e.f0f7560e@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.fns.0.23c8e.f0f7560e@eesmail.elsevier.com)

>to: [marc.debraekeleer@univ-brest.fr](mailto:marc.debraekeleer@univ-brest.fr)

>date: 10 Jul 2009 08:29:45 +0100

>subject: Fertility and Sterility - Submission Confirmation

>X-OriginalArrivalTime: 10 Jul 2009 07:29:45.0736 (UTC)

>FILETIME=[32E44880:01CA0130]

>

>Dear Dr. De Braekeleer,

>

>Your submission entitled "CHARACTERIZATION OF A t(2;6) BY ARRAY-CGH IN A  
>COUPLE WITH RECURRENT MISCARRIAGE: MEIOTIC SEGREGATION ANALYSIS  
AND

>IMPLICATIONS FOR ASSISTED REPRODUCTION" has been received by Fertility and  
>Sterility.

>

>You will be able to check on the progress of your paper by logging on to

>the Elsevier Editorial System of Fertility and Sterility as an

>author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fns/>.

>

>Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been  
>assigned.

>

>Thank you for submitting your work to this journal.

>

>Sincerely,

>

>Fertility and Sterility Editorial Office

## Chapitre de livre 2

Chromosomal abnormalities in spermatozoa



Cytogenetics and Infertility, 2006: 53-112 ISBN: 81-7895-203-3  
Editor: Marc De Braekeleer

## 4 Chromosomal abnormalities in spermatozoa

F. Morel<sup>1,2</sup>, N. Douet-Guilbert<sup>1,2</sup>, A. Perrin<sup>1</sup>, M.-J. Le Bris<sup>2</sup>, V. Amice<sup>2</sup>  
J. Amice<sup>1,2</sup> and M. De Braekeleer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine  
et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

<sup>2</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction  
CHU Morvan, Brest, France

### Abstract

*Cytogenetic analysis conducted on products of spontaneous abortions occurring in the first trimester shows that at least 50% of them are associated with a numerical or structural chromosomal abnormality. Therefore, a high percentage of human gametes could have numerical or structural chromosomal aberrations.*

*Since 1990, fluorescence in situ hybridisation has been applied to the study of chromosomal equipment in human gametes. The disomy levels by chromosomal pairs, estimated between 0.05% and 0.20% in spermatozoa from normal men, enable us to calculate*

## Introduction

The frequency of human chromosomal abnormalities at birth is approximately 0.85% with 0.7% of numerical abnormalities. However, the incidence of chromosomal aberrations is higher in the population with fertility problems. Twenty years ago, cytogenetic analysis conducted on products of spontaneous abortions occurring in the first trimester showed that at least 50% of them were associated with a numerical or structural chromosomal abnormality [1], suggesting that more than 50% of human eggs may be chromosomally unbalanced. Therefore, a high percentage of human gametes could have numerical or structural chromosomal aberrations.

## Methods used to study the chromosomal equipment of human spermatozoa

Until the late 1980s, apart from the research dealing exclusively with Y chromosomal abnormalities by quinacrine staining, the only way of analysing the chromosomal equipment of human spermatozoa was to decondense and obtain a metaphasic presentation with heterospecific fertilisation, as described by Yanagimachi et al. [2]. Briefly, the capacitation of human spermatozoa is performed; then, they co-incubate with zona-free hamster eggs. Penetrated oocytes are fixed after addition of cochicine according to the method described by Tarkowski (1966) [3]. Cytogenetic analysis is performed using Q-, R-, or G-banding, as described by Martin (1983), Sele et al. (1985) and Benet and Martin (1988) [4-6]. However, because of *in vitro* cross-fertilisation, heterospecific fertilisation remained controversial, but results, although limited, were obtained [5,7].

Since 1984, *in situ* hybridisation has been used to study the chromosomal equipment of spermatozoa. Initially, the results obtained with isotopic probes were limited because autoradiography was used, with all its inconveniences [8]. These techniques have been greatly improved with the use of fluorescent dyes (fluorescence *in situ* hybridisation - FISH) [9].

FISH is a technique that allows the detection of nucleic acid sequences in cytologic preparations using labeled probes. These are marked, either directly with a fluorochrome (green, red or blue), either indirectly with a hapten (biotin or digoxigenin). In this latter case, an immunocytochemical detection of biotin- or digoxigenin-labeled hybrids with fluorochrome-labeled anti-avidin or anti-digoxigenin is performed. FISH of spermatozoa provides an alternative technique to sperm karyotyping because it is less laborious, less time consuming and easier to perform.

The Primed IN Situ (PRINS) technique provides another technique to detect aneuploidy on human spermatozoa [10]. In this technique, the chromosomal screening is performed by *in situ* annealing of specific

the incidence of aneuploidies for the 23 chromosomal pairs between 2.3% and 9.2%. In infertile males with abnormal semen parameters, the rate of aneuploidy is higher than that among fertile men.

The frequency of unbalanced spermatozoa of carriers of a balanced reciprocal translocation varies from 19% to more than 80% while it is included between 7 and 40% among carriers of a Robertsonian translocation. The similar profiles of segregation for a same translocation, compared with those very divergent of other translocations, confirm that the risks of meiotic imbalances vary primarily according to the nature of the chromosomes involved in the rearrangement (size of the arms, centromere position), the breakpoints position and the number of chiasmata on the segments involved in the translocation. The frequency of unbalanced spermatozoa in carriers of inversions (pericentric or paracentric) varies from 0% to 37.85% and is influenced by the probability of a crossing-over within the inverted segment, which is affected by the chromosome and region involved, the length of the inverted segment and the location of the breakpoints.

Several studies have used *in situ* hybridisation to analyse the segregation of sex chromosomes in spermatozoa from mosaic and non-mosaic 47,XXY males (Klinefelter syndrome). These studies found an incidence ranging from 0 to 4.3% of gonosomal abnormalities among mosaic Klinefelter men and from 1.4 to 25% among non-mosaic Klinefelter males.

Interchromosomal effect is the result of the missegregation of chromosomes not involved in Robertsonian and reciprocal translocations, inversions or numerical sex chromosome anomalies. A small interchromosomal effect is possible in males carrier of a chromosomal abnormality but the higher risk of aneuploidy could also be associated with the abnormal semen parameters usually induced by the rearrangement.

Several techniques (COMET, NT, SCSA, TUNEL) are currently used to measure the sperm integrity (DNA damage and chromatin structure) which has a crucial influence on the fertilisation process. Several studies have shown a relationship between DNA fragmentation and chromatin abnormalities and sperm motility, morphology and concentration. However, these techniques must benefit from methodology and protocol standardisation as well as discriminating threshold values before being introduced in routine.

In conclusion, as the percentage of chromosomally abnormal spermatozoa estimated by FISH has a predictive value on the outcome of *in vitro* fertilisation or intracytoplasmic sperm injection, FISH studies on spermatozoa should be integrated in the genetic exploration of infertile men to give them a personalised risk assessment. In all cases, genetic counselling should be provided.

contribution to chromosomal abnormalities due to errors during male meiosis [27,28]. The disomy levels by chromosomal pairs, estimated between 0.05% and 0.20% in spermatozoa from normal men by most teams, enabled us to calculate the incidence of aneuploidies for the 23 chromosomal pairs between 2.3% and 9.2%, the hypothesis being that the mean frequency of non disjunction remains the same for each chromosomal pair, including an equal number of hypohaploidies and hyperhaploidies. The sperm aneuploidy rate estimated using FISH is significantly higher than that found using heterospecific fecundation (1.8%) [27].

Researchers attempted to correlate the incidence of aneuploidy with age, producing divergent conclusions [29]. Some studies reported a positive correlation between age and disomy frequencies for various chromosomes [24,30,31]. On the contrary, several studies did not observe a correlation between paternal age and sperm hyperploidy [14,26,32].

In addition, some studies showed an increase in the aneuploidy frequencies following exposure to caffeine, alcohol, cigarette smoke or pesticides [33,34]. Few studies have attempted to analyse the impact of chemotherapy on the estimation of the abnormal chromosomal rate. In general, these studies found a significantly increased risk of chromosomal abnormalities in sperm of these patients during and immediately after the treatment; however, the effects were transient [35,36].

During the past 10 years, many studies compared disomy frequencies in spermatozoa of fertile and infertile men (infertility due to oligo-, oligoterato-, oligoasthenoteratozoospermia, unexplained infertility, etc.) [13,37-40]. All these studies led to different conclusions. Some found an increased frequency of chromosomal abnormalities in infertile men, indicating that infertility could be a risk factor for chromosomal aneuploidy in spermatozoa [37-41]. On the other hand, a few studies showed no differences between fertile and infertile subjects, suggesting that generalised aneuploidy in sperm is not a major reason for unexplained infertility [13,42]. These divergent opinions may result from different methodological approaches or recruitment. However, the disparity of the samples makes it difficult to compare results [21,43].

More recently, most of the studies found a higher rate of aneuploidy in infertile males with abnormal semen parameters compared to controls [44-46]. However, for example, if a man with a normal karyotype and oligoasthenoteratozoospermia has an increased disomy frequency, is this increase associated with oligozoospermia and/or teratozoospermia and/or asthenozoospermia? It is usually very difficult to evaluate only subset groups of oligozoospermia, asthenozoospermia or teratozoospermia because the semen quality is often affected by more than one condition.

Concerning asthenozoospermia, the results of FISH studies on spermatozoa are controversial but the majority of the authors found no

oligonucleotide primers, followed by primer elongation by a Taq DNA polymerase in the presence of labeled nucleotides [11].

## Incidence of aneuploidy in spermatozoa of infertile males with a normal somatic karyotype

Since 1990, fluorescence *in situ* hybridisation has been applied to the study of chromosomal equipment in human gametes [9,12-14]. However, initially, the value of this method and the results obtained remained subject to debate because of the substantial differences in the frequency of aneuploidies (sometimes ranging from 1 to 10) reported by different research teams [15].

These differences could, to a large extent, be the result of methodological differences. Many of these initial results were obtained by one color FISH, which does not allow to differentiate diploid and disomic cells, nor to identify the XY-bearing spermatozoa resulting from non-disjunction during the first division [9,12,16]. The most recent data obtained by two color FISH seem more homogeneous. However, with the use of dual FISH, the researcher could not categorise nuclei that had one signal for each X and Y chromosome as disomic (XY aneuploid sperm) or diploid (normal, 46 chromosomes) [17].

To what extent the different preparation protocols and material exploitation actually account for the varying results is not well understood. In work carried out on frozen and nonfrozen sperm, Martin et al. (1994) demonstrated that storing sperm nuclei in fixative at -20°C for more than 2 years can lead to altered and unreliable FISH results [18]. No consensus exists as to whether or not chromatin decondensation should be used [12,19].

In some reports, the criteria used in microscopic examination of material has not been consistently rigorous. Some studies included only morphologically identified spermatozoa [20], others differentiated between gamete nuclei and diploid nuclei using volume as the sole criterion [12]. Moreover, the varying size, efficiency, and specificity of the probes must be taken into consideration [21,22]. Finally, the disparity of the samples makes it difficult to compare the results reported in the literature. In most studies, the number of samples has often been very limited. Some studies analysed only one sperm sample [16,23] and the number of patients never exceeded 30 [15,24].

Therefore, differences in the incidence of chromosomal non disjunction during spermatogenesis quoted in the literature have been often attributed to interindividual variation [17,25,26]. Because most of the published studies focused on a restricted number of different sperms, this hypothesis is more plausible.

More recently, many studies have focused on the evaluation of disomy frequencies in human spermatozoa using FISH and have tempered the

enlarged head sperm teratozoospermia [61,65-71]. There is a correlation between the percentage of enlarged head spermatozoa and the aneuploidy frequency.

Oligozoospermia is usually associated with other sperm alterations, leading to oligoasthenoteratozoospermia, oligoasthenozoospermia or oligoteratozoospermia. However, the results obtained in several studies are consistent with an inverse correlation between sperm chromosome abnormalities and sperm concentration [46,48,72-74]. This is particularly true in severe oligozoospermia in which a significantly increased incidence of sex chromosomes aneuploidy has been found; thus, there could be a higher risk of sex chromosome abnormal foetuses in offspring of these patients than in the general population. This is in agreement with the increased frequency of chromosomal abnormalities observed in children conceived by intracytoplasmic sperm injection compared to the general newborn population [75].

Chromosome analysis of testicular and epididymal sperm in azoospermic patients has been carried out by several teams but the results are heterogeneous [49,76-79]. Some studies [76-78] found abnormality frequencies significantly increased for various chromosomes in spermatozoa of patients with nonobstructive azoospermia (testicular spermatozoa) compared with that of spermatozoa of patients with obstructive azoospermia (epididymal spermatozoa). However, these results have not been confirmed by other researchers [80,81]. Burrello et al. (2002) found increased aneuploidy rates in both epididymal and testicular spermatozoa compared with those found in ejaculated spermatozoa of normozoospermic patients [80]. Still, some studies showed no significant difference in the aneuploidy rate between the epididymal and ejaculated spermatozoa [78,79]. Anyhow, the majority of studies showed that the incidence of chromosome aberrations was significantly higher in testicular or epididymal spermatozoa of patients with azoospermia compared to ejaculated spermatozoa and that there was a higher aneuploidy rate in spermatozoa of patients with nonobstructive azoospermia compared to obstructive azoospermia.

## Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis

### Background

Balanced reciprocal translocations are the most common structural chromosomal abnormalities in humans, with an incidence of 1 per 1175 in newborns [82]. A reciprocal translocation does not change the amount of chromosomal material, but only the order of the genetic material. These

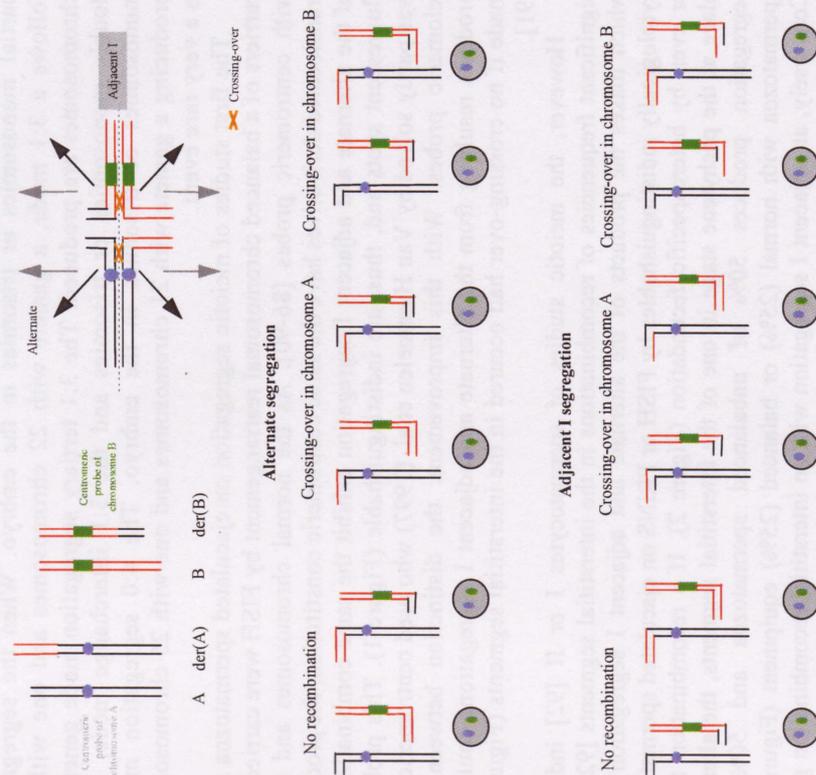
relationship between asthenozoospermia and the frequency of aneuploidy in spermatozoa from these males [17,47-49]. However, patients with severe asthenozoospermia induced by specific morphological deformities involving sperm flagellum have a significantly higher risk of producing aneuploid spermatozoa [49].

Several studies tried to correlate the chromosomal abnormality levels with the morphological characteristics of spermatozoa. After fusion of male gametes with zona-free hamster eggs, Rosenbusch et al. (1992) [50] confirmed the results obtained by Martin and Rademaker (1988) [51] indicating that there was no relation between the morphologic and chromosomal abnormalities. This suggested that an assessment of sperm morphology could not be used as an indicator of chromosomal damage.

Using FISH, some authors found no relationship between teratozoospermia and aneuploidy frequency in sperm nuclei of infertile males [17,48], while others found a significant increase in the frequencies of disomy for various chromosomes [52,53].

There are two monomorphic forms of teratozoospermia: globozoospermia and enlarged head teratozoospermia. First described by Schirren et al. (1971), globozoospermia is a rarely described morphologic disorder of spermatozoa presenting with round heads observed in less than 1% of infertile men [54]. The lack of the acrosome is the main characteristics of this type of teratozoospermia associated with severe infertility. The acrosomeless spermatozoon is unable to go through the zona pellucida and fuse with the oocyte. In 1992, Singh described two types of globozoospermia, type I with round-headed spermatozoa lacking the acrosome and acrosomal enzymes and type II with round-headed spermatozoa having remnants of the acrosome [55]. The physiopathology of this anomaly is still unclear. Studies of sperm DNA status demonstrated abnormal chromatin structure and DNA strand breaks [56]. Intracytoplasmic sperm injection is the sole treatment for globozoospermic patients, with various fertilisation successes [57-59]. The first case of fertilisation and pregnancy by ICSI with round-headed spermatozoa was described 9 years ago [57]. Few studies have analysed sperm aneuploidy in spermatozoa from globozoospermic patients [56,60-63]. There seems to have a slightly increased frequency of aneuploidy in round-headed spermatozoa. The association between this severe teratozoospermia and numerical chromosomal abnormalities is unclear. Although it could be merely fortuitous, the increase observed in some patients could reflect disturbances in spermatogenesis, as observed in other types of infertility [63,64].

The second subset group of teratozoospermia is the enlarged head syndrome. This syndrome is very rare and shows nearly 100% of abnormal spermatozoa with morphologically enlarged heads. All authors concluded that there is an increase in the frequency of chromosomal abnormalities in the



**Figure 1.** Illustration of the various sperm products and the presence of the centromeric probes predicted after alternate and adjacent I segregation at meiosis with or without crossing-over in the interstitial segments of reciprocal translocations.

segregation mode produces translocation carrier (as the father) or normal foetuses.

The other segregation modes, that is adjacent I, adjacent II, 3:1, and 4:0, produce chromosomally unbalanced gametes. In adjacent I segregation, one translocated chromosome segregates in a spermatocyte II with the normal non-homologue chromosome involved in the translocation. In adjacent II segregation, one translocated chromosome segregates in a spermatocyte II with his normal homologue chromosome. Both segregation modes induce partial nullisomies or disomies in the spermatozoa and thus

translocations usually involve the exchange of chromosome material between arms of two heterologous chromosomes.

Robertsonian translocations are another type of translocations. They are common in man with an incidence of 1 in 1085 births [82]. They result in the formation of a chromosome composed of the long arms of two acrocentric chromosomes (pairs number 13, 14, 15, 21, and 22) and subsequent loss of their short arms. This loss is without consequence for the carrier because the short arm of the acrocentrics only contain nucleolar organizer (NOR) genes. As a consequence of this fusion, a carrier of a Robertsonian translocation has only 45 chromosomes.

Generally, these reciprocal and Robertsonian translocations are without consequence for the carrier. However, insofar as these carriers can produce a significant percentage of gametes with an unbalanced combination of the parental rearrangement, there is a more or less significant risk, according to cases, of chromosomal imbalances for their offspring.

The male translocation carriers have often fertility problems due to various degrees of oligoasthenoatozoospermia. Indeed, among 9207 infertile males reviewed by De Braekeleer and Dao (1991), 0.6% were carriers of a reciprocal translocation and 0.8% of a Robertsonian translocation; this is respectively 6.5 and 9.4 times higher than in newborns series [83]. More recently, a review of males karyotyped prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure found 0.98% to be carriers of a reciprocal translocation and 0.95% of a Robertsonian translocation (respectively 11.5 and 10.3 times higher than among newborns) [84].

A large variety of reciprocal or Robertsonian translocations was studied using heterospecific fertilisation. However, the number of cells analysed by heterospecific fecundation was generally low [85]. Indeed, the oligozoospermia frequently associated with the presence of a translocation made this technique difficult to be realised. The frequency of the unbalanced gametes was found to be highly variable from one translocation to another. More recently, studies have also analysed the chromosomal equipment in spermatozoa of reciprocal or Robertsonian translocation carriers using specific probes selected after characterisation of the chromosomal segments involved in the rearrangement for FISH or PRINS (PRImed IN Situ hybridization) [86].

### Segregation of reciprocal translocations

During meiosis I, quadrivalent is formed between the translocated chromosomes and their normal homologues in reciprocal translocation carriers in spermatocytes I (Figure 1).

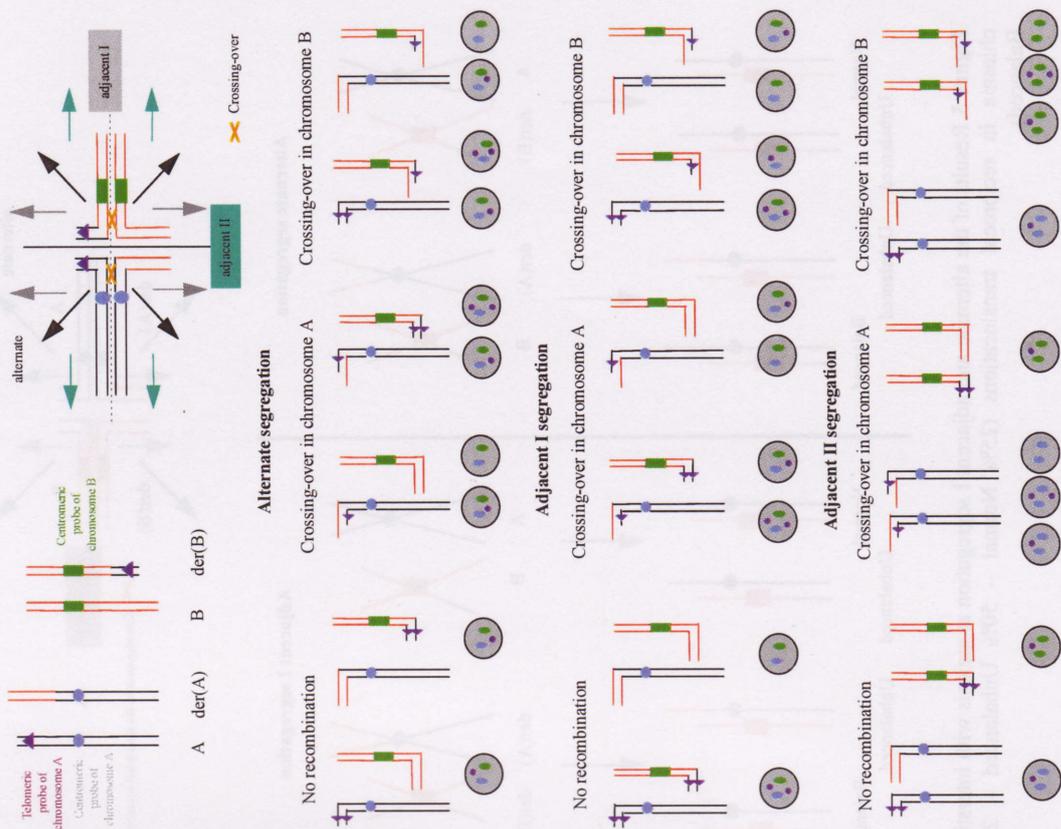
In alternate segregation, the translocated chromosomes segregate in a spermatocyte II and their normal homologues in another spermatocyte II, producing chromosomally balanced and normal spermatozoa respectively. This

partial monosomies or trisomies in the embryo. When the segregation follows a 3:1 mode, a gamete with 22 chromosomes and one with 24 chromosomes are produced. The 3:1 tertiary segregation mode generates double monosomies or trisomies and the 3:1 interchange mode, total monosomies or trisomies in the embryo. The 4:0 segregation mode, producing a gamete with 21 chromosomes and one with 25 chromosomes, is a very rare event.

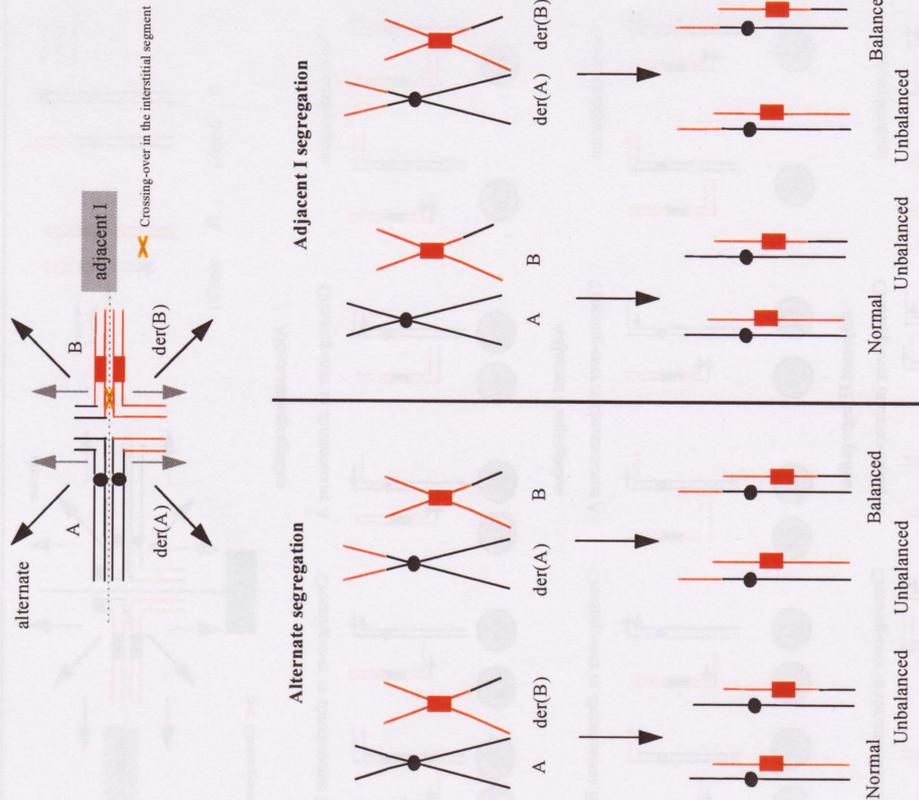
The first studies of meiotic segregation on ejaculated spermatozoa from carriers of a balanced chromosomal rearrangement by FISH were carried out with centromeric probes [86-90]. As the normal chromosomes and their translocated derivatives have the same centromeric constitution, the products of the alternate and adjacent I segregation exhibit the same combination of fluorescent spots and, thus, are indistinguishable (Figure 1). This problem was partly solved by Van Hummelen et al. (1997) who used centromeric and telomeric probes. With this improvement, the distinction between the products resulting from the alternate and adjacent I segregations could be made if no crossing-over had occurred in the interstitial segments (Figure 2)

[91]. However, the meiotic studies of spermatocytes I or II [92] indicate significant frequencies of recombinations in the interstitial segments [92,93], which makes the products of the alternate and adjacent I segregation still cytologically indistinguishable by FISH or PRINS on ejaculated spermatozoa or even by heterospecific fecundation (Figure 2). If a recombination takes place at the pachytene stage in one of the interstitial segments, the alternate segregation produces 50% of unbalanced spermatozoa and 50% of spermatozoa with normal (25%) or balanced (25%) equipment (Figure 3). Conversely, an adjacent I segregation with an interstitial recombination gives the same frequencies of gametes, as previously described by Armstrong and Hulten (1998) [94].

Studies on the meiotic segregation in 44 men carrying a balanced reciprocal translocation between 2 autosomes (even 3 in one case) were conducted by heterospecific fecundation (Table 1). One of these men had two balanced reciprocal translocations [95]. The majority of the studies found the alternate segregation, with equal frequencies of normal or balanced spermatozoa, to be the most prevalent. In the majority of the translocations studied, the unbalanced gametes resulted from the adjacent I (mean of 37% or adjacent II (mean of 12%) segregation. The 3:1 segregation mode was rarer (5% on average) and some cases of 4:0 segregation were observed [95-97]. Overall, the frequencies of normal/balanced and unbalanced gametes were, on average, 46% and 54% respectively (4594 spermatozoa analyzed).



**Figure 2.** Illustration of the various sperm products and the presence of the centromeric and telomeric probes predicted after alternate, adjacent I and adjacent II segregation at meiosis with or without crossing-over in the interstitial segments of reciprocal translocations.



**Figure 3.** Results of the alternate and adjacent I segregation at meiosis with interstitial chiasma in reciprocal translocations (25% Normal – 50% Unbalanced – 25% Balanced).

The meiotic segregation of 42 reciprocal translocations was studied by FISH (Table 2). The majority of these studies showed the alternate segregation to be prevalent, therefore corroborating the observations made by other authors using heterospecific fecundation [97-99]. The majority of the unbalanced spermatozoa resulted from adjacent I or adjacent II segregation. Nevertheless, for some balanced reciprocal translocation carriers, most of the unbalanced

Translocation	Age	Nr	Mode of segregation			References
			Alternate	Adjacent I	Adjacent II	
t(6;14)(p24;q22)	34	19	42.1	26.3	31.6	[273]
t(5;18)(p15;q21)	39	31	45.2	35.5	16.1	[273]
t(11;22)(q23;q11)	30	13	7.7	15.4	38.5	[7]
t(7;14)(q11;q24.1)	36	23	17.4	13	47.8	[95]
t(5;11)(p13;q23.2)	36	23	60.9	8.7	26.1	[95]
t(3;16)(p23;q24)	25	201	19.9	17.4	41.3	[274]
t(8;15)(p22;q21)	31	226	19	18.1	38.1	[274]
t(2;5)(p11;q15)	26	75	42.7	30.7	5.3	[98]
t(9;10)(q34;q11)	30	171	20.8	19.6	48.2	[275]
t(9;18)(p12;q12.1)	26	82	20.7	13.5	63.4	[90]
t(6;7)(q27;q22.1)	35	84	21.4	29.8	48.8	[90]
t(5;13)(q11;q33)	27	57	42.1	35.1	21.1	[90]
t(4;17)(q21.3;q23.2)	35	60	25	31.7	35	[90]
t(12;20)(q24.3;q11)	40	113	22.1	24.7	41.6	[276]
t(7;14)(q21;q13)	55	19	31.6	21.1	31.6	[277]
t(4;6)(q28;p23)	25	158	24.1	21.5	51.9	[277]
t(2;9)(q21;p22)	36	208	25	18.3	28.4	[277]
t(1;2)(q32;q36)	32	105	23.8	17.1	41.9	[278]
t(3;8)(p13;p21)	29	73	27.4	6.8	43.8	[279]
t(2;17)(q35;p13)	36	18	50	6	33	[279]
t(1;4)(p36.2;q31.3)	38	115	31.3	14.7	38.2	[125]
t(1;4)(p36.2;q31.3)	40	90	20	19	50	[125]

**Table 1.** Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers studied by heterospecific fertilization.

\*Study by sperm karyotyping and FISH using painting probes

Translocation	Age	Nr	Mode of segregation	Diploidy	References
			Alternate	3:1	
			Adjacent	4:0	
				Other*	
t(1:11)(p36.3;q13.1)	29	13071	82.45	8.3	9.17
t(6:11)(q14;p14)		13968	73	9	3
t(6:11)(q14;p14)		13876	78	8	2.8
t(2:14)(p23.1;q31)		4610	80	5.2	5.8
t(1:8)(q32;q24.1)		9956	84.9	7.1	7.1
t(10:12)(q26.1;p13.3)	40	10049	84.25	10.95	4.42
t(1:10)(p22.1;q22.3)	40	4036	90.53	4.86	3.94
t(1:4:20)(p11.2;p11.1)	29	1003	27	24	19
t(1:Y)(p4;q12)	30	191	24	12	
t(7:9)(q33;p21)	34	10658	86	10.44	2.98
t(7:18)(q35;q11)	29	10462	77.15	15.91	6.56
t(2:18)(p21;q11.2)	33	3139	43.6	29.8	10.5
t(8:9)(q24.2;q32)	39	3118	44.4	41	3.1
t(5:8)(q33;q13)	42	10344	45.12	38.31	6.97
t(7:8)(q11.2;cen)	30	34527	30.4	25.1	11.1
t(3:11)(q27.3;q24.3)	33	4029	44.3	15.8	6.6
t(3:9)(q26.2;q32)	32	10022	88.35	5.4	5.94
t(3:9)(p25;q32)	34	10278	89.23	6.02	4.48
t(11:22)(q23;q11)	44	1925	27.4	17.6	12.5
t(11:22)(q25;q12)	29	1012	29.1	21.2	15.1
t(Y:16)(q11.21;q24)	43	500	27	36	12
t(4:8)(q28;p23)	31	6590	30.5	28.5	20.5
t(15:17)(q21;q25)	32		51.2	35.3	8.9
t(15:17)(q21;q25)	27		49.4	37.7	7.9
t(15:17)(q21;q25)	24		48.1	40.3	8.5
t(15:17)(q21;q25)	55		52.7	34.4	10.7

Table 2. Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers studied by FISH and PRINS in decondensed spermatozoa.

Translocation	Age	Nr	Mode of segregation	Diploidy	References
			Alternate	3:1	
			Adjacent	4:0	
				Other*	
t(1:11)(p36.3;q13.1)	29	13071	82.45	8.3	9.17
t(6:11)(q14;p14)		13968	73	9	3
t(6:11)(q14;p14)		13876	78	8	2.8
t(2:14)(p23.1;q31)		4610	80	5.2	5.8
t(1:8)(q32;q24.1)		9956	84.9	7.1	7.1
t(10:12)(q26.1;p13.3)	40	10049	84.25	10.95	4.42
t(1:10)(p22.1;q22.3)	40	4036	90.53	4.86	3.94
t(1:4:20)(p11.2;p11.1)	29	1003	27	24	19
t(1:Y)(p4;q12)	30	191	24	12	
t(7:9)(q33;p21)	34	10658	86	10.44	2.98
t(7:18)(q35;q11)	29	10462	77.15	15.91	6.56
t(2:18)(p21;q11.2)	33	3139	43.6	29.8	10.5
t(8:9)(q24.2;q32)	39	3118	44.4	41	3.1
t(5:8)(q33;q13)	42	10344	45.12	38.31	6.97
t(7:8)(q11.2;cen)	30	34527	30.4	25.1	11.1
t(3:11)(q27.3;q24.3)	33	4029	44.3	15.8	6.6
t(3:9)(q26.2;q32)	32	10022	88.35	5.4	5.94
t(3:9)(p25;q32)	34	10278	89.23	6.02	4.48
t(11:22)(q23;q11)	44	1925	27.4	17.6	12.5
t(11:22)(q25;q12)	29	1012	29.1	21.2	15.1
t(Y:16)(q11.21;q24)	43	500	27	36	12
t(4:8)(q28;p23)	31	6590	30.5	28.5	20.5
t(15:17)(q21;q25)	32		51.2	35.3	8.9
t(15:17)(q21;q25)	27		49.4	37.7	7.9
t(15:17)(q21;q25)	24		48.1	40.3	8.5
t(15:17)(q21;q25)	55		52.7	34.4	10.7

Table 1. continued

Translocation	Age	Nr	Mode of segregation	Diploidy	References
			Alternate	3:1	
			Adjacent	4:2	
				5:1	
t(1:11)(p36.3;q13.1)	29	548	15.9	17.3	42.9
t(6:11)(q14;p14)	24	184	21.8	16.8	32.1
t(11:17)(p11.2;q21.3)	39	172	18.6	20.9	27.9
t(16:19)(q11.1;q13.3)	31	173	27.7	17.9	37.6
t(7:20)(q33.2;p13)	37	263	20.5	17.9	39.9
t(3:11)(q25.3;q25)	24	262	24.4	23.3	45.8
t(15:22)(q26.1;q11.2)	31	147	21.1	12.9	39.5
t(3:7)(q25;q36)	?	68	16.2	11.7	45.6
t(4:12)(p11;p11)	?	79	17.7	31.6	12.7
t(2:3)(q24;p26)	30	83	30.1	25.3	36.1
t(10:12)(q26.1;p13.3)	40	72	33.3	27.8	26.3
t(7:18)(q35;q11)	29	72	15.28	18.05	43.05
t(7:9)(q33;p21)	34	54	22.22	22.22	37.04
t(5:7)(q21;q22)*		296	28	21.6	32.4
t(4:8)(q28;p23)*	31	352	19.3	16.1	33.2
t(1:13)(q41;q22)*		255	24.7	16.9	41.6
t(3:19)(p21;p13.3)*		128	18	21.2	35.9
t(2:22:11)(q13;q11.2;q23)*		208	9.61	3.84	64.9



Translocation	Age	Nr	Mode of segregation			Diploid cells or 3:0	Ambiguous	References
			Alternate	Adjacent	Normal			
der(14;21) <sup>a</sup>		24	70.8	16.7	12.5	0	[118]	
der(13;14) <sup>a</sup>		41	78	50	42.3	7.7	[106]	
der(13;14) <sup>a</sup>		23	117	35.9	37.6	26.5	[107]	
der(13;15) <sup>a</sup>		40	67	46.3	43.3	10.4	[294]	
der(15;22) <sup>a</sup>		35	115	42.6	47	10.4	[295]	
der(21;22) <sup>a</sup>		52	149	49.6	47	2.7	[109]	
der(13;14) <sup>b</sup>		32	45	37.77	53.33	8.9	[108]	

Table 3. Meiotic segregation in Robertsonian translocation carriers studied by heterospecific fertilization.

Studies by heterospecific fertilization  
 Study by sperm injection into mouse oocytes

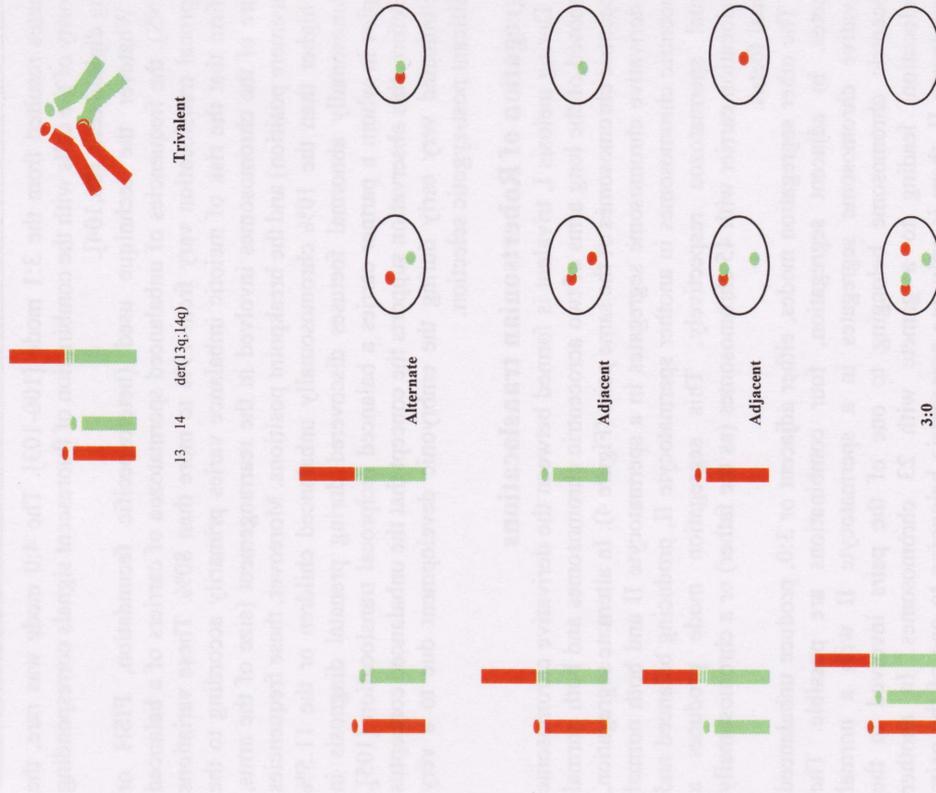


Figure 4. Illustration of the chromosomes involved in the Robertsonian translocation and the probes used. The trivalent and the various segregational modes are shown. The corresponding resulting spermatozoa are schematised.

Luciani et al. (1984) who found that the trivalent was always in the cis configuration; they suggested that this cis configuration (contrarily to the trans configuration) promoted an alternate segregation which should produce an equal number of normal and balanced spermatozoa [110]. The rate of unbalanced gametes due to an adjacent segregation mode varied from 2.7% to 26.5%, with a sole spermatozoa resulting from the 3:0 segregation mode [109].

There are still very few studies on the meiotic segregation of acrocentric chromosomes in the spermatozoa from men with a Robertsonian translocation using FISH techniques. Indeed, the centromeric probes available at present cannot distinguish the centromeres of chromosomes 13 and 21, neither those of chromosomes 14 and 22. Therefore, FISH studies of the meiotic segregation of the Robertsonian translocations have to be performed using Locus Specific Indicator (LSI) and/or telomeric probes [111-113] or YAC and BAC clones [114]. Still, these studies do not allow the normal and balanced genotypes to be distinguished, as they display the same pattern of fluorescent signals. To avoid these problems, Morel et al. (2003) used total chromosome painting probes of the chromosomes involved in the translocation to differentiate the chromosomally normal (two signals of different colour separated by at least one diameter) and the chromosomally balanced spermatozoa (two signals of different colour coupled one with the other) [115,116].

Ten studies only have analysed the sperm nuclei of 24 Robertsonian translocation carriers using FISH; 16 carried a t(13q;14q), 5 a t(14q;21q), 1 a t(21q;22q), 1 a t(13q;15q) and 1 a t(13q;22q) (Table 4). These studies found a majority (60% to 93%) of sperm cells with a normal or balanced chromosomal equipment. Recently, Acar et al. (2002) analysed the segregation pattern of a man carrier of a 21;21 Robertsonian translocation; as expected, they found 100% of the spermatozoa to be unbalanced (nullisomic or disomic for chromosome 21) [117].

Using FISH, the frequencies of unbalanced spermatozoa, resulting from the adjacent modes of segregation, were estimated between 9% and 23.3% for the der(13;14)(q10;q10) carriers and between 7% and 27.8% for those with a 45,XY,der(14;21)(q10;q10) karyotype. This points out to an interindividual variation, although superimposed intraindividual variations cannot be excluded. Variations were also found for a same Robertsonian translocation following heterospecific fertilisation or sperm injection into oocytes [106-108]. No statistically significant correlation was found among individuals carrying the same translocation between the percentage of unbalanced gametes and sperm numeration, asthenospermia or teratospermia. Interindividual variabilities were also demonstrated for different Robertsonian translocations involving a same chromosomal pair, such as der(14;21) [118-120] and der(21;22) [109,121].

### Intrafamilial and intraindividual variations of meiotic segregation

The comparison of the results obtained for a same Robertsonian translocation showed variations between individuals. It is of interest to find out whether there are also intraindividual and/or intrafamilial variations in the meiotic segregation of reciprocal and Robertsonian translocations.

Translocation	Age	Nr	Mode of segregation		References	
			Adjacent	Normal/Balanced		
der(14;21)	34	1116	72.22	18.01	0.8	[119]
der(21;22)	54	350	38	22	0	4
der(14;21)	32	16578	88.42	11.25	0.18	0.15
der(13;14)	29	1016	73.6	23.3	3.1	
der(13;14)	25	1006	77.4	19.1	3.5	
der(13;14)	28	2984	38.21	43.13	18.06	0.6
der(13;14)	34	1109	40.76	41.84	16.32	1.08
der(13;14)	41	1009	44	44.9	10.8	0.3
der(13;14)	38	1045	91		9	
der(13;14)	33	1023	80		10	
der(13;14)	33	1008	87.1		12.9	
der(14;21)	38	1033	91.3		8.7	
der(14;21)	29	1075	92.8		7.2	
der(14;21)	31	963	93		7	
der(21;21)	36	2230	100% unbalanced spermatozoa (nullisomy or disomy 21)		0.44	0.51
der(13;14)	37	1361	86.48	12.56		
der(13;14)	33	2901	87.49	12.17	0	0.34
der(13;14)	35	1012	83	14.53	0.2	2.27
der(13;14)	33	1002	84.53	14.17	0.2	1.1
der(13;14)	30	1272	88.13	11.4	0.39	0.08
der(13;14)	32	6128	88.23	11.11	0.31	0.34
der(13;14)	33	774	87.73	11.63	0.39	0.26
der(13;15)	38	1281	78.13	20.24	1.63	
der(13;22)	38	7052	86.7	12.79	0.51	

Table 4. Meiotic segregation in Robertsonian translocation carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa.

## Conclusion

The results on the meiotic segregation of reciprocal and Robertsonian translocation carriers provide important information. Depending upon the patients and the translocations, the frequency of unbalanced spermatozoa ranged from 7% to more 80%. Therefore, the meiotic segregation is not a random process leading to an equiprobable distribution of all types of chromosomal imbalances. These results confirm that such anomalies, without consequence for the carrier, represent a risk of aneuploidy for the offspring, the risk being higher if the percentage of his gametes with unbalanced chromosomal equipment is important.

The studies on spermatozoa from translocation carriers help the comprehension of the mechanisms of the meiotic segregation. They should be integrated in the genetic exploration of the infertile men, in order to give them a personalised risk assessment of unbalanced spermatozoa.

Recently, Escudero et al. (2003) found a correlation between the percentage of abnormal spermatozoa and that of abnormal embryos for couples in whom the male was a translocation carrier [103]. Studies on intraindividual variations are of utmost importance because they could allow to select a sperm sample with a lower rate of chromosomally unbalanced spermatozoa.

Of course, antenatal diagnosis has to be proposed to those couples in whom the male partner (as well as the female) is carrying a translocation. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), method allowing the identification of a genetic abnormality in an embryo obtained by *in vitro* fertilisation before its transfer in utero, can also be discussed with these couples. The percentage of chromosomally abnormal spermatozoa estimated by FISH has thus a predictive value on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocation. For some couples, sperm from donors might be more convenient to give birth to a chromosomally normal child.

## Meiotic segregation of inversions during male gametogenesis

### Background

Inversions are structural chromosomal abnormalities resulting of two breaks within a same chromosome followed by 180° rotation and reunion of the inverted segment. Inversions with both breaks in one arm are called "paracentric inversions", whereas those with breaks on both sides of the centromere are called "pericentric inversions".

Generally, chromosomal inversions are without consequence for the carrier; however, when a breakpoint disrupts a critical gene, an abnormal phenotype would be expressed. Pericentric inversions involve all the chromosomes, but most frequently chromosomes 2 and 8. Few pericentric

Unfortunately, this issue has not been addressed yet. Therefore, a hypothesis which would consider fluctuations in the spermatogenetic process development remains to be tested. Yet, intraindividual variations are known for other sperm parameters.

Benet and Martin (1988) studied by heterospecific fecundation the chromosomal equipment of 75 spermatozoa of a 27 year-old man with a 47,XXY karyotype [6]. They found no difference in the rate of numerical chromosomal anomalies compared to that observed in normal donors. In 1999, Martin et al., studying the same patient, who was then 38 year-old, by triple FISH X-Y-1 and dual FISH 13-21, found a significant increase in the frequencies of disomies 13 and XY compared to those observed in controls [122]. These differences could be due to intraindividual variations but also to the limitations of the heterospecific fecundation which does not allow to highlight weak, but statistically significant, increases in the frequencies of disomies. Furthermore, differences among controls or even an age effect cannot be excluded [123].

Intraindividual variations were observed by Frydman et al. (1999) who estimated at 21% and 7% the frequencies of disomy 8 in two different ejaculates from a patient carrying a mosaic trisomy 8 (47,XY,+8/46,XY). These results thus suggest that the incidence of disomy 8 in the germinal cells of this patient is not constant from one ejaculate to another [124].

Intrafamilial variations have been seldomly studied in families in which a reciprocal translocation segregated. To the best of our knowledge, five familial studies analysed the meiotic segregation

- 1) in 2 cousins carrying the same translocation, t(1;4)(p36.2;q31.3), by heterospecific fecundation [125];
- 2) in 2 brothers carrying the same translocation, t(6;1)(q14;p14), by FISH on ejaculated spermatozoa [88];
- 3) in 4 males in the same family carrying the same t(15;17)(q21;q25) translocation by FISH on ejaculated spermatozoa [126];
- 4) in 2 brothers carrying the same t(11;22)(q23;q11) translocation by FISH on ejaculated spermatozoa [127].
- 5) in 2 brothers carrying the same t(7;8)(q11.21;cen) translocation by FISH on ejaculated spermatozoa [115].

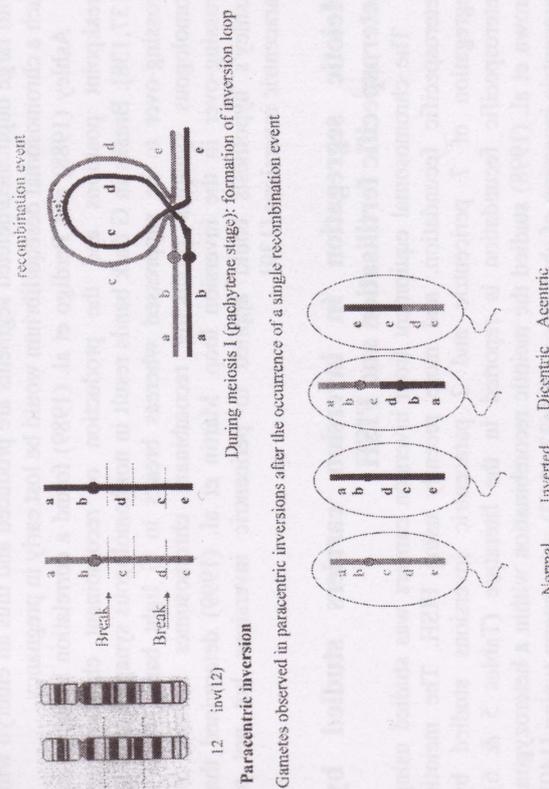
These 5 studies found similar profiles of the meiotic segregation modes in each family. These approximately identical profiles of segregation for a same translocation, compared with those very divergent of the other cases of studied translocations, confirm that the risks of meiotic imbalances vary primarily according to the nature of the chromosomes involved in the rearrangement (size of the arms, centromere position), the breakpoints position and the number of chiasmata on the segments involved in the translocation.

The fecundation of these recombinant gametes will lead to an embryo with a partial trisomy and a partial monosomy. According to losses and gains of distal segments, these unbalanced gametes can cause repeated spontaneous abortion, children with a polymalformation syndrome and/or mental retardation, etc.

### Paracentric inversion

During meiosis, the pairing of the normal and inverted chromosomes forms a loop but, contrary to the pericentric inversion, if an odd number of crossovers occur within the loop, one spermatozoon bearing the normal chromosome, one the inverted chromosome, one the dicentric chromosome and one the acentric chromosome are formed (Figure 6).

The acentric chromosome is generally lost in cell division and the dicentric chromosome tends to break. Thus, some researchers have suggested that a paracentric inversion confers a very low risk of chromosomally unbalanced offspring [132] whereas others found that the risk is increased [133]. For example, Mules and Stamberg (1984) found a dicentric recombinant of chromosome 14 in an infant born to a mother with a paracentric inversion of 14q [133].



**Figure 6.** Illustration of the formation of the inversion loop during meiosis in paracentric inversion. The corresponding resulting spermatozoa after the occurrence of a single recombination event are schematized.

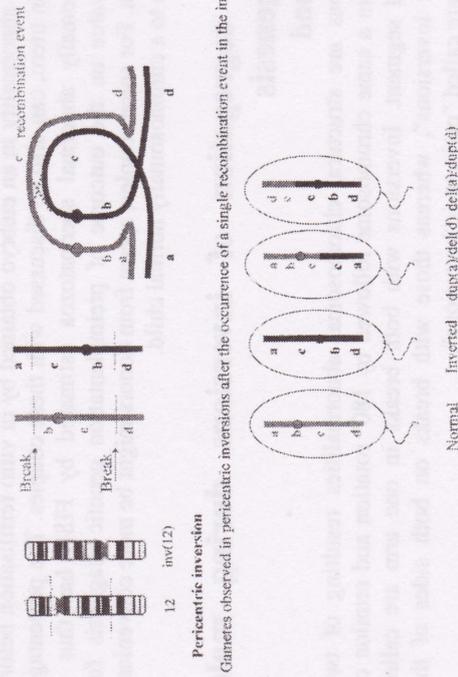
inversions affect heterochromatin only; they are considered as chromosomal polymorphisms.

Pericentric inversions are common, with an incidence of 0.012% in newborns. The frequency in the general population is estimated at 1-2% [128]. It is thirteen times higher among infertile men than in the general population [83]. The incidence of paracentric inversions is much lower (0.002 to 0.049%) [129,130].

These chromosomal abnormalities can perturb spermatogenesis and lead to the production of unbalanced gametes.

### Formation of inversion loops during meiosis and consequences Pericentric inversion

During meiosis, the pairing of the normal and inverted chromosomes requires the formation of an inversion loop (Figure 5). Loop formation and synapsis were observed in humans heterozygous for inversions using meiotic studies at the pachytene stage [131]. An odd number of crossovers within the loop results in one spermatozoon bearing the normal chromosome, one the inverted chromosome and two recombinants with both duplicated and deficient chromosome segments including the regions distal to the inversion (duplication q/deletion p or deletion q/duplication p).



**Figure 5.** Illustration of the formation of the inversion loop during meiosis in pericentric inversion. The corresponding resulting spermatozoa after the occurrence of a single recombination event are schematized.

Table 5. Meiotic segregation of pericentric inversions

Nr	Spermatozoa	Techniques	Non recombinants		Recombinants		Others	References
			normal	inverted	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)		
inv(3)(p1q11)	111	HF	57.7	42.3	0	0		[297]
inv(3)(p25q21)	133	HF	37.6	31.6	13.5	17.3		[144]
inv(20)(p13q11.2)	26	HF	53.8	46.2	0	0		[145]
inv(7)(p13q36)	140	HF	37.9	37.1	7.1	17.1		[146]
inv(8)(p23q22)a	158	HF	47.5	41.1	5.7	5.7		[142]
inv(1)(p31q12)b	157	HF	45.9	54.1	0	0		[143]
inv(9)(p11q13)	314	HF	51.3	48.7	0	0		[298]
inv(8)(p23q22)a	3168	FISH	86.87	6.25	6.88	6.88		[141]
inv(1)(p31q12)b	6006	FISH	99.62	0.13	0.13	16.45		[141]
inv(6)(p23q25)	10049	FISH	45.7	19.18	18.67	16.45		[147]
inv(1)(p36q32)	1636	FISH	82.5	8.7	7.3	1.5		[299]
inv(2)(p23q33)	915	FISH	60.98	20.22	17.49	0.98		[300]
inv(17)(p13.1q25.3)	2000	FISH	73	0.8	0.6	25.7 c		[149]
inv(2)(p11.2q13)	5460	FISH	100	0	0	0		[150]
inv(4)(p16q21)	6406	FISH	99.22	0.78	0.78	0.78		[150]
inv(10)(p13q22.3)	10723	FISH	96.59	3.41	3.41	3.41		[150]
inv(12)(p11q23)	5051	FISH	91.41	3.98	3.52	1.09		[148]
inv(8)(p12q24.3)	2601	FISH	60.94	19.99	17.72	1.35		[148]

FISH Fluorescence in situ hybridisation  
 HF heterospecific fecundation  
 (a) & (b): same inversion studied by heterospecific fecundation and FISH  
 c 25.1% of other recombinants, 0.5% of disomy and 0.1% of diploidy

**Factors influencing the production of recombinant chromosomes**  
 Many factors seem to influence the production of recombinant chromosomes. The probability of a crossing-over within the inverted segment is affected by the chromosome and region involved, the length of the inverted segment and the location of the breakpoints.

The pericentric inversions affecting heterochromatin only induces very little aneusomy of recombination because the heterochromatin is rarely a site of crossing-over [134]; studies on chiasma distribution showed an absence of chiasmata in these regions [135].

Several studies on pericentric inversions showed that the rate of recombination varies according to the size of the inverted segment. If the inverted segment has a size greater than 30% of the total chromosome size, synapsis usually occurs and recombinant chromosomes are induced [136]. In these unbalanced spermatozoa, duplicated and deficient chromosome segments are small and thus fertilisation by these gametes results in a viable foetus, even to term.

In a short pericentric inversion, asynapsis within the inverted segment is likely. Moreover, if the pairing of the normal and inverted chromosomes forms a loop and if there is an odd number of crossovers within the loop, gametes with large duplicated/deleted segments are produced and thus an embryo with such a chromosomal disequilibrium would be lost early in pregnancy.

Ashley (1988) and Perdigo et al. (1989) found a correlation between the breakpoint positions and the production of recombinant chromosomes [137,138]. Breaks in G dark bands result in nonhomologous synapsis causing crossing-over to be suppressed whereas breaks in G light bands lead to homologous synapsis producing recombinant chromosomes because of crossing-over in the inversion loop. Martin et al. (1999) determined that Ashley's hypothesis could be applied to pericentric inversions but not to paracentric inversions [139].

**Meiotic segregation in inversion carriers studied by heterospecific fertilisation and FISH**

The chromosomal equipment from inversion carriers was studied using heterospecific fecundation, and more recently using FISH. The meiotic segregation of 7 pericentric and 2 paracentric inversions studied by heterospecific fecundation is reported in the literature (Tables 5 & 6). Brown et al. (1998) studied the meiotic recombination within a heterozygous paracentric inversion of chromosome 9 (q32-q34.3) using sperm typing [140]. The meiotic segregation of 11 pericentric and 2 paracentric inversion carriers was analysed by FISH (Tables 5 & 6).

Jaarola et al. (1998) studied by FISH two different pericentric inversions that had been previously studied with the heterospecific fecundation method [141-143]. The results obtained by these 2 methods are similar, thus FISH on spermatozoa does generate reliable data. FISH on ejaculated spermatozoa has the advantage of providing data on a very large number of cells, allowing the detection of rare events like the recombinant spermatozoa from the  $inv(1)(p31q12)$  carrier (0.25% dup p/del q and 0.13% dup q/del p) [141].

The number of analysed sperm for each sample was very different, varying from 94 to 314 sperm by heterospecific fecundation and from 496 to 10723 sperm nuclei by FISH.

Using heterospecific fecundation, the number of sperm bearing the normal chromosome was similar to that bearing the inverted chromosome [144-146]. This result seems to be in agreement with those provided by a familial study of inversion carriers showing a similar number of normal offspring and carriers of the inversion. The application of multicolor FISH does not distinguish the spermatozoa bearing the inversion from those carrying the normal chromosome.

The frequency of unbalanced spermatozoa varies from 0% to 30.8% using heterospecific fecundation and from 0% to 37.85% using FISH. No significant difference from the expected 1:1 ratio is found between the frequency of recombinant sperm having a duplication of the p arm and a deletion of the q arm and the frequency of those with a deletion of the p arm and a duplication of the q arm [141,144,147,148]. Thus, no genotypic selection seems to exist in spermatozoa.

Two studies found 13.5% and 25.1% of unexpected recombinant spermatozoa [147,149]. A possible explanation would be the production of chromatid breaks in some of the cells [147].

In conclusion, as previously stated, the localisation of the breakpoints, the chromosomes and bands involved and the size of the inverted segment are correlated to the production of recombinant chromosomes, and thus unbalanced spermatozoa. Anton et al. (2005) postulated that the production of a significant level of unbalanced spermatozoa requires the inversion of at least 50% of the chromosome and a minimum size of 100Mb [150].

### Meiotic segregation of numerical sex chromosome abnormalities during male gametogenesis 47,XXY Klinefelter's syndrome

Klinefelter's syndrome (KS) is one of the most frequent sex chromosome abnormalities in human males concerning approximately 1/1000 newborn males. Patients affected by the classic form present a 47,XXY karyotype (80%); higher grade aneuploidy (48,XXXXY; 48,XXYY; 49,XXXXXY) or mosaicism (46,XY/47,XXY) distinguish the remaining (20%). Generally, mosaic KS

Table 6. Meiotic segregation of paracentric inversions.

Nr spermatozoa	Techniques		Non recombinants		Recombinants		Others	References
	normal	inverted	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)				
$inv(7)(q11q22)$	94	HF	36.2	62.8	0	0	[301]	
$inv(9)(q32q34.3)$	282	sperm typing	100		0		[140]	
$inv(14)(q24.1q32.1)$	120	HF	41.7	58.3	0	0	[139]	
$inv(2)(q14.2q24.3)$	496	FISH	99.19		0.81		[302]	
$inv(4)(p14p15.3)$	8158	FISH	99.97		0.03		[150]	

HF heterospecific fecundation

FISH Fluorescence in situ hybridisation







The majority of studies showed an increased incidence of gonosomal abnormalities in the sperm of 47,XYX men in comparison to those estimated in reference populations [21,25,188]. It would appear that the chromosomal risk might be greater for the offspring of XYX men than for those in the general population. Nevertheless, in 47,XYX men, the number of sperm nuclei with a gonosomal abnormality remains small, which corresponds to the well-known hypothesis that premeiotic or meiotic repair exists [6,177,180,182,183,185]. This repair process eliminates most of the extra Y chromosomes or cells with an extra Y chromosome.

The collected data show significant discrepancies concerning the percentage of XYX germ cells capable of achieving meiosis and producing sperm with abnormal gonosomal equipment (from 0.11% to 13.91% of aneuploid spermatozoa). Methodological and/or materials and/or inter and/or intra-individual variations may explain these differences.

Indeed, these men were selected for different indications: fertile patients and voluntary sperm donors, patients consulting for infertility, and infertile patients referred for intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI). In all cases, standard cytogenetic analysis of lymphocyte chromosomes revealed a 47,XYX homogeneous (Table 9) or mosaic (Table 10) karyotype. The semen characteristics were assessed, according to WHO standards (1995) as normal for a few patients, moderately altered for others and very perturbed for others.

A few studies were carried out using dual gonosomal hybridisation (one X and one Y probe). In the others, the authors used triple FISH (one X, one Y, and one autosomal probe) with a fluorescent revelation [43,170,185,189]. In all the studies, cells were scored by applying strict selection criteria: some sperm nuclei were not included in the scoring: those with overlapping sperm heads, nuclei that were nonswollen or over swollen [182], overlapping spermatozoa or sperm heads without a well-defined boundary [170,185]. Sperm nuclei with split or superimposed signals were classified as ambiguous [187]. The number of analysed sperm for each sample was variable (from 410 to 100000 sperm). In the case of severe oligozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia, only a limited number of sperm nuclei could be analysed [121,185]. However, the methodological hypothesis is rather unlikely and would probably not cause such large variations. Indeed, current estimations of disomy frequencies in control populations are approximately the same [21,25,188]; furthermore, the same research team found the frequencies of gonosomal aneuploidies to vary from 5.65% [43] to 13.91% [182].

Interindividual variations may explain the differences of frequencies of gonosomal aneuploidies. This possibility corresponds to the various differences of opinion and results, whatever the technique described in the literature. Gabriel-Robez et al. (1996) explained this phenomenon in studying the synaptic behaviour of sex chromosomes in two XYX men [190]. In one

References	X	Y	YY	XX	XY	XXY	XXY or XYY	YY	XX	XY	XXY	XYY	XXYY	XYYY	XY + auto	or nullisomy	Non hybridization spermatozoa	Nr	Percentage of diploidy	
																			10078	15458
[307]	48.44	52.25	0.02	0	0.23			0.13 <sup>a</sup>									10112			
[307]	49.22	47.96	0.44	0.05	1.02			0.83 <sup>a</sup>									2056			
[186]	49.23	48.46	0.08	0.07	0.61		0.02	0.03	0.06	0.79		0.02					10078		0.47	
[189]	46.24	51.09	0.67	0.34	0.21			0.27	0.26	0.25							15458			

Table 10. Recapitulation of different results concerning the chromosomal equipment of gametes in 47,XYX/46,XY men.

abnormal children because of meiotic segregation anomalies during spermatogenesis.

The question has been raised as to whether the segregation of the derivative chromosomes of Robertsonian and reciprocal translocations could lead to missegregation of the chromosomes not involved in the rearrangement [200]. This phenomenon, called interchromosomal effect (ICE), was postulated by Lejeune (1963) who found an increased rate of fathers of children with trisomy 21 to be carriers of a reciprocal translocation [201].

### ICE in sperm of males with a translocation

Several studies have reported the disomy and diploidy rates in spermatozoa of males carrier of a translocation. In most of them, disomy of chromosome 21 and the sex chromosomes have been analysed. More rarely, disomy of chromosomes 13 and 18 have been investigated. Some workers have also looked for aneuploidy of other chromosomal pairs, such as pairs 1, 4, 9, and 22. However, these studies are too scanty for conclusions to be drawn.

Statistical analyses were usually performed, comparing each man carrier of a translocation to several "control" men with normal karyotype and spermologic features. They used the chi-square test or the Mann-Whitney test. In two studies, translocation carriers were not analysed individually but grouped in a set that was compared to a set of "controls" [72,202].

The disomy and diploidy rates have been described in spermatozoa of 29 men carrier of a Robertsonian translocation (Table 11). If one excludes the higher rate of disomy for the chromosomes involved in the Robertsonian translocation (which is not ICE), disomy for the sex chromosomes was found to be significantly higher in some patients ( $p < 0.05$ ). Diploidy was also increased in some others.

Table 12 shows the disomy and diploidy rates in spermatozoa of 49 men carrier of a reciprocal translocation. Few men had an increased rate of disomy for the sex chromosomes and diploidy. Even fewer had an increase of disomy for chromosomes 18 and 21.

In their study on 2 carriers of a Robertsonian translocation and 10 men with a reciprocal translocation, Vegetti et al. (2000) found a significantly increased rate of disomy 13, 18, 21, X, Y, XY, and diploidy for the whole translocation group compared to a "control" group ( $p < 0.05$ ) [72]. Pellestor et al. (2001) distributed 8 carriers of a translocation in two groups: the first having normal semen features (5 men) and the second oligoasthenoteratozoospermia (3 men) [202]. The diploidy rate was higher in both groups compared to "controls" ( $p < 0.05$ ) while the disomy rates for chromosomes 13, 21, X, Y, and XY were higher in the sole group with abnormal semen (group 2). We cannot exclude that, as a whole, patients carrying a Robertsonian or reciprocal translocation are at a higher risk of

patient, spermatoocytes had lost the extra Y chromosome before the meiotic prophase; this male with a normal sperm count could be fertile. In the second patient, the extra Y was not lost and a variety of synaptic configurations at early pachytene was found: XY bivalent, XYY trivalent, XY bivalent with a Y univalent, X univalent with YY synapsis; this man had severe oligoasthenoteratozoospermia. Similarly, Solari and Rey Valzacchi (1997) studied an infertile XYY man, using a synaptonemal complex analysis of microspread spermatoocytes and by quantifying germ cells in semithin sections [181]. All spermatoocytes micrographed had an XYY constitution, and the biopsy presented a homogeneous arrest of spermatogenesis at the spermatoocyte/young spermatid stage. Interindividual variations for all usual sperm parameters in the fertile male have already been demonstrated [21].

Moreover, intraindividual variations could explain the divergences between these studies. This hypothesis, which would consider fluctuations in the spermatogenetic process development of the XYY patient, has not yet been documented. Benet and Martin (1988) studied by heterospecific fecundation the chromosomal equipment of 75 spermatozoa of a 27 year-old man with a 47,XYY karyotype [6]. They found no difference in the rate of numerical chromosomal anomalies compared to that observed in normal donors. In 1999, Martin et al., studying the same patient, who was then 38 year-old, by triple FISH X-Y-1 and dual FISH 13-21, found a significant increase in the frequencies of disomies 13 and XY compared to those observed in controls [122]. These differences could be due to intraindividual variations but also to the limitations of the heterospecific fecundation which does not allow to highlight weak, but statistically significant, increases in the frequencies of disomies.

In conclusion, it seems likely that the extra Y chromosome can be found in a more or less large mature gamete population in some XYY individuals than in others. Depending on the reliability of the spermogram, the assessment of the individual risk of gonosomal abnormalities for the offspring could be very different.

## Interchromosomal effect in sperm of males carrying a chromosomal abnormality

### Background

The paternal origin of the supernumerary chromosome in fetuses with trisomy 13, 18, and 21 conceived naturally is close to 10% [191-194]. Moreover, several studies have now showed a higher rate of numerical chromosomal abnormalities in embryos and children conceived by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [195-199]. Therefore, there are concerns that infertile men may be at a higher risk of having chromosomally

Values in bold: statistically significant difference compared to the control group of the study (p<0.05)

References	Translocations	Disomy 13	Disomy 18	Disomy 21	Disomy X	Disomy XY	Disomy Y	Diploidy
[119]	der(14;21)			0.29	0	0.52	0	1.42
[206]	der(13;22)							0.21
[72]	der(14;21)	0.37	0.32	3.14	0.05	0.18	0.09	0.345
[72]	der(13;15)	7.19	0.23	0.24	0.05	0.18	0.05	0.165
[202]	der(14;22)	0.26		0.37	0.05	0.21	0.07	0.33
[202]	der(13;15)			0.55	0.25	0.22	0.32	0.44
[296]	der(13;14)	0.77	0.8	0.2	0.23	0.6	0.6	0.83
[296]	der(13;14)	0.78	0.49	0.1	0.2	0.1	0.1	0.88
[296]	der(13;14)	0.3	0.4	0	0.1	0.1	0	0.1
[117]	der(21;21)							0.32
[112]	der(13;14)	0	0.11	0.1	0.23	0.44	0.25	0.245
[112]	der(13;14)	0.11	0.1	0.1	0.1	0.44	0.25	0.25
[112]	der(13;14)	0.12	0.07	0.07	0.18	0.94	0.095	0.18
[112]	der(13;14)	0	0.06	0.31	0.47	0.18	0.415	0.18
[112]	der(13;14)	0.05	0.66	1.34	0.39	0.232	0.115	0.315
[112]	der(13;14)	0	0.23	0.157	0.276	0.304	0.249	0.115
[200]	der(13;14)	NT	0.166	0.178	0.158	0.079	0.236	0.232
[200]	der(14;21)	0.115	0.119	NT	0.156	0.158	0.079	0.236
[207]	der(13;14)	0.156	0.231		0.156	0.578	0.665	0.665
[207]	der(13;14)	0.136	0.231		0.136	0.578	1.094	0.578
[207]	der(13;14)	0.048	0.323		0.048	0.288	0.669	0.669
[207]	der(13;21)	0.400	0.323		0.400	0.483	0.565	0.565
[207]	der(14;22)	0.35	0.400		0.35	0.620	5.660	5.660
[208]	der(13;14)			0.05	0.21	0.13	0.20	0.03
[208]	der(13;14)			0.20	0.21	0.08	0.40	0.18
[208]	der(13;14)			0.14	0.14	0.18	0.34	0.03

Table 11. Disomy and diploidy rates in spermatozoa among men carrier of a Robertsonian translocation.

References	Translocations	Disomy 13	Disomy 18	Disomy 21	Disomy X	Disomy XY	Disomy Y	Diploidy
[119]	6;11(q14;p14)			0.04	0	0.3	0.02	0.21
[119]	6;11(q14;p14)			0	0	0.65	0	0.21
[119]	2;14(p23.1;q31)	0	0	0.27	0.01	0.43	0.01	0.27
[291]	3;11(q27.3;q24.3)	0	0.01	0.07	0.11	0.12	0.14	0.02
[91]	1;10(p22.1;q22.3)			0.07	0.11	0.12	0.14	0.16
[289]	5;8(q33;q13)			0.23	0.13	0.12	0.14	0.16
[206]	17;7(q13;p11)			0.43	0.13	0.12	0.14	0.17
[206]	3;15(p25;q15)			1.9	0.16	0.31	0.31	5.71
[206]	3;15(p25;q15)	0.29	0.31	0.38	0.16	0.31	0.31	0.175
[72]	2;7(p23;p22)			0.38	0.16	0.31	0.31	0.175
[72]	11;12(q24.3;q12)	0.19	0.14	0.19	0.14	0.19	0.19	0.095
[72]	17;22(q11;p11)	0.1	0.19	0.2	0.09	0.14	0.09	0
[72]	2;5(p25;p12)	0.15	0.19	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05
[72]	3;18(p21.3;q21.1)	0.24	2.45	0.24	0.09	0.39	0.22	0.165
[72]	6;7(q21;p21)	0.19	0.14	0.29	0.09	0.05	0.05	0.17
[72]	2;10(q23;q11.2)	0.15	0.15	0.1	0.05	0.05	0.19	0.29
[72]	5;20(p22;p13)	0.19	0.14	0.14	0.1	0.1	0.19	0.075
[72]	6;15(p22;q26.3)	0.15	0.14	0.1	0.1	0.05	0.05	0.075
[72]	1;12(p36.1;p11.2)	0.28	0.2	0.46	0.2	0.2	0.1	0.12
[210]	10;12(p26.1;p13.3)	0.13	0.03	0.21	0.03	0.09	0.02	0.02
[210]	2;8(p21;q11.2)	0.05	0.05	0.26	0.04	0.09	0.03	0.03
[210]	3;19(p25;q12)	0.1	0.12	0.13	0.03	0.34	0.03	0.03
[210]	5;8(q33;q13)	0.05	0.05	0.27	0.03	0.13	0.03	0
[210]	1;22(q23;q11)	0.12	0.05	0.11	0.03	0.12	0.03	0
[210]	3;4(p25;p16)	0.14	0.03	0.24	0.03	0.12	0	0
[210]	8;9(q24.2;q32)	0.03	0	0.11	0.04	0.14	0.02	0
[210]	10;18(q24.1;p11.2)	0.07	0.02	0.19	0.04	0.2	0.02	0.02
[210]	4;10(q33;p12.2)	0.02	0.01	0.16	0.03	0.09	0.01	0.01

Table 12. Disomy and diploidy rates in spermatozoa among men carrier of a reciprocal translocation.

having a slight increase of disomies and diploidy that may not be statistically significant when studied individually. Shi and Martin (2001) reviewed the literature data; they concluded that a small interchromosomal effect was possible in males with a Robertsonian or reciprocal translocation [64].

Meiotic segregation studies in males carrying a Robertsonian or reciprocal translocation showed that the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa varied from 7 to more than 80% [203]. This wide variation resulted from the type of translocation, the chromosomes involved in the rearrangement and the breakpoint position. We cannot exclude that the occurrence of ICE may be affected by the same factors.

There is also a problem to be solved, that is statistical analysis methodology [200]. The most used approach was to determine the probabilities through a chi-square procedure. However, the number of aneuploid cells is usually very small compared to the number of normal cells counted, which means that the expected numbers are usually less than 5. To overcome the problem linked to the fact that a chi-square test should not be performed when the expected numbers are less than 5, Smith (1986) proposed an alternative method to test statistical significance even when the expected numbers are as low as 1 [204].

Furthermore, the authors made the assumption that these tests were independent, relying on multiple comparisons [205]. Therefore, one has to correct for this. The method of choice is the Bonferroni method. The principle is that the overall statistical significance cannot be higher than 0.05. Therefore, if, for example, 10 tests are to be performed, the p value authorised for each test should be divided by 10, that is  $p=0.005$ . However, this method is very conservative and it cannot be excluded that differences that are statistically significant are considered not to be when the Bonferroni method is applied. Anyway, even if we apply the Bonferroni method, most of the differences between carriers and "controls" still remain significant.

Still, the question that remains is whether the increase in disomy and diploidy rates in carriers of a translocation is truly the result of interchromosomal effect or is associated with abnormal semen parameters.

In conclusion, several studies have found such an interchromosomal effect in male carriers of a translocation [40,48,72,78,206-208] while others have not [209-211]. These studies should be expanded to a greater number of translocation carriers since it could increase the aneuploidy risk in the offspring.

### ICE in sperm of males with an inversion

The possible influence of the inversion chromosomes on the disjunction of the other chromosome pairs has also long been a subject of discussion.

[284]	t(4;8)(q28;p23)	0.2	0.4	0.55	0.62	0.14	0.46	0.19
[202]	t(1;4)(p22;q21)	0.3			0.09	0.1	0.07	0.36
[202]	t(7;9)(q33;p21)	0.32			0.1	0.22	0.17	0.11
[202]	t(7;8)(q35;q11)	0.24			0.07	0.14	0.1	0.87
[202]	t(17;18)(p11;q11)	0			0.2	0.3	0.26	0.15
[202]	t(8;13)(p22;q13)	0.5			0.13	0.17	0.1	0.37
[202]	t(5;9)(p12;p11)	0.07	0.21		0.11	0.14	0.15	0.36
[285]	t(1;3)(q41;q22)	0.05	0.23		0.13	0.26	0.14	0.18
[285]	t(3;19)(p21;p13.3)	0.01			0.04	0.07	0.02	0
[308]	t(9;10)(q11;p11.1)	0.81			0.17	0.14	0.14	1.44
[309]	t(10;15)(q26;q12)				0.04	0.13	0.16	0.3
[115]	t(7;8)(q11.21;cen)				0.039	0.098	0.059	0.311
[200]	t(1;17)(q32;p12)	0.219	0.019		0.156	0.118	0.059	0.377
[200]	t(9;16)(q34.2;p12)	0.156	0.078		0.04	0.04	0.02	0.345
[200]	t(9;22)(q21;q11.2)	0.085	0.02	NT	0.313	0.108	0.021	0.801
[200]	t(8;18)(p22;q21)	0.029			0	0.28	0.07	0.68
[208]	t(5;19)(q11;q11)		0.21		0	0.79	0.11	0.07
[208]	t(3;17)(q23;q21)							

Values in bold: statistically significant difference compared to the control group of the study ( $p<0.05$ )

Table 12. continued

Therefore, the increase in some disomy rates in 47,XXY patients would suggest a possible interchromosomal effect that, as suggested by Shi and Martin (2001) about 47,XXY males [64], would affect specific chromosomes in a minority of men. Morel et al. (2001) indicated that there may be a higher risk of conceptus with a numerical autosomal or sex chromosome abnormality among the offspring of patients with Klinefelter's syndrome than in the general population [175].

#### 47,XXY sex chromosomal constitution

With the exception of a few patients who had an increased frequency of autosomal disomic spermatozoa, the majority of 47,XXY or 46,XY/47,XXY men showed no significant differences from the controls (Tables 9 & 10). Thus, if an interchromosomal effect occurs in these men, it would concern a minority of men.

#### Conclusion

The issue of interchromosomal effect is the subject of much debate and is likely to remain so in the coming years. Indeed, several studies have showed an increased frequency of autosomal and sex chromosome aneuploidy in the spermatozoa of males with a normal karyotype and oligozoospermia or oligoasthenoatozoospermia (see, for example, [46,72,73]). This is in agreement with the increased frequency of chromosomal abnormalities observed in children conceived by ICSI compared to the general newborn population [75]. Therefore, the risk of producing an autosomal chromosomally abnormal child could be related to oligozoospermia in general rather than to the somatic chromosomal abnormality (translocation, inversion or numerical sex chromosome anomaly) in particular.

In conclusion, there may be a higher risk, in the offspring of these patients, of autosomal and sex chromosome aneuploidy due, in part, to the meiotic missegregation of the somatic chromosomal abnormality and, in part, to oligoasthenoatozoospermia.

#### DNA fragmentation in spermatozoa

Spermatogenesis is a process of cell differentiation involving mitotic and meiotic divisions and transforming spermatogonia in spermatozoa. This rapid expansion must be tempered by mechanisms controlling the production of spermatozoa. In the past years, data has accumulated to suggest that apoptosis, a process of cellular death based on a genetic program inducing biochemical, cellular and morphological changes, could be responsible for cell proliferation control in the testis [222-224].

Few studies seem to agree with a possible interchromosomal effect because children with unrelated chromosomal abnormalities have been born to inversion carriers [212,213]. However, the results of the studies using heterospecific fertilisation would seem to indicate that there is no ICE because the frequency of structural and numerical abnormalities not related to the inversion is not significantly different from that found in controls. Most studies analysing by FISH the meiotic segregation in spermatozoa from inversion carriers have not found ICE; only Amiel et al. (2001) evidenced an increase in the disomy frequencies for chromosomes 8, 9, 18, X, and Y in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 9 [214].

#### ICE in sperm of males with a numerical sex chromosome abnormality

##### 47,XXY Klinefelter's syndrome

The studies having analysed the meiotic segregation of gonosomes in 47,XXY men used triple FISH with two specific DNA probes for chromosomes X and Y in order to study the percentage of gonosomal aneuploidies, and a specific DNA probe for an autosome as control hybridization efficiency; the latter probe also allowed to distinguish disomic and diploid spermatozoa [170,171,176,215-220]. Different autosomes were used for that purpose: chromosome 1 [215], chromosome 8 [216], chromosome 12 [176], and chromosome 18 [170,171].

For some 47,XXY patients, the frequency of autosomal disomic spermatozoa showed no significant difference from controls [217,220] but, for others, there was a significant increase of autosomal disomic spermatozoa [176] (Tables 7 & 8). For purely technical reasons due to the fact that centromeric probes 13cen, 21cen or 14cen, 22cen indistinctly detect the centromere of chromosomes 13 and 21 or 14 and 22, there are still very few studies that had studied the segregation of these acrocentric chromosomes in spermatozoa from the 47,XXY men.

In fact, only two studies analysed the meiotic segregation, not only of the sex chromosomes, but also of some autosomes (chromosomes 1 and 21) in the spermatozoa of non-mosaic Klinefelter patients [175,221]. As previously described, Hennebicq et al. (2001) found an increased frequency of 24,XY and 24,XX spermatozoa in their patient with regard to controls. But, more surprisingly, they also found a much higher frequency of disomy 21 (6.2 versus 0.4%). Thus, they concluded that there was an important risk of trisomy 21 in offspring of patients with Klinefelter's syndrome candidates for intracytoplasmic sperm injection [221].

Morel et al. (2001) found a statistically significant difference in the frequency of autosomal disomy for chromosomes 13, 18 and 21 between a 47,XXY patient and the control but not for chromosomes 7 and 9 [175].

sperm DNA damage and the biological pregnancy rates; however, sperm DNA damage was correlated with embryo quality and successfully established pregnancy rates [254].

Sperm chromatin integrity, measured by SCSA, was found to be predictive of failure to conceive in two studies [228,255]. Both showed that male fertility was impeded when the DFI fraction was over 30%. The consequences of a high DFI fraction on pregnancy rate are less convincing in ART programs. No full-term pregnancies obtained when the DFI fraction was higher than 28% were reported by several workers [242,256,257] while, in another study, the chance of initiating a pregnancy was lower among men with a DFI fraction over 30% than among those with a DFI <30% [258]. The results published by Gandini et al. (2004) did not indicate a clear predictive power for DFI fraction for fertility rate, embryo quality and pregnancy rate; 5 of the 9 men having fathered a child had a DFI fraction higher than 30% (ranging from 33 to 66%) [259]. Also, in a study conducted by Bungum et al. (2004), the implantation rates and the likelihood of carrying a successful pregnancy were comparable in the group of males with a DFI fraction higher than 27% as among those with a DFI fraction lower than 27% [260]. Interestingly, they showed that sperm samples with high DFI levels were more likely to result in pregnancies in ICSI procedures than following traditional IVF, an observation already made by Host et al. (2000) using the TUNEL assay [261].

Using the TUNEL assay, DNA fragmentation was found to be increased in couples with unexplained recurrent pregnancy losses [262,263]. DNA fragmentation could affect the outcome of intrauterine insemination, as, in the series reported by Duran et al. (2002), no pregnancy resulted from insemination with samples with >12% of sperm having DNA fragmentation [264]. Negative associations were also found between the percentage of sperm with DNA fragmentation and fertilisation and embryo cleavage rates obtained after IVF or ICSI [243,265]. Host et al. (2000) found a negative correlation between the proportion of spermatozoa having DNA strand breaks and the proportion of oocytes fertilised after IVF, but not after ICSI [261]. On the opposite, Henkel et al. (2003) found no correlation between sperm DNA fragmentation and fertilisation rate [266]. Benchaib et al. (2003) showed that a proportion of spermatozoa with DNA fragmentation higher than 10% was a negative factor to obtain pregnancies when ICSI, but not conventional IVF, was performed [267].

The level of DNA fragmentation is also dependent upon the environment. Indeed, using repeated measures analysis, a significant association was found between exposure to periods of high air pollution and the percentage of sperm with DNA fragmentation (using the SCSA technique) among young men of the Teplice district in the Czech Republic [268]. Also, increased DNA fragmentation was observed in spermatozoa of smokers compared to non-smokers [243].

Sperm chromatin condensation is a complex process involving the replacement of histones by protamine and the increased formation of disulfide bonds. Disturbances in this process can have a negative impact on male fertility [225-227]. Indeed, the highly organised and compact chromatin has a crucial influence on the fertilisation process [225,228-230].

Several techniques are currently used to measure the sperm integrity in the investigation of male fertility. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (COMET) was first developed to study DNA damage in somatic cells, before being modified to measure DNA damage in spermatozoa. It is based on the migration of DNA fragments in an agar electrophoresis assay [231-233]. Although this technique appears to be very sensitive to detect DNA breaks, the lack of methodological standardisation has prevented it from being used in routine evaluation of DNA damage in spermatozoa.

The *in situ* Nick Translation Assay (NT) measures the incorporation of the biotin-dUTP complex in single strand breaks of DNA. The signal is visualised using a fluorochrome and identified in fluorescence microscopy [234,235]. As no standardised cut-off value has been proposed, this technique is rarely used.

The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) studies the degree of DNA denaturation of the spermatozoa by measuring the rate of denatured DNA in acid conditions coloured by acridine orange over the total DNA content; it is based on emission of fluorescence in flow cytometry [225]. The results are expressed as DNA fragmentation index (DFI) [236]. Results obtained with this technique are still controversial and no feasible discriminant cut-off value is widely accepted.

Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL) assay is another widely used technique. DNA fragmentation induces the formation of 3'-OH ends that are easily identifiable. The TUNEL technique uses the specific activity of the terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) to incorporate a biotin-deoxyuridine complex at the 3'-OH end of a single strand of DNA. The signal is obtained following addition of streptavidin coupled to fluorescein [237,238]. The method utilises flow cytometry or fluorescence microscopy.

The presence of spermatozoa with chromatin abnormalities and DNA fragmentation in ejaculates is well documented, especially in infertile men. Several studies have shown a relationship between DNA fragmentation and chromatin abnormalities and sperm motility, morphology and concentration [229,239-252]. Therefore, it is likely that a proportion of spermatozoa injected into oocytes may contain fragmented DNA or chromatin abnormalities, which in turn may lead to poor fertilisation and/or cleavage rates.

Using the COMET assay, Morris et al. (2002) found that sperm containing high loads of DNA damage gave rise to pronuclei at a normal incidence but were associated with an increase of failure of embryo cleavage after ICSI [253]. In another study, Tomsu et al. (2002) found no correlation between

Whether increased sperm DNA fragmentation and chromatin abnormalities rates might be a detrimental factor in fertilisation rate, embryo quality and pregnancy rate and outcome remains unanswered. Are IVF results predictable through the analysis of sperm DNA fragmentation remain controversial [269,270]? It should also be noted that oocytes may also contain damaged and/or fragmented DNA, as suggested by a few studies [271,272]. Therefore, the techniques used to evaluate DNA fragmentation in spermatozoa must benefit from methodology and protocol standardisation as well as discriminating threshold values before being introduced in routine to present a good predictive value for pregnancy outcome.

## Conclusion

The development of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) techniques now allows the chromosomal equipment of spermatozoa to be studied (Figure 7). Infertile males with abnormal semen parameters have a higher rate of aneuploidy than fertile men. The risk of aneuploidy could also be influenced by environmental exposure to caffeine, alcohol, cigarette smoke or pesticides.

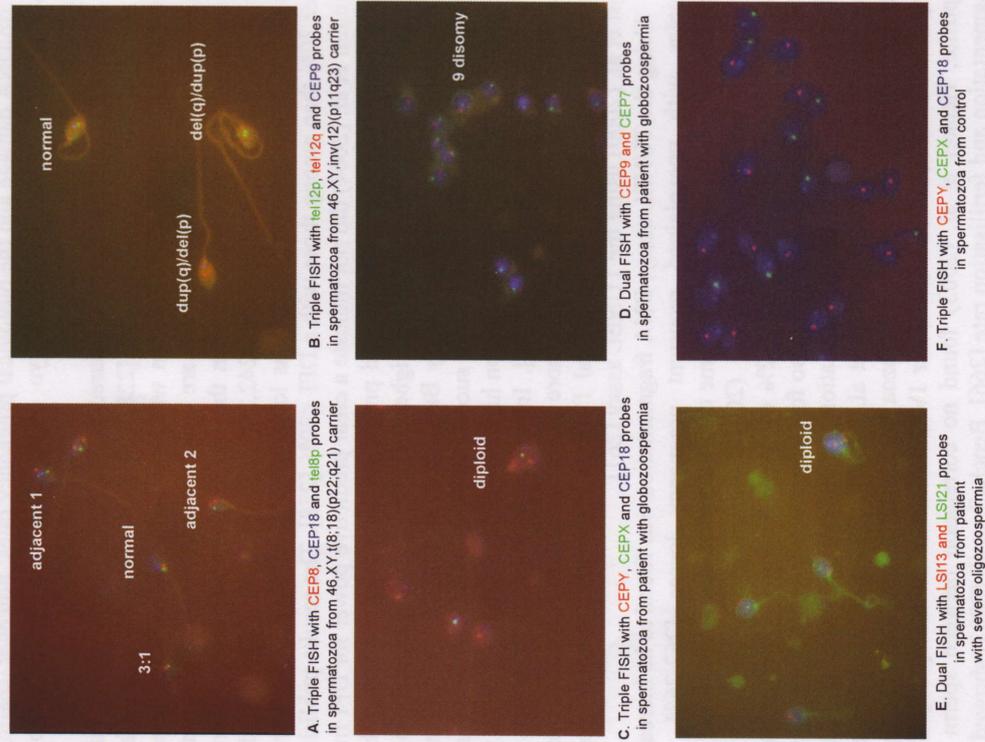
The risk of missegregation of numerical (Klinefelter syndrome, 47,XXY) and structural (Robertsonian and reciprocal translocations, inversions) chromosomal rearrangements can also be quantified by FISH. These abnormalities represent a risk of aneuploidy for the offspring, the risk being higher if the percentage of gametes with unbalanced chromosomal equipment is important.

FISH studies on spermatozoa should be integrated in the genetic exploration of the infertile men to give them a personalised risk assessment of unbalanced spermatozoa. Studies on intraindividual variations are of utmost importance because they could allow to select a sperm sample with a lower rate of chromosomally unbalanced spermatozoa.

Of course, antenatal diagnosis has to be proposed to those couples in whom the male partner (as well as the female) is carrying a chromosomal abnormality. Preimplantation genetic diagnosis can also be discussed with these couples. The percentage of chromosomally abnormal spermatozoa estimated by FISH has thus a predictive value on the outcome of *in vitro* fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. In all cases, genetic counselling should be provided.

## References

1. Lin, C.C., De Braekeleer, M., and Jamro, H. 1985, *Can. J. Genet. Cytol.*, 27, 565.
2. Rudak, E., Jacobs, A., and Yanagimachi, R. 1978, *Nature*, 274, 911.
3. Tarkowski, A.K. 1966, *Cytogenetics*, 5, 394.
4. Martin, R.H. 1983, *Cytogenet. Cell Genet.*, 25, 252.



**Figure 7.** Examples of FISH studies on spermatozoa

**A.** Triple FISH with CEP8, CEP18 and tel8p probes in spermatozoa from a 46, XY, t(8;18)(p22;q21) carrier. **B.** Triple FISH with tel2p, tel2q and CEP9 probes in spermatozoa from a 46, XY, inv(12)(p11q23) carrier. **C.** Triple FISH with CEPY, CEPX and CEP18 probes in spermatozoa from a patient with globozoospermia. **D.** Dual FISH with CEP9 and CEP7 probes in spermatozoa from a patient with globozoospermia. **E.** Dual FISH with LSI13 and LSI21 probes in spermatozoa from a patient with severe oligozoospermia. **F.** Triple FISH with CEPY, CEPX and CEP18 probes in spermatozoa from a control male.

34. Harkonen, K. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 378.
35. Martin, R.H., Ernst, S., Rademaker, A., Barclay, L., Ko, E., and Summers, N. 1999, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 108, 133.
36. De Mas, P., Daudin, M., Vincent, M.C., Bourrouillou, G., Calvas, P., Miesusset, R., and Bujan, L. 2001, *Hum. Reprod.*, 16, 1204.
37. Moosani, N., Pattinson, H.A., Carter, M.D., Cox, D.M., Rademaker, A.W., and Martin, R.H. 1995, *Fertil. Steril.*, 65, 1261.
38. Bernardini, L., Martini, E., Geraedts, J.P., Hopman, A.H., Lanteri, S., Conte, N., and Capitanio, G. 1997, *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 431.
39. McInnes, B., Rademaker, A., Greene, C.A., Ko, E., Barclay, L., and Martin, R.H. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 2787.
40. Pang, M.G., Hoegerman, S.F., Cuticchia, A.J., Moon, S.Y., Doncel, G.F., Acosta, A.A., and Kearns, W.G. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 1266.
41. Lahdetie, J., Saari, N., Ajospenaa-Saari, M., and Mykkanen, J. 1997, *Am. J. Med. Genet.*, 71, 115.
42. Guttenbach, M., Martinez-Exposito, M.J., Michelmann, H.W., Engel, W., and Schmid, M. 1997, *Hum. Reprod.*, 12, 468.
43. Morel, F., Roux, C., and Bresson, J.L. 1999, *Arch. Androl.*, 43, 27.
44. Rives, N.M.D. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 358.
45. Machev, N., Gosset, P., and Viville, S. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 352.
46. Miharu, N. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 347.
47. Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E., and Ohama, K. 1997, *Hum. Reprod.*, 12, 2437.
48. Rives, N., Saint Clair, A., Mazurier, S., Sibert, L., Simeon, N., Joly, G., and Mace, B. 1999, *Hum. Genet.*, 105, 266.
49. Rives, N. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 358.
50. Rosenbusch, B., Strehler, E., and Sterzik, K. 1992, *Fertil. Steril.*, 58, 1071.
51. Martin, R.H. and Rademaker, A. 1988, *Mutation Res.*, 207, 159.
52. Harkonen, K., Suominen, J., and Lahdetie, J. 2001, *Int. J. Andrology*, 24, 197.
53. Templado, C., Hoang, T., Greene, C., Rademaker, A., Chernos, J., and Martin, R.H. 2002, *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 200.
54. Schirren, C.G., Holstein, A.F., and Schirren, C. 1971, *Andrologia*, 3, 125.
55. Singh, G. 1992, *Int. J. Fertil.*, 37, 99.
56. Vicari, E., Perdichizzi, A., De Palma, A., Burrello, N., D'Agata, R., and Calogero, A.E. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 2128.
57. Lundin, K., Sjogren, A., Nilsson, L., and Hamberger, L. 1994, *Fertil. Steril.*, 62, 1266.
58. Zeyneloglu, H.B., Baltaci, V., Duran, H.E., Erdemli, E., and Batioglu, S. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 1833.
59. Stone, S., O'Mahony, F., Khalaf, Y., Taylor, A., and Braude, P. 2000, *Hum. Reprod.*, 15, 139.
60. Martin, R.H., Greene, C., and Rademaker, A.W. 2003, *Fertil. Steril.*, 79, 1662.
61. Viville, S., Mollard, R., Bach, M.L., Falquet, C., Gerlinger, P., and Warter, S. 2000, *Hum. Reprod.*, 15, 2563.
62. Carrell, D.T., Wilcox, A.L., Udoff, L.C., Thorp, C., and Campbell, B. 2001, *Fertil. Steril.*, 76, 1258.
5. Sele, B., Pellestor, F., Estrade, C., Ostorero, C., Warembourg, E., Gelas, M., Jalbert, H., and Jalbert, P. 1985, *Pathol. Biol.*, 33, 875.
6. Benet, J. and Martin, R.H. 1988, *Hum. Genet.*, 78, 313.
7. Martin, R.H. 1984, *Clin. Genet.*, 25, 357.
8. Joseph, A.M., Gosden, J.R., and Chandley, A.C. 1984, *Hum. Genet.*, 66, 234.
9. Guttenbach, M. and Schmid, M. 1990, *Am. J. Hum. Genet.*, 46, 553.
10. Pellestor, F., Girardet, A., Coignet, L., Andreo, B., and Charlieu, J.P. 1996, *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 797.
11. Koch, J.E., Kolvraa, S., Petersen, K.B., Gregersen, N., and Bolund, L. 1989, *Chromosoma*, 98, 259.
12. Han, T.L., Webb, G.C., Flaherty, S.P., Correll, A., Matthews, C.D., and Ford, J.H. 1992, *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 189.
13. Miharu, N., Best, R.G., and Young, S.R. 1994, *Hum. Genet.*, 96, 500.
14. Martin, R.H., Spriggs, E., Ko, E., and Rademaker, A.W. 1995, *Am. J. Hum. Genet.*, 57, 1395.
15. Spriggs, E.L., Rademaker, A.W., and Martin, R.H. 1996, *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 356.
16. Holmes, J.M. and Martin, R.H. 1993, *Hum. Genet.*, 91, 20.
17. Morel, F., Mercier, S., Roux, C., Elmriini, T., Clavequin, M.C., and Bresson, J.L. 1998, *Fertil. Steril.*, 69, 1122.
18. Martin, R.H., Chan, K., Ko, E., and Rademaker, A.W. 1994, *Cytogenet. Cell Genet.*, 65, 95.
19. Guttenbach, M., Schakowski, R., and Schmid, M. 1994, *Hum. Genet.*, 93, 7.
20. Martini, E., Speel, E.J., Geraedts, J.P., Ramaekers, F.C., and Hopman, A.H. 1995, *Hum. Reprod.*, 10, 855.
21. Morel, F., Mercier, S., Roux, C., Clavequin, M.C., and Bresson, J.L. 1997, *Fertil. Steril.*, 67, 1134.
22. Merciers, S. and Bresson, J.L. 1997, *Hum. Genet.*, 99, 42.
23. Martin, R.H., Ko, E., and Chan, K. 1993, *Cytogenet. Cell Genet.*, 64, 23.
24. Griffin, D.K., Abruzzo, M.A., Millie, E.A., Sheean, L.A., Feingold, E., Sherman, S.L., and Hassold, T.J. 1995, *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2227.
25. Downie, S.E., Flaherty, S.P., Swann, N.J., and Matthews, C.D. 1997, *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 815.
26. Shi, Q. and Martin, R.H. 2000, *Cytogenet. Cell Genet.*, 90, 219.
27. Templado, C., Bosch, M., and Benet, J. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 199.
28. Rubes, J., Vozdova, M., Oracova, E., and Perreault, S.D. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 229.
29. Buwe, A., Guttenbach, M., and Schmid, M. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 213.
30. Rousseaux, S., Hazzouri, M., Pelletier, R., Monteil, M., Usson, Y., and Sele, B. 1998, *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 695.
31. Rives, N., Langlois, G., Bordes, A., Simeon, N., and Mace, B. 2002, *J. Med. Genet.*, 39, e63.
32. Luetjens, C.M., Rolf, C., Gassner, P., Werny, J.E., and Nieschlag, E. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 1826.
33. Robbins, W.A., Elashoff, D.A., Xun, L., Jia, J., Li, N., Wu, G., and Wei, F. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 371.

87. Spriggs, E.L. and Martin, R.H. 1994, *Mol. Reprod. Dev.*, **38**, 247.
88. Rousseaux, S., Chevret, E., Montell, M., Cozzi, J., Pelletier, R., Devillard, F., Lespinaise, J., and Sele, B. 1995, *Cytogenet. Cell Genet.*, **71**, 240.
89. Estop, A.M., Cieply, K.M., and Aston, C.E. 1997, *Eur. J. Hum. Genet.*, **5**, 78.
90. Pellestor, F., Sele, B., Jalbert, H., and Jalbert, P. 1989, *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 464.
91. Van Hummelen, P., Manchester, D., Lowe, X., and Wyrobek, A.J. 1997, *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 651.
92. Goldman, A.S.H. and Hulten, M.A. 1993, *Cytogenet. Cell Genet.*, **63**, 16.
93. Goldman, A.S.H. and Hulten, M.A. 1993, *Chromosoma*, **102**, 102.
94. Armstrong, S.J. and Hulten, M.A. 1998, *Eur. J. Hum. Genet.*, **6**, 430.
95. Burns, J.P., Koduru, P.R., Alonso, M.L., and Chaganti, R.S. 1986, *Am. J. Hum. Genet.*, **38**, 954.
96. Benkhalifa, M., Malet, P., Qumsiyeh, M.B., Boucher, D., Bellec, V., and Menezo, Y. 1994, *Rev. Fr. Gynecol. Obstét.*, **2**, 296.
97. Estop, A.M., Van Kirk, V., and Cieply, K. 1995, *Cytogenet. Cell Genet.*, **70**, 80.
98. Templado, C., Navarro, J., Benet, J., Genesca, A., Perez, M.M., and Egozcue, J. 1988, *Hum. Genet.*, **79**, 24.
99. Martin, R.H. and Spriggs, E.L. 1995, *Clin. Genet.*, **47**, 42.
100. Estop, A.M., Cieply, K.M., Munne, S., and Feingold, E. 1999, *Hum. Genet.*, **104**, 412.
101. Van Assche, E., Staessen, C., Vegetti, W., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. 1999, *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 682.
102. Geneix, A., Schubert, B., Force, A., Rodet, K., Briançon, G., and Boucher, D. 2002, *Hum. Reprod.*, **17**, 325.
103. Escudero, T., Abdelhadi, I., Sandalinas, M., and Munne, S. 2003, *Fertil. Steril.*, **79**, 1528.
104. Morel, F., Fellman, F., Roux, C., and Bresson, J.L. 2001, *Cytogenet. Cell Genet.*, **92**, 63.
105. Boué, A. and Gallano, P. 1984, *Prenat. Diagn.*, **4**, 45.
106. Pellestor, F., Sele, B., and Jalbert, H. 1987, *Hum. Genet.*, **76**, 116.
107. Martin, R.H. 1988, *Hum. Genet.*, **80**, 357.
108. Ogawa, S., Araki, S., Araki, Y., Ohno, M., and Sato, I. 2000, *Hum. Reprod.*, **15**, 1136.
109. Syme, R.M. and Martin, R.H. 1992, *Hum. Reprod.*, **7**, 825.
110. Luciani, J.M., Guichaoua, M.R., Mattei, A., and Morazzani, M.R. 1984, *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 14.
111. Escudero, T., Lee, M., Carrel, D., Blanco, J., and Munne, S. 2000, *Prenat. Diagn.*, **20**, 599.
112. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. 2004, *Hum. Reprod.*, **19**, 1345.
113. Anahory, T., Hamamah, S., Andreo, B., Hedon, B., Claustres, M., Sarda, P., and Pellestor, F. 2005, *Hum. Reprod.*, **20**, 1850.
114. Frydman, N., Romana, S., Le Lorc'h, M., Vekemans, M., Frydman, R., and Tachdjian, G. 2001, *Hum. Reprod.*, **16**, 2274.
115. Morel, F., Douet-Guilbert, N., Roux, C., Tripogney, C., Le Bris, M.J., De Braekeleer, M., and Bresson, J.L. 2004, *Fertil. Steril.*, **81**, 682.
63. Morel, F., Douet-Guilbert, N., Moerman, A., Duban, B., Marchetti, C., Delobel, B., Le Bris, M.J., Amice, V., and De Braekeleer, M. 2004, *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 835.
64. Shi, Q. and Martin, R.H. 2001, *Reproduction*, **121**, 655.
65. Yurov, Y.B., Saitas, M.J., Vorsanova, S.G., Erny, R., Soloviev, I.V., Sharonin, V.O., Guichaoua, M.R., and Luciani, J.M. 1996, *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 665.
66. In't Veld, P.A., Broekmans, F.J., de France, H.F., Pearson, P.L., Pieters, M.H., and van Kooij, R.J. 1997, *Hum. Reprod.*, **12**, 752.
67. Weissenberg, R., Aviram, A., Golan, R., Lewin, L.M., Levron, J., Madgar, I., Dor, J., Barkai, G., and Goldman, B. 1998, *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 61.
68. Banzaacken, B., Gavelle, F.M., Martin-Pont, B., Dupuy, O., Lievre, N., Hugues, J.N., and Wolf, J.P. 2001, *Hum. Reprod.*, **16**, 2646.
69. Devillard, F., Metzler-Guillemain, C., Pelletier, R., DeRobertis, C., Bergues, U., Hennebicq, S., Guichaoua, M., Sele, B., and Rousseaux, S. 2002, *Hum. Reprod.*, **17**, 1292.
70. Lewis-Jones, I., Aziz, N., Seshadri, S., Douglas, A., and Howard, P. 2003, *Fertil. Steril.*, **79**, 212.
71. Vicari, E., De Palma, A., Burrello, N., Longo, G., Grazioso, C., Barone, N., Zahi, M., D'Agata, R., and Calogero, A.E. 2003, *J. Androl.*, **24**, 598.
72. Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M.M., Bonduelle, M., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. 2000, *Hum. Reprod.*, **15**, 351.
73. Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Romeo, R., Rappazzo, G., and D'Agata, R. 2001, *Hum. Reprod.*, **16**, 1172.
74. Martin, R.H. 2003, *Biol. Reprod.*, **69**, 535.
75. Bonduelle, M., Camus, M., De Vos, A., Staessen, C., Tournaye, H., Van Assche, E., Verheyen, G., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. 1999, *Hum. Reprod.*, **14** (suppl 1), 243.
76. Bernardini, L., Gianaroli, L., Fortini, D., Conte, N., Magli, C., Cavani, S., Gaggero, G., Tindiglia, C., Ragni, N., and Venturini, P.L. 2000, *Hum. Reprod.*, **15**, 2165.
77. Levron, J., Aviram-Goldring, A., Madgar, I., Raviv, G., Barkai, G., and Dor, J. 2001, *Mol. Cell. Endocrinology*, **183**, S23-S28.
78. Palermo, G.D., Colombero, L.T., Hariprashad, J.J., Schlegel, P.N., and Rosenwaks, Z. 2002, *Hum. Reprod.*, **17**, 570.
79. Rodrigo, L., Rubio, C., Mateu, E., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A., and Gil-Salom, M. 2004, *Hum. Reprod.*, **19**, 118.
80. Burrello, N., Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Torrioni, C., Barone, N., Pafumi, C., D'Agata, R., and Vicari, E. 2002, *Eur. J. Hum. Genet.*, **10**, 362.
81. Burrello, N., Vicari, E., and Calogero, A.E. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, **111**, 363.
82. De Braekeleer, M. and Dao, T.N. 1991, *Cytogenetic studies in human spontaneous abortions*. E.S.E.Hafez (Ed.), Assisted human reproductive technology. Hemisphere Publ. Co., New York, pp. 41-45.
83. De Braekeleer, M. and Dao, T.N. 1991, *Hum. Reprod.*, **6**, 245.
84. Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M.J., Amice, V., Le Martelet, M.T., Roche, S., Valéri, A., Derrien, V., Amice, J., and De Braekeleer, M. 2004, *Int. J. Andrology*, **27**, 178.
85. Spriggs, E.L., Martin, R.H., and Hulten, M. 1992, *Hum. Genet.*, **88**, 447.
86. Pellestor, F., Girardet, A., Coignet, L., Andreo, B., Lefort, G., and Charlieu, J.P. 1997, *Cytogenet. Cell Genet.*, **78**, 202.

148. Morel, F., Amice, V., Roux, C., Le Martelot, M.T., Bresson, J.L., Amice, J., Le Bris, M.J., De Braekeleer, M., and Douet-Guilbert, N. 2005, *Hum. Reprod.*, 20, i186.
149. Mikhaail-Philips, M.M., McGillivray, B.C., Hamilton, S.J., Ko, E., Chernos, J., Rademaker, A., and Martin, R.H. 2005, *Hum. Genet.*, 117, 357.
150. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. 2005, *Cytogenet. Genome Res.*, 111, 297.
151. Kaplan, H., Aspillaga, M., Shelley, T.F., and Gardner, L.I. 1963, *Lancet*, 1, 506.
152. Terzoli, G., Lalatta, F., Lobbiani, A., Simoni, G., and Colucci, G. 1992, *Fertil. Steril.*, 58, 821.
153. Harari, O., Bourne, H., Baker, G., Gronow, M., and Johnston, I. 1995, *Fertil. Steril.*, 63, 182.
154. Tourmaye, H., Staessen, C., Liebaers, I., Van Assche, E., Devroey, P., Bonduelle, M., and Van Steirteghem, A. 1996, *Hum. Reprod.*, 11, 1644.
155. Hinney, B., Guttentbach, M., Schmid, M., Engel, W., and Michelmann, H.W. 1997, *Fertil. Steril.*, 68, 718.
156. Nodar, F., De Vincentiis, S., Olmedo, S.B., Papier, S., Urrutia, F., and Acosta, A.A. 1999, *Fertil. Steril.*, 71, 1149.
157. Ron-El, R., Friedler, S., Strassburger, D., Komarovskiy, D., Schachter, M., and Raziel, A. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 368.
158. Ron-El, R., Raziel, A., Strassburger, D., Schachter, M., Bern, O., and Friedler, S. 2000, *Fertil. Steril.*, 74, 832.
159. Poulakis, V., Witzsch, U., Diehl, W., de Vries, R., Becht, E., and Trottnow, S. 2001, *Fertil. Steril.*, 76, 1060.
160. Rosenlund, B., Hreinsson, J.G., and Hovatta, O. 2002, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 19, 149.
161. Denschlag, D., Tempfer, C., Kunze, M., Wolff, G., and Keck, C. 2004, *Fertil. Steril.*, 82, 775.
162. Schiff, J.D., Palermo, G.D., Veeck, L.L., Goldstein, M., Rosenwaks, Z., and Schlegel, P.N. 2005, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 6263.
163. Kjeseller, B. 1966, *Monogr. Hum. Genet.*, 2, 1.
164. Luciani, J.M., Mattei, A., Devictor-Vuillet, M., Rubin, P., Stahl, A., and Vague, J. 1970, *Ann. Génét.*, 13, 249.
165. Laurent, C., Papathanassiou, Z., Haour, P., and Cognat, M. 1973, *Andrologie*, 5, 193.
166. Rajendra, B.R., Lee, M., Amorosa, L., and Sciorra, L.J. 1981, *Am. J. Med. Genet.*, 10, 119.
167. Vidal, F., Navarro, J., Templado, C., Brusadin, S., and Egozcue, J. 1984, *Hum. Genet.*, 66, 306.
168. Skakkebaek, N.E., Philip, J., and Hammen, R. 1969, *Nature*, 221, 1075.
169. Cozzi, J., Chevret, E., Rousseaux, S., Pelletier, R., Benitz, V., Jalbert, H., and Sele, B. 1994, *Hum. Genet.*, 93, 32.
170. Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. 2001, *Hum. Reprod.*, 16, 887.
171. Giltay, J.C., van Golde, R.J., and Kastrop, P.M. 2000, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 151.
172. Kruse, R., Guttentbach, M., Schartmann, B., Schubert, R., van der Ven, H., Schmid, M., and Propping, P. 1998, *Fertil. Steril.*, 69, 482.
116. Rives, N., Ravel, C., Duchesne, V., Siffroi, J.P., Mousset-Siméon, N., and Mace, B. 2005, *J. Hum. Genet.*, 50, 360.
117. Acar, H., Yildirim, M.S., Cora, T., and Ceylaner, S. 2002, *Mol. Reprod. Dev.*, 63, 232.
118. Balkan, W., and Martin, R.H. 1983, *Am. J. Med. Genet.*, 16, 169.
119. Rousseaux, S., Chevret, E., Monteil, M., Cozzi, J., Pelletier, R., Delafontaine, D., and Sele, B. 1995, *Hum. Genet.*, 96, 655.
120. Honda, H., Miharu, N., Samura, O., He, H., and Ohama, K. 2000, *Hum. Genet.*, 106, 188.
121. Mennicke, K., Diercks, P., Schlieker, H., Bals-Pratsch, M., Al Hasani, S., Diedrich, K., and Schwinger, E. 1997, *Int. J. Andrology*, 20, 11.
122. Martin, R.H., McInnes, B., and Rademaker, A.W. 1999, *Zygote*, 7, 131.
123. Egozcue, J., Blanco, J., Anton, E., Egozcue, S., Sarate, Z., and Vidal, F. 2003, *Placenta*, 24, S62-S65.
124. Frydman, N., Benkhalifa, M., Hamamah, S., Rodrigues, D., Ledee, N., Frydman, R., and Tachdjian, G. 1999, *Cytogenet. Cell Genet.*, 85, 50.
125. Estop, A.M., Levinson, F., Cieply, K.M., and Van Kirk, V. 1992, *Hum. Genet.*, 89, 425.
126. Cora, T., Acar, H., and Kaynak, M. 2002, *Journal of Andrology*, 23, 793.
127. Anton, E., Vidal, F., Egozcue, J., and Blanco, J. 2004, *Reprod. Biomed. Online*, 9, 637.
128. Kaiser, P. 1984, *Hum. Genet.*, 68, 1.
129. Fryns, J.P., Kleczkowska, A., and Van den Berghe, H. 1986, *Hum. Genet.*, 73, 205.
130. Jacobs, P.A., Browne, C., Gregson, N., Joyce, C., and White, H. 1992, *J. Med. Genet.*, 29, 103.
131. Guichaoua, M.R., Delafontaine, D., Taurelle, R., Taillemite, J.L., Morazzani, M.R., and Luciani, J.M. 1986, *Chromosoma*, 93, 313.
132. Callen, D.F., Woollatt, E., and Sutherland, G.R. 1985, *Clin. Genet.*, 28, 87.
133. Mules, E.H. and Stamber, J. 1984, *Hum. Genet.*, 67, 126.
134. Stahl, A. and Hartung, M. 1981, *Ann. Génét.*, 24, 69.
135. Laurie, D.A. and Hulten, M.A. 1985, *Ann. Hum. Genet.*, 49, 203.
136. Winsor, E.J., Palmer, C.G., Ellis, P.M., Hunter, J.L.P., and Ferguson-Smith, M.A. 1978, *Cytogenet. Cell Genet.*, 20, 169.
137. Ashley, T. 1988, *Genetics*, 118, 307.
138. de Perdigo, A., Gabriel-Robez, O., and Rumpfer, Y. 1989, *Hum. Genet.*, 83, 274.
139. Martin, R.H. 1999, *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1480.
140. Brown, G.M., Leversha, M., Hulten, M., Ferguson-Smith, M.A., Affara, N.A., and Furlong, R.A. 1998, *Am. J. Hum. Genet.*, 62, 1484.
141. Jaarola, M., Martin, R.H., and Ashley, T. 1998, *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 218.
142. Martin, R.H. 1993, *Cytogenet. Cell Genet.*, 62, 199.
143. Martin, R.H., Chernos, J.E., Lowry, R.B., Pattinson, H.A., Barclay, L., and Ko, E. 2005, *Hum. Genet.*, 93, 135.
144. Martin, R.H. 1991, *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 856.
145. Jenderny, J., Gebauer, J., Rohrborn, G., and Ruger, A. 1992, *Hum. Genet.*, 89, 117.
146. Navarro, J., Benet, J., Martorell, M.R., Templado, C., and Egozcue, J. 1993, *Am. J. Hum. Genet.*, 53, 214.
147. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. 2002, *Cytogenet. Genome Res.*, 97, 149.

201. Lejeune, J. 1965, *Ann. Génét.*, 8, 9.
202. Pellestor, F., Imbert, I., Andreo, B., and Lefort, G. 2001, *Hum. Reprod.*, 16, 1155.
203. Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M.J., Herry, A., Amice, V., Amice, J., and De Braekeleer, M. 2004, *Int. J. Andrology*, 27, 200.
204. Smith, C.A.B. 1986, *Ann. Hum. Genet.*, 50, 163.
205. De Braekeleer, M. and Smith, B. 1988, *Ann. Hum. Genet.*, 52, 63.
206. Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. 2000, *Hum. Genet.*, 106, 500.
207. Baccetti, B., Collodel, G., Marzella, R., Moretti, E., Piomboni, P., Scapigliati, G., and Serafini, F. 2005, *Hum. Reprod.*, 20, 2295.
208. Machev, N., Gosset, P., Warter, S., Treger, M., Schillingier, M., and Viville, S. 2005, *Fertil. Steril.*, 84, 365.
209. Honda, H., Miharu, N., Ohashi, Y., Honda, N., Hara, T., and Ohama, K. 1999, *Hum. Genet.*, 105, 428.
210. Estop, A.M., Cieply, K., Munne, S., Surti, U., Wakim, A., and Feingold, E. 2000, *Hum. Genet.*, 106, 517.
211. Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Codina-Pascual, M., Abad, C., Guitart, M., Egozcue, J., and Benet, J. 2004, *Hum. Reprod.*, 19, 2515.
212. Canki, N. and Dutrillaux, B. 1979, *Hum. Genet.*, 47, 261.
213. Fryns, J.P. and Van den Berghe, H. 1980, *Hum. Genet.*, 54, 413.
214. Amiel, A., Sardos-Albertini, F., Feigin, M.D., Shatony, R., Diukman, R., and Bartoov, B. 2001, *Hum. Genet.*, 46, 245.
215. Guttenbach, M., Michelmann, H.W., Hinney, B., Engel, W., and Schmid, M. 1997, *Hum. Genet.*, 99, 474.
216. Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Stella, M., and Scandellari, C. 1998, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 203.
217. Estop, A.M., Munne, S., Cieply, K.M., Vandermark, K.K., Lamb, A.N., and Fisch, H. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 124.
218. Okada, H., Fujioka, H., Tatsumi, N., Kanzaki, M., Okuda, Y., Fujisawa, M., Hazama, M., Matsumoto, O., Gohji, K., Arakawa, S., and Kamidono, S. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 946.
219. Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Marin, P., Rossato, M., Garolla, A., and Ferlin, A. 1999, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 3807.
220. Levron, J., Aviram-Goldring, A., Madgar, I., Raviv, G., Barkai, G., and Dor, J. 2000, *Fertil. Steril.*, 74, 925.
221. Hennebicq, S., Pelletier, R., Bergues, U., and Rousseaux, S. 2001, *Lancet*, 357, 2104.
222. Sinha Hikim, A.P. and Swerdloff, R.S. 1999, *Rev. Reprod.*, 4, 38.
223. Sakkas, D., Mariehoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., and Bianchi, U. 1999, *Rev. Reprod.*, 4, 31.
224. Billig, H., Chun, S.Y., Eisenhauer, K., and Hsueh, A.J.W. 1996, *Hum. Reprod. Update*, 2, 103.
225. Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., and Melamed, M.R. 1980, *Science*, 210, 1131.
226. Ward, W.S. 1994, *J. Cell. Biochem.*, 55, 77.
227. Kramer, J.A. and Krawetz, S.A. 1997, *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 473.
228. Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., and Clausen, O.P. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 1039.
229. Agarwal, A. and Said, T.M. 2003, *Hum. Reprod. Update*, 9, 331.
173. Morel, F., Roux, C., and Bresson, J.L. 2000, *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 566.
174. Mroz, K., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. 1999, *Hum. Reprod.*, 14, 1151.
175. Morel, F., Bernicot, I., Herry, A., Le Bris, M.J., Amice, J., Parent, P., Le Martelot, M.T., Roche, S., and De Braekeleer, M. 2003, *Fertil. Steril.*, 79, 126.
176. Rives, N., Joly, G., Machy, A., Simeon, N., Leclerc, P., and Mace, B. 2000, *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 107.
177. Pearson, P.L. and Bobrow, M. 1970, *J. Reprod. Fertil.*, 22, 177.
178. Hulten, M. and Pearson, P.L. 1971, *Ann. Hum. Genet.*, 34, 273.
179. Luciani, J.M., Vagner-Capodano, A.M., Devictor-Vuillet, M., Aubert, L., and Stahl, A. 1973, *Clin. Genet.*, 4, 415.
180. Chandley, A.C., Fletcher, J., and Robinson, J.A. 1976, *Hum. Genet.*, 33, 231.
181. Solari, A.J. and Rey Valzacchi, G. 1997, *Chromosome Research*, 5, 467.
182. Mercier, S., Morel, F., Roux, C., Clavequin, M.C., and Bresson, J.L. 1996, *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 485.
183. Han, T.H., Ford, J.H., Flaherty, S.P., Webb, G.C., and Matthews, C.D. 1994, *Clin. Genet.*, 45, 67.
184. Martini, E., Geraedts, J.P., Liebaers, I., Land, J.A., Capitanio, G.L., Ramaekers, F.C., and Hopman, A.H. 1996, *Hum. Reprod.*, 11, 1638.
185. Blanco, J., Rubio, C., Simon, C., Egozcue, J., and Vidal, F. 1997, *Hum. Genet.*, 99, 413.
186. Wang, J.Y., Samura, O., Zhen, D.K., Cowan, J.M., Cardone, V., Cardone, V., Summers, M., and Bianchi, D.W. 2000, *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 665.
187. Chevret, E., Rousseaux, S., Monteil, M., Usson, Y., Cozzi, J., Pelletier, R., and Sele, B. 1997, *Hum. Genet.*, 99, 407.
188. Guttenbach, M., Engel, W., and Schmid, M. 1997, *Hum. Genet.*, 100, 1.
189. Rives, N., Simeon, N., Milazzo, J.P., Barthelemy, C., and Mace, B. 2003, *Int. J. Andrology*, 26, 242.
190. Gabriel-Robez, O., Delobel, B., Croquette, M.F., Rigot, J.M., Dilelati, R., and Rumpfer, Y. 1996, *Ann. Génét.*, 39, 129.
191. Nicolaidis, P. and Petersen, M.B. 1998, *Hum. Reprod.*, 13, 313.
192. Antonarakis, S.E. 1993, *Trends in Genetics*, 9, 142.
193. Fisher, J.M., Harvey, J.F., Morton, N.E., and Jacobs, P.A. 1995, *Am. J. Hum. Genet.*, 56, 669.
194. Robinson, W.P., Bemasconi, F., Dutly, F., Lefort, G., Romain, D.R., Binkert, F., and Schimzel, A.A. 1996, *Am. J. Med. Genet.*, 61, 158.
195. Van Steirteghem, A., Bonduelle, M., Liebaers, I., and Devroey, P. 2002, *Am. J. Perinatology*, 19, 59.
196. Samli, H., Solal, M., Imirzalioglu, N., Beyatir, Y., Simsek, S., and Kahraman, S. 2003, *Prenat. Diagn.*, 23, 847.
197. Lam, R., Ma, S., Robinson, W.P., Chan, T., and Ho Yuen, B. 2001, *Fertil. Steril.*, 76, 1272.
198. Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. 2002, *Hum. Reprod.*, 17, 2600.
199. Causio, F., Fischetto, R., Sarcina, E., Geusa, S., and Tartagni, M. 2002, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 105, 44.
200. Douet-Guilbert, N., Le Bris, M.J., Amice, V., Marchetti, C., Delobel, B., Amice, J., De Braekeleer, M., and Morel, F. 2005, *Int. J. Andrology*, 28, 372.

255. Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., Leiter, G., and The Danish First Pregnancy Planner Study Team. 2000. *Fertil. Steril.*, 73, 43.
256. Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., and Evenson, D.P. 2000. *Hum. Reprod.*, 15, 1717.
257. Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T., and Evenson, D.P. 2003. *Fertil. Steril.*, 80, 895.
258. Virro, M.R., Larson-Cook, K.L., and Evenson, D.P. 2004. *Fertil. Steril.*, 81, 1289.
259. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leiter, G., Ciriminna, R., Cullasso, F., Dondero, F., Lenzi, A., and Spano, M. 2004. *Hum. Reprod.*, 19, 1409.
260. Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., and Giwercman, A. 2004. *Hum. Reprod.*, 19, 1401.
261. Host, E., Lindenbergh, S., and Smidt-Jensen, S. 2000. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 79, 559.
262. Carrell, D.T., Liu, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Erickson, L., and Campbell, B. 2003. *Arch. Androl.*, 49, 49.
263. Carrell, D.T., Wilcox, A.L., Lowy, L., Peterson, M., Jones, K.P., Erickson, L., Campbell, B., Branch, W., and Hatasaka, H.H. 2003. *Obstet. Gynecol.*, 101, 1229.
264. Duran, E.H., Morshedi, M., Taylor, S., and Oehninger, S. 2002. *Hum. Reprod.*, 17, 3122.
265. Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., Meriano, J., and Casper, R.F. 1998. *Fertil. Steril.*, 69, 528.
266. Henkel, R., Kierspel, E., Hájimohammad, M., Staf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W.B., and Kruger, T.F. 2003. *Reprod. Biomed. Online*, 7, 477.
267. Benchaib, M., Braun, V., Lomage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., and Guérin, J.F. 2003. *Hum. Reprod.*, 18, 1023.
268. Rubes, J., Selevan, S.G., Evenson, D.P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W.A., and Perreault, S.D. 2005. *Hum. Reprod.*, 20, 2776.
269. Guérin, J.F. and Benchaib, M. 2003. *Gynecol. Obstét. Fertil.*, 31, 1058.
270. Boyer, P. and Boyer-Gervoise, M. 2003. *Gynecol. Obstét. Fertil.*, 31, 1060.
271. Lim, A.S.T. and Tsakok, M.F.H. 1997. *Fertil. Steril.*, 68, 265.
272. Lopes, S., Jurisicova, A., and Casper, R.F. 1998. *Hum. Reprod.*, 13, 703.
273. Balkan, W. and Martin, R.H. 1983. *Hum. Genet.*, 63, 345.
274. Brandriff, B., Gordon, L., Ashworth, L.K., Littman, V., Watchmaker, G., and Carrano, A.V. 1986. *Am. J. Hum. Genet.*, 38, 197.
275. Martin, R.H. 1988. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47, 48.
276. Martin, R.H., McGillivray, B., Barclay, L., Hildebrand, K., and Ko, E. 1990. *Hum. Reprod.*, 5, 606.
277. Martin, R.H., Barclay, L., Hildebrand, K., Ko, E., and Fowlow, S.B. 1990. *Hum. Genet.*, 86, 33.
278. Templado, C., Navarro, J., Requena, R., Benet, J., Ballesta, F., and Egozcue, J. 1990. *Hum. Genet.*, 84, 159.
279. Jenderny, J. 1992. *Hum. Genet.*, 90, 171.
280. Martin, R.H. 1992. *Cytogenet. Cell Genet.*, 60, 18.
281. Martin, R.H. and Hulten, M. 1993. *Hereditas*, 118, 165.
282. Martin, R.H. 1994. *Hum. Reprod.*, 9, 1512.
230. Perreault, S.D., Aitken, R.J., Baker, H.W., Evenson, D.P., Huszar, G., Irvine, D.S., Morris, I.D., Morris, R.A., Robbins, W.A., Sakkas, D., Spano, M., and Wyrobek, A.J. 2003. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 518, 253.
231. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. 1988. *Exp. Cell Res.*, 175, 184.
232. Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., and Thompson, W. 1996. *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 613.
233. Haines, G., Marples, B., Daniel, P., and Morris, I. 1998. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 444, 79.
234. Bianchi, P.G., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Bianchi, U., and Sakkas, D. 1993. *Biol. Reprod.*, 49, 1083.
235. Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., and Sakkas, D. 1995. *Biol. Reprod.*, 52, 864.
236. Evenson, D.P., Larson, K.L., and Jost, L.K. 2002. *J. Androl.*, 23, 25.
237. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. 1992. *J. Cell Biol.*, 119, 493.
238. Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., and Darzynkiewicz, Z. 1993. *Exp. Cell Res.*, 207, 202.
239. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., and Lenzi, A. 2000. *Hum. Reprod.*, 15, 830.
240. Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., and Aitken, R.J. 2000. *J. Androl.*, 21, 33.
241. Muratori, M., Maggi, M., Spinelli, S., Filimberti, E., Forti, G., and Baldi, E. 2003. *J. Androl.*, 24, 253.
242. Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., Nelson, D.R., and Thomas, A.J. 2003. *Fertil. Steril.*, 79, 1597.
243. Sun, J.G., Jurisicova, A., and Casper, R.F. 1997. *Biol. Reprod.*, 56, 602.
244. Giwercman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J.P., Jepson, K., Frohm, B., and Spano, M. 2003. *Fertil. Steril.*, 80, 1404.
245. Lachaud, C., Tesarik, J., Canadas, M.L., and Mendoza, C. 2004. *Hum. Reprod.*, 19, 607.
246. Huang, C.C., Lin, D.P.C., Tsao, H.M., Cheng, T.C., Liu, C.H., and Lee, M.S. 2005. *Fertil. Steril.*, 84, 130.
247. Sills, E.S., Fryman, J.T., Perloe, M., Michels, K.B., and Tucker, M.J. 2004. *J. Obstet. Gynaecol.*, 24, 74.
248. Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G., and Maggi, M. 2000. *J. Androl.*, 21, 903.
249. McVicar, C.M., McClure, N., Williamson, K., Dalzell, L.H., and Lewis, S.E.M. 2004. *Fertil. Steril.*, 81, 767.
250. Shen, H.M., Dai, J., Chia, S.E., Lim, A., and Ong, C.N. 2002. *Hum. Reprod.*, 17, 1266.
251. Oosterhuis, G.J.E., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J., and Vermes, I. 2000. *Fertil. Steril.*, 74, 245.
252. Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., and Bleau, G. 2005. *Hum. Reprod.*, 20, 3446.
253. Morris, I.D., Iltot, S., Dixon, L., and Brison, D.R. 2002. *Hum. Reprod.*, 17, 990.
254. Tomsu, M., Sharma, V., and Miller, D. 2002. *Hum. Reprod.*, 17, 1856.

283. Cifuentes, P., Navarro, J., Blanco, J., Vidal, F., Miguez, L., Egozcue, J., and Benet, J. 1999, *Eur. J. Hum. Genet.*, 7, 231.
284. Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Codina-Pascual, M., Carrera, M., Egozcue, J., and Benet, J. 2001, *Eur. J. Hum. Genet.*, 9, 395.
285. Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Carrera, M., Egozcue, J., and Benet, J. 2002, *Mol. Hum. Reprod.*, 8, 958.
286. Cifuentes, P., Navarro, J., Miguez, L., Egozcue, J., and Benet, J. 1998, *Cytogenet. Cell Genet.*, 82, 204.
287. Prigent, Y. and Viguié, F. 1996, IXème Colloque de l'Association des Cytogénétiens de Langue Française, Paris.
288. Estop, A.M., Cieply, K.M., Wakim, A., and Feingold, E. 1998, *Cytogenet. Cell Genet.*, 83, 193.
289. Blanco, J., Egozcue, J., Clusellas, N., and Vidal, F. 1998, *Cytogenet. Cell Genet.*, 83, 275.
290. Mercier, S., Morel, F., Fellman, F., Roux, C., and Bresson, J.L. 1998, *Hum. Genet.*, 102, 446.
291. Martini, E., Von Bergh, A.R.M., Coonen, E., de Die-Smulders, C.E.M., Hopman, A.H.N., Ramaekers, F.C.S., and Geraedts, J.P.M. 1998, *Hum. Genet.*, 102, 157.
292. Giltay, J.C., Kastrop, P.M.M., Tiemessen, C.H.J., Van Inzen, W.G., Scheres, J.M.J.C., and Pearson, P.L. 1999, *Cytogenet. Cell Genet.*, 84, 67.
293. Lim, A.S., Lim, T.H., Kee, S.K., Chieng, R., and Tay, S.K. 2003, *Am. J. Med. Genet.*, 117, 172.
294. Pellestor, F. 1990, *Hum. Genet.*, 85, 49.
295. Martin, R.H., Ko, E., and Hildebrand, K. 1992, *Am. J. Med. Genet.*, 43, 855.
296. Morel, F., Roux, C., and Bresson, J.L. 2001, *Mol. Hum. Reprod.*, 7, 483.
297. Balkan, W., Burns, K., and Martin, R.H. 1983, *Cytogenet. Cell Genet.*, 35, 295.
298. Colls, P., Blanco, J., Martinez-Pasarell, O., Vidal, F., Egozcue, J., Marquez, C., Guitart, M., and Templado, C. 1997, *Hum. Genet.*, 99, 761.
299. Yakut, T., Acar, H., Egeli, U., and Kimya, Y. 2003, *Mol. Reprod. Dev.*, 66, 67.
300. Mikhaail-Philips, M.M., Ko, E., Chernos, J., Greene, C., Rademaker, A., and Martin, R.H. 2004, *Am. J. Med. Genet.*, 127A, 139.
301. Martin, R.H. 1986, *Hum. Genet.*, 73, 97.
302. Devine, D.H., Whitman-Elia, G., Best, R.G., and Edwards, J.G. 2000, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 293.
303. Chevret, E., Rousseaux, S., Montell, M., Usson, Y., Cozzi, J., Pelletier, R., and Sele, B. 1996, *Hum. Genet.*, 97, 171.
304. Lim, A.S., Fong, Y., and Yu, S.L. 1999, *Hum. Genet.*, 104, 405.
305. Bielanska, M., Tan, S.L., and Ao, A. 2000, *Hum. Reprod.*, 15, 440.
306. Shi, Q. and Martin, R.H. 2000, *Am. J. Med. Genet.*, 93, 40.
307. Lim, A.S., Fong, Y., and Yu, S.L. 1999, *Fertil. Steril.*, 72, 121.
308. Rives, N., Jarnot, M., Mousset-Siméon, N., Joly, G., and Mace, B. 2003, *J. Hum. Genet.*, 48, 535.
309. Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Estenoz, M., Gambera, L., and Piomboni, P. 2002, *Fertil. Steril.*, 78, 1127.

## Chapitre de livre 3

Meiotic segregation of structural chromosomal abnormalities during male gametogenesis using fluorescent *in situ* hybridization



## Meiotic segregation of structural chromosomal abnormalities during male gametogenesis using fluorescent *in situ* hybridization

A. Perrin<sup>1,2</sup>, F. Morel<sup>1,2,3</sup>, N. Douet-Guilbert<sup>1,2,3</sup>, M.-J. Le Bris<sup>3</sup>, V. Amice<sup>3</sup>, J. Amice<sup>1,3</sup>

and M. De Braekeleer<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France <sup>2</sup> INSERM-U613, Brest, France <sup>3</sup> Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, France

### ABSTRACT

Many factors are known to influence spermatogenesis, chromosomal abnormalities being perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) studies on sperm nuclei of carriers of a robertsonian translocation show a majority (58–92.84%) of sperm cells with normal or balanced chromosomal equipment. Variations in rates of imbalances have been observed among males carrying a same robertsonian translocation. Although this variability could be related to technical aspects of FISH and scoring, it could also be the consequence of variations in the formation and/or the meiotic behavior of these robertsonian translocations.

The frequencies of unbalanced spermatozoa of carriers of a reciprocal translocation vary from 10.77% to over 80%. The similar segregation profiles for the same translocation, compared with those divergent profiles of the other cases of studied translocations, confirm that the risks of meiotic imbalances vary primarily according to the characteristics of the chromosomes

involved in the rearrangement and the breakpoint position.

FISH studies on sperm nuclei of carriers of a pericentric inversion show the frequency of recombinant spermatozoa to vary from 0 to 37.85%. The probability of a crossover within the inverted segment is affected by the chromosome and region involved, the length of the inverted segment and the location of the breakpoints. As a consequence, the risk of aneuploidy become very important when the inverted segment is >50% of the chromosome length.

In conclusion, studies on spermatozoa from carriers of a chromosomal structural abnormality help the comprehension of the mechanisms of meiotic segregation. They should be integrated in the genetic exploration of infertile men, in order to give them a personalized risk assessment of unbalanced spermatozoa.

### INTRODUCTION

In industrialized countries, 15% to 20% of couples have

---

Corresponding author: Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé Université de Bretagne Occidentale 22, avenue Camille Desmoulin, CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France., E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

fertility problems (1,2). Many factors are known to influence spermatogenesis, chromosomal abnormalities being perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis. In the infertile male population, there is a 2 to 20-times higher probability of having a structural chromosomal abnormality than in the general population (1,3). Generally, these men have a normal phenotype but they can have sperm abnormalities. Notably, it is known that carriers of a chromosomal structural abnormality have a decreased sperm numeration (4).

The majority of chromosomal structural abnormalities observed in the infertile male population consist in robertsonian translocations, reciprocal translocations and inversions. Robertsonian translocations are the most common structural chromosomal abnormalities in humans, with an incidence of 1 in 1085 births (5). They result in the formation of a chromosome composed of the long arms of two acrocentric chromosomes (pairs number 13, 14, 15, 21, and 22) and subsequent loss of their short arms. This loss is without consequence for the carrier because the short arm of the acrocentrics only contain nucleolar organizer (NOR) genes. As a consequence of this fusion, a carrier of a robertsonian translocation has only 45 chromosomes.

Balanced reciprocal translocations are also very common in humans, with an incidence of 1 per 1175 in newborns (5). A reciprocal translocation does not change the amount of chromosomal material, but only the order of the genetic material. These translocations usually involve the exchange of chromosome material between arms of two heterologous chromosomes.

Inversions are structural chromosomal abnormalities resulting of two breaks within a same chromosome followed by 180° rotation and reunion of the inverted segment. Inversions with both breaks in one arm are called "paracentric" inversions, whereas those with breaks on both sides of the centromere are called "pericentric". Pericentric inversions involve all the chromosomes, but most frequently chromosomes 2 and 8. Few pericentric inversions affect heterochromatin only; they are considered as chromosomal polymorphisms. Pericentric inversions are common, with an incidence of 0.012% in newborns. The frequency in the general population is estimated at 1-2% (6). It is thirteen times higher among infertile men than in the general population (1). The incidence of paracentric inversions is much lower (0.002 to 0.049%) (7,8).

Men with chromosomal structural abnormality can produce a variable proportion of unbalanced gametes. As all spermatozoa have fertilization capacity regardless of their chromosomal equipment, it is very important to evaluate the percentage of unbalanced chromosomal spermatozoa to assess the risk of chromosomally unbalanced offspring. Until the late 1980s, the study of meiotic segregation was possible thanks to the heterospecific fecundation of golden hamster oocytes with human spermatozoa. Since 1990, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has been used to study the chromosomal equipment of spermatozoa (3,9).

We report here the meiotic segregation analysis of chromosomes in spermatozoa of men with somatic structural chromosomal abnormality using a FISH analysis performed in our laboratory and review the pertinent literature.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Patients consulting for different indications (infertility, repeated miscarriages, structural chromosomal abnormality in family, birth of a malformed child) were included in this study. Standard cytogenetic analysis of lymphocyte chromosomes revealed a structural chromosomal abnormality for each patient. There were 4 males with a robertsonian translocation, 16 with a reciprocal translocation and 7 with a pericentric inversion.

### Semen analysis

Semen analysis was performed according to WHO guidelines and morphology was examined using strict criteria (10). Prior to the study, all patients were informed of the investigations and gave their written consent.

### Analysis of chromosomal segregation in sperm cells

Sperm samples of all patients were analyzed by FISH with a mix of appropriate probes depending upon the structural abnormality and the breakpoints involved in the rearrangement. The hybridization protocol has been previously described (3). The slides were analyzed using a Zeiss Axio Plan microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (significant *in situ* imaging system) (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

## RESULTS AND DISCUSSION

### ROBERTSONIAN TRANSLOCATIONS

Four men with a robertsonian translocation, three carriers of a rob(13;14)(q10;q10) and one of a rob(14;21)(q10;q10), were studied in our laboratory (Table 1). Between 1631 and 1846 spermatozoa were analyzed for each man. The frequencies of normal or balanced spermatozoa ranged from 78.38% to 91.22%. The alternate mode was the preferential mode of segregation for all 4 carriers.

Results on meiotic segregation of 62 men with a robertsonian translocation using FISH have been previously reported (Table 1). The frequency of non-recombinant spermatozoa varied from 58% to 92.84%, if the patient with a rob(21;21) is excluded.

During meiosis I, in spermatocytes I of carriers of a robertsonian translocation, a trivalent is formed between the derivative chromosome composed of the long arms of two acrocentric chromosomes and both normal acrocentric chromosomes of the same pairs. Because of this configuration, the alternate mode is the preferential segregation mode and the sole allowing the production of chromosomally normal or balanced spermatozoa. The other segregation modes (adjacent and 3:0) produce unbalanced gametes (3).

Variations in rates of imbalances have been observed. Inter-individual variability was demonstrated for different robertsonian translocations involving a same chromosomal pair, such as rob(13;14) (11), rob(13;15) (12) and rob(14;21) (13,14). Although we cannot exclude that this variability could be related to technical aspects of FISH (decondensation and denaturation of sperm nuclei and hybridization efficiency of the different types of probe) and scoring, it could also be the consequence of variations in the formation and/or the meiotic behavior of these robertsonian translocations (15,16). We could hypothesize that the variability in the breakpoint location could explain the variability observed in the sperm parameters, spermatogenesis being variably affected. Indeed, no statistically significant correlation was found among individuals carrying the same translocation between the percentage of unbalanced gametes and sperm numeration, asthenospermia, or teratospermia.

### RECIPROCAL TRANSLOCATIONS

Sixteen men with a reciprocal translocation were studied in our laboratory (Table 2). Between 447 and 10023 spermatozoa were analyzed for each man. The frequencies of normal or balanced spermatozoa ranged from 34.40% to 87.26%. Alternate segregation was the preferential mode, followed by adjacent I, adjacent II, and 3:1 for most of the patients.

Results on meiotic segregation of 66 men with a reciprocal translocation using FISH have been previously reported (Table 2). The proportions of unbalanced gametes, resulting mostly from adjacent I or II modes, varied from 10.77 to 81 %.

In carriers of a balanced reciprocal translocation, during meiosis I, a quadrivalent is formed between the translocated chromosomes and their normal homologues in spermatocytes I at pachytene stage, leading to 5 modes of segregation. The sole segregation mode allowing the production of chromosomally normal or balanced gametes is the alternate mode. The other 4 segregation modes (adjacent I, adjacent II, 3:1 and 4:0) produce chromosomally unbalanced gametes (3).

Important variations in rates of imbalances have been observed in sperm of carriers of a reciprocal translocation. The production of unbalanced gametes depends on the chromosomes involved in the translocation, the breakpoints and the size of the translocated segments (3,17). Frequencies of normal and recombinant gametes are likely to depend upon the size of the translocated segments, the distribution and number of chiasmata. Different genetic background and/or submicroscopic differences in breakpoints localization and/or deletions at the breakpoint sites could also explained the observed inter-individual variability observed in carriers of an apparently identical reciprocal translocation at the cytological level who are not family relatives.

### PERICENTRIC INVERSIONS

Seven men with a pericentric inversion were studied in our laboratory (Table 3) (18,19). The number of spermatozoa analyzed varied greatly, from 69 to 5051. The frequencies of sperm with recombinant chromosomes varied from 0 for the inv(2)(p11q13) to 37.71% for the inv(8)(p12q24.1). There was a significant difference between the frequencies of the recombinant products among the seven pericentric inversion carriers ( $P < 0.001$ ) and also among the three

**Table 1. Meiotic segregation in robertsonian translocation carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa (Cases studied in our laboratory are in bold).**

Robertsonian translocations	Nr of sperm	Mode of segregation			References	
		Alternate Normal or Balanced	Adjacent	Diploid or 3:0 Ambiguous		
<b>rob(13;14)(q10;q10)</b>						
<b>rob(13;14)(q10;q10)</b>	<b>1707</b>	<b>78.38</b>	<b>20.86</b>	<b>0.76</b>	<b>0</b>	<b>This report</b>
<b>rob(13;14)(q10;q10)</b>	<b>1754</b>	<b>91.22</b>	<b>7.69</b>	<b>0.80</b>	<b>0.29</b>	<b>This report</b>
<b>rob(13;14)(q10;q10)</b>	<b>1846</b>	<b>86.67</b>	<b>12.73</b>	<b>0.38</b>	<b>0.22</b>	<b>This report</b>
rob(13;14)(q10;q10)	1016	73.6	23.3	3.1		(24)
rob(13;14)(q10;q10)	1006	77.4	19.1	3.5		(24)
rob(13;14)(q10;q10)	2984	81.34	18.06	0.6		(25)
rob(13;14)(q10;q10)	1109	82.6	16.32	1.08		(25)
rob(13;14)(q10;q10)	1009	88.9	10.8	0.3		(25)
rob(13;14)(q10;q10)	1045	91	9			(26)
rob(13;14)(q10;q10)	1023	80	10			(26)
rob(13;14)(q10;q10)	1008	87.1	12.9			(26)
rob(13;14)(q10;q10)	1361	86.48	12.56	0.44	0.51	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	2901	87.49	12.17	0	0.34	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	1012	83	14.53	0.2	2.27	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	1002	84.53	14.17	0.2	1.1	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	1272	88.13	11.4	0.39	0.08	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	6128	88.23	11.11	0.31	0.34	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	774	87.73	11.63	0.39	0.26	(27)
rob(13;14)(q10;q10)	1001	83.5	16.5	0		(28)
rob(13;14)(q10;q10)	978	85.8	13.5	0.7		(28)
rob(13;14)(q10;q10)	1003	88.5	7.9	3.6		(28)
rob(13;14)(q10;q10)	1629	90.9	8.2	0.7	0.2	(29)
rob(13;14)(q10;q10)	10000	83.6	16.2	0.2		(30)
rob(13;14)(q10;q10)	1096	82.76	16.42	0.82	0	(31)
rob(13;14)(q10;q10)	2006	81.26	16.95	0.90	0.90	(31)
rob(13;14)(q10;q10)	430	78.14	19.53	2.33	0	(31)
rob(13;14)(q10;q10)	516	83.91	14.15	1.55	0.39	(31)
rob(13;14)(q10;q10)	500	81.81	18.6	0.4		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	500	78.40	21.2	0.4		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	1032	85.47	14.33	0		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	507	85.80	13.67	0.59		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	1001	83.52	16.48	0		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	1016	89.47	10.24	0.59		(11)
rob(13;14)(q10;q10)	657	84.32	15.07	0.61		(11)
<b>rob(14;21)(q10;q10)</b>						
<b>rob(14;21)(q10;q10)</b>	<b>1631</b>	<b>84.92</b>	<b>14.47</b>	<b>0.61</b>	<b>0</b>	<b>This report</b>
rob(14;21)(q10;q10)	1116	72.22	18.01	0.8	8.97	(13)
rob(14;21)(q10;q10)	16578	88.42	11.25	0.18	0.15	(14)
rob(14;21)(q10;q10)	1033	91.3	8.7			(26)
rob(14;21)(q10;q10)	1075	92.8	7.2			(26)
rob(14;21)(q10;q10)	963	93	7			(26)
rob(14;21)(q10;q10)	10000	82.2	17.5	0.3		(30)
rob(14;21)(q10;q10)	10000	86.7	12.9	0.4		(30)

rob(14;21)(q10;q10)	996	87.85	11.85	0	0.3	(11)
rob(14;21)(q10;q10)	1102	85.66	12.79	1.27	0.27	(11)
<b>rob(13;15)(q10;q10)</b>						
rob(13;15)(q10;q10)	1281	78.13	20.24	1.63		(32)
rob(13;15)(q10;q10)	1021	76.0	23.4	0.6		(28)
rob(13;15)(q10;q10)	891	77.55	20.43	1.01		(12)
rob(13;15)(q10;q10)	5000	91.12	8.26	0.62		(12)
rob(13;15)(q10;q10)	1109	82.69	17.04	0.18	0.09	(11)
rob(13;15)(q10;q10)	1021	76.0	23.41	0.59	0	(11)
<b>rob(14;15)(q10;q10)</b>						
rob(14;15)(q10;q10)	5000	92.84	6.74	0.42		(12)
rob(14;15)(q10;q10)	5000	92.32	7.16	0.52		(12)
rob(14;15)(q10;q10)	819	81.56	15.75	1.95	0.73	(11)
rob(14;15)(q10;q10)	1548	86.43	12.79	0.58	0.19	(11)
<b>rob(13;21)(q10;q10)</b>						
rob(13;21)(q10;q10)	10223	88.39	11.08	0.26	0.26	(33)
rob(13;21)(q10;q10)	10000	85.6	13.7	0.7		(30)
rob(13;21)(q10;q10)	5985	86.88	11.70	0.75	0.67	(31)
<b>rob(14;22)(q10;q10)</b>						
rob(14;22)(q10;q10)	5087	78.53	20.94	0.53		(34)
rob(14;22)(q10;q10)	5237	79.01	20.42	0.57		(34)
rob(14;22)(q10;q10)	5428	79.36	20.03	0.61		(34)
rob(14;22)(q10;q10)	5152	80.51	18.87	0.54	0.08	(31)
<b>rob(13;22)(q10;q10)</b>						
rob(13;22)(q10;q10)	7052	86.7	12.79	0.51		(35)
<b>rob(21;22)(q10;q10)</b>						
rob(21;22)(q10;q10)	350	58	36	0	4	(36)
rob(21;22)(q10;q10)	1016	85.7	13.6	0.7		(28)
rob(21;22)(q10;q10)	1016	85.63	13.29	0.69	0.39	(11)
<b>rob(21;21)(q10;q10)</b>						
rob(21;21)(q10;q10)	2230	100% unbalanced spermatozoa (nullisomy or disomy 21)				(37)

men heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 8 ( $P < 0.001$ ). The frequencies of the two types of recombinant products (dup q/del p or del q/dup p) were not statistically different from the expected 1:1 ratio ( $P > 0.05$ ).

Results on meiotic segregation of eleven men with a pericentric inversion using FISH have been previously reported (Table 3). The frequency of recombinant spermatozoa varied from 0% to 37.85%.

During meiosis, the pairing of the normal and inverted chromosomes requires the formation of an inversion loop. Loop formation and synapsis were observed in

humans heterozygous for inversions using meiotic studies at the pachytene stage (20). An odder number of crossovers within the loop results in one spermatozoon bearing the normal chromosome, one the inverted chromosome and two recombinants with both duplicated and deficient chromosome segments including the regions distal to the inversion (duplication q/deletion p or deletion q/duplication p).

The probability of a crossing-over within the inverted segment is affected by the chromosome and region involved, the length of the inverted segment and the location of the breakpoints. Anton et al. (2005) postulated that the production of a significant level of

Table 2. Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa (Cases studied in our laboratory are in bold).

Reciprocal translocations	Nr of sperm	Mode of segregation						Diploidy or 4:0	Others*	References
		Alternate		Adjacent		3:1				
		Normal	Balanced	I	II					
<i>Autosomal translocations</i>										
<b>t(7;8)(q11.21;cen)</b>	10023	35	27.84	17.61	12.8	6.47	0.28	0	(17)	
<b>t(9;22)(q21;q11.2)</b>	2573	54.68		27.09	11.39	6.02	0.58	0.23	(38)	
<b>45,XV,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3)</b>	981	87.26			9.08	0	1.83	1.83	(39)	
<b>t(1;17)(q31;p12)</b>	2036	49.12		34.43	8.50	7.32	0.29	0.34	This report	
<b>t(8;18)(p22;q21)</b>	1141	48.38		29.45	16.32	5.34	0.09	0.44	This report	
<b>t(4;5)(p15;q12)</b>	1062	45.57		25.71	15.21	8.10	0.47	0.94	This report	
<b>t(7;22)(q32;q12)</b>	2619	41.73		35.66	12.99	7.94	0.19	1.49	This report	
<b>t(10;15)(p14;q26)</b>	2733	43.36		37.29	10.58	8.34	0.10	0.33	This report	
<b>t(3;13)(q27;q11)</b>	546	34.43		22.71	22.34	16.31	0.36	3.85	This report	
<b>t(6;10)(q21;q26)</b>	2150	38.56		35.44	15.54	9.30	0.56	0.60	This report	
<b>t(3;8)(q22;q23)</b>	1788	34.4		35.85	14.99	13.86	0.17	0.73	This report	
<b>t(4;6)(q34;q16.1)</b>	583	39.62		40.14	7.54	12.16	0.51	0	This report	
<b>t(13;17)(q22;q23)</b>	3082	47.30		40.04	7.15	4.89	0.39	0.23	This report	
<b>t(7;9)(p12;p22)</b>	2507	45.43		28.24	16.39	8.06	0.36	1.52	This report	
<b>t(17;19)(q21;p1.3)</b>	2504	40.93		25.28	15.74	17.41	0.24	0.40	This report	
<b>t(1;11)(p36.3;q13.1)</b>	13071	82.45			8.3	9.17	0.06	0.02	(40)	
<b>t(6;11)(q14;p14)</b>	13968	73			9	3	0.1	14.9	(41)	
<b>t(6;11)(q14;p14)</b>	13876	78			8	2.8	0.4	10.8	(41)	
<b>t(2;14)(p23.1;q31)</b>	4610	80			5.2	5.8		9	(41)	
<b>t(1;8)(q33.2;q24.1)</b>	9956	84.9			7.1	7.1	0.7	0.12	(42)	
<b>t(10;12)(q26.1;p13.3)</b>	10049	84.25			10.95	4.42	0.23	0.15	(43)	
<b>t(1;10)(p22.1;q22.3)</b>	4036	90.53			4.86	3.94	0.32	0.35	(44)	
<b>t(14;20)(p11.2;p11.1)</b>	1003	27	24	19	21	4		5	(36)	
<b>t(7;9)(q33;p21)</b>	10658	86			10.44	2.98	0.5	0.08	(45)	

t(7;18)(q35;q11)	10462	77.15		15.91	6.56	0.38		(45)
t(2;18)(p21;q11.2)	3139	43.6	29.8	10.5	12.8	0.5	2.8	(46)
t(8;9)(q24.2;q32)	3118	44.4	41	3.1	9.4	0.6	1.4	(46)
t(5;8)(q33;q13)	10344	45.12	38.31	6.97	6.56	1.23	1.79	(47)
t(7;8)(q11.21;cen)	34527	30.4	26.3	11.1	7.06	0.04		(48)
t(3;11)(q27.3;q24.3)	4029	44.3	15.8	6.6	28.9	0.8	3.6	(49)
t(3;9)(q26.2;q32)	10022	88.35		5.4	5.94	0.14	0.14	(50)
t(3;9)(p25;q32)	10278	89.23		6.02	4.48	0.18	0.12	(50)
t(11;22)(q23;q11)	1925	27.4	17.6	12.5	40.1	0.5	1.9	(51)
t(11;22)(q25;q12)	1012	29.1	21.2	15.1	34.6			(52)
t(4;8)(q28;p23)	6590	30.5	28.5	20.5	19.5			(53)
t(15;17)(q21;q25)		51.2	35.3	8.9	2.8		1.8	(54)
t(15;17)(q21;q25)		49.4	37.7	7.9	3		2	(54)
t(15;17)(q21;q25)	8790	48.1	40.3	8.5	2.4		0.8	(54)
t(15;17)(q21;q25)		52.7	34.4	10.7	1.5		0.7	(54)
t(17;22)(q11;q12)	700	19	12.9	5.8	46.8			(55)
t(1;13)(q42.12;q32.2)	1005	37	29	8.2	23.3		2.6	(23)
t(1;18)(p36;q21)	1000	29.2	9.2	16.6	43.2		1.8	(23)
t(1;6)(p22;p21.3)	1006	37.4	43.1	7.7	10.7		1.1	(23)
t(2;18)(q11.2;q21.1)	1079	31.1	28.8	16	24.2			(23)
t(3;4)(q12;p15.2)	1000	23.9	14.7	24.5	34.2		2.7	(23)
t(5;15)(q35;q22)	1032	45.9	44.1	0.7	8.3		1	(23)
t(6;9)(p12;q13)	1015	23.6	14.1	40.1	21.9		0.4	(23)
t(8;22)(q24.22;q11.21)	1003	23.8	15	19	41.7		0.7	(23)
t(11;22)(q23;q11)	1044	21.8	14.4	31.5	30.3		2	(23)
46,XY,t(3;12)(p14;q24.3)/46,XY	1000	41.3	3.7	18.4	34.8		1.8	(23)
t(15;22)(q22;q13)	1000	18.6	15.9	16	43.3		5.8	(23)
t(2;6)(p12;q24)	7000	49.9	42.4	2.5	4.2			(56)
t(11;22)(q23;q11)	?	42.94	?	?	10		?	(57)
t(11;22)(q23;q11)	?	45	?	?	10		?	(57)
t(2;7)(p11.2;q22)	2500	34.2	33.2	14.9	12.7		5.0	(58)
t(1;2)(q25;q23)	996	56.0	38.8	0.6	4.6	0		(28)
t(2;22)(q33;p11)	1026	53.9	43.8	0.3	2.0	0		(28)
t(1;2)(q42;q21)	1008	45.7	40.5	4.6	9.0	0.2		(28)

t(4;18)(q31.1;p11.2)	1049	46.4	41.3	2.0	10.3	0		(28)
t(4;11)(q35;q13)	1000	33.0	30.0	4.0	32.0	1.0		(28)
t(7;15)(p15.3;q26)	500	37.6	4.6	5.8	51.8	0.2		(28)
t(10;17)(q22.1;q21.3)	1002	58.8	30.2	0.8	10.2	0		(28)
t(11;18)(q23;q23)	1000	59.3	19.3	14.0	4.9	0.7	1.2	(59)
t(11;18)(q22;q21.3)	1007	44.49	28.4	10.13	10.23	0.2	6.55	(59)
t(11;18)(q22;q21.3)	1010	44.55	30.0	15.35	8.32	0.3	1.49	(59)
t(7;13)(q34;q13)	5000	34	23.5	7.2	29.4		5.9	(60)
t(7;10)(q21;q22)	1286	51.3	27.3	12.1	7.5	1.1		(61)
t(15;17)(q11;p12)	1201	40.5	36.3	16.7	6.0	0.3		(61)
t(6;13)(p21.1;q32)	1220	39.5	31	10.3	17	0.9		(61)
t(1;13)(q24;q10)	124	37.1	34.7	11.2	15.2	0.8		(61)
t(1;17)(p11;q11)	1575	53.7	38	7	0	1.3	0	(29)
t(4;6)(q31.1;p25)	1050	54 **	33.6	**	12.2	0.2	0	(29)
t(7;12)(q22;q24.1)	3200	42.9	17.6	10.6	28.6	0.3		(30)
t(3;10)(q23;q24)	3255	54.0	17.1	11.5	17.5	0.4		(30)
t(2;11)(q35;q14)	3300	48.8	16.9	7.6	25.6	1.1		(30)
t(6;17)(p25;q23)	3400	40.7	24.7	11.3	22.1	1.2		(30)
t(4;5)(p15.1;p12)	3500	34.4	24.6	15.5	20.1		5.4	(62)
t(4;5)(p15.1;p12)	3500	34.8	23.1	17.1	19.7		5.3	(62)
<i>X chromosome-autosome translocations</i>								
t(X;18)(q11;p11.1)	447	54.36	8.28	5.14	22.37	2.01	7.83	(63)
<i>Y chromosome-autosome translocations</i>								
t(1;Y)(p34;q12)	191	24	12	64				(36)
t(Y;3)(q12;p21)	450	29.7	67.3			3.0		(29)
t(Y;16)(q11.21;q24)	500	27	24	36	12	1		(64)

\* Ambiguous or non-hybridation

\*\* Including adjacent II

**Table 3. Meiotic segregation in pericentric inversion carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa (Cases studied in our laboratory are in bold).**

Pericentric inversions	Nr of spermatozoa	Size inversion (in %)	Non recombinants		Recombinants		Others	References
			normal	inverted	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)		
<b>inv(1)(p36.3q43)</b>	<b>69</b>	<b>95</b>	<b>68.12</b>		<b>18.84</b>	<b>11.59</b>	<b>1.45</b>	<b>(18)</b>
<b>inv(2)(p11q13)</b>	<b>702</b>	<b>10</b>	<b>99.43</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.57</b>	<b>(18)</b>
<b>inv(8)(p12q21)</b>	<b>3402</b>	<b>31</b>	<b>97</b>		<b>0.44</b>	<b>1.00</b>	<b>1.56</b>	<b>(18)</b>
<b>inv(8)(p12q24.1)</b>	<b>2601</b>	<b>61</b>	<b>60.94</b>		<b>19.99</b>	<b>17.72</b>	<b>1.35</b>	<b>(18)</b>
<b>inv(8)(p23q24)</b>	<b>2045</b>	<b>80</b>	<b>61.03</b>		<b>20</b>	<b>17.7</b>	<b>1.27</b>	<b>(19)</b>
<b>inv(12)(p11q23)</b>	<b>5051</b>	<b>51</b>	<b>91.41</b>		<b>3.98</b>	<b>3.52</b>	<b>1.09</b>	<b>(18)</b>
<b>inv(20)(p12.3q13.33)</b>	<b>625</b>	<b>84</b>	<b>80</b>		<b>8.32</b>	<b>9.92</b>	<b>1.76</b>	<b>(18)</b>
inv(1)(p36q32)	1636	81	82.5		8.7	7.3	1.5	(65)
inv(1)(p31q12)	6006	30	99.62		0.25	0.13		(66)
inv(1)(p22q42)	2133	52	80.1		7.6	7.2	5.1	(67)
inv(2)(p23q33)	915	71	60.98		20.22	17.49	0.98	(68)
inv(2)(p11.2q13)	5460	10	100		0			(21)
inv(4)(p16q21)	6406	42	99.22		0.78			(21)
inv(6)(p23q25)	10049	80	45.7		19.18	18.67	16.45	(69)
inv(8)(p23q22)	3168	62	86.87		6.25	6.88		(66)
inv(10)(p13q22.3)	10723	47	96.59		3.41			(21)
inv(17)(p13.1q25.3)	2000	89	73		0.8	0.6	25.7 *	(70)
inv(21)(p12q22.3)	3400	90	64.4		21.4	11.2	0	(71)

\* 25.1% of other recombinants, 0.5% of disomy and 0.1% of diploidy

**Table 4. Meiotic segregation in paracentric inversion carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa.**

Paracentric inversions	Nr of spermatozoa	Non recombinants		Recombinants	References
		normal	inverted		
inv(2)(q14.2q24.3)	496	99.19		0.81	(72)
inv(4)(p14p15.3)	8158	99.97		0.03	(21)
inv(5)(q13.3q33.1)	4807	45.6	44.7	9.7	(73)
inv(9)(q21.2q34.13)	1608	44.7	42.7	12.6	(73)
inv(11)(q13.2q14.3)	1001	99.7		0.3	(74)
inv(12)(q15q24.1)	1000	99.5		0.5	(74)
inv(14)(q23.2q32.13)	7670	49.6	46.7	3.7	(73)

unbalanced spermatozoa requires the inversion of at least 50% of the chromosome and a minimum size of 100Mb (21).

We plotted the frequency of recombinant spermatozoa according to the relative size of the inversion [calculated as the length of the inversion over that of the whole chromosome based on the diagrams of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1995) and expressed in percentage] of 18 men carrier of a pericentric inversion.

A significant correlation was found ( $R = 0.68$ ,  $P = 0.002$ ). No recombinant chromosomes were produced when the inverted segment involved <30% of the chromosome length (independent of the size of the inverted segment). Between 30 and 50%, few recombinant chromosomes were produced, inducing a slightly increased risk of aneuploidy of recombination in the offspring. The risk of aneuploidy became very important when the inverted segment was >50% of the chromosome length, independently of the size of the inverted segment. These results confirm that the risks

of meiotic imbalances vary essentially according to the relative size of the inverted segment.

#### PARACENTRIC INVERSIONS

Meiotic segregation of six males carrying a paracentric inversion has been reported in the literature (Table 4). These paracentric inversions appear to be associated with a very low risk of aneuploidy, the rate of recombinant spermatozoa being less than 13%. However, other paracentric inversions need to be studied before a good assessment of their impact can be made.

#### CONCLUSIONS

If a spermatozoon has a capacity of fertilization regardless of its chromosomal contents (balanced or not), the highest the production of unbalanced spermatozoa, the highest the risk of producing a chromosomally unbalanced zygote. If a chromosomally unbalanced spermatozoon fertilizes a chromosomally normal oocyte, there could be no implantation or the fetus could be non viable, leading to a spontaneous abortion (22). However, the pregnancy could go to its full term, leading to the birth of an infant with malformations and/or mental retardation. Therefore, it is important to know whether fertilization with an unbalanced spermatozoon could lead to a potentially viable fetus.

These analyses allow us to define the orientation of genetic counseling according to the results of meiotic segregation obtained. Indeed, a couple whom the man has a majority of normal or balanced gametes and a low risk of unbalanced viable fetus could be guided through an ICSI program more easily than couples in the opposite situation. In 2003, Escudero *et al.* analyzed the outcome of preimplantation genetic diagnosis from 11 couples in whose the male had a translocation. They found that, when the chromosomally unbalanced spermatozoa accounted for more than 63% of the total number of spermatozoa, there was no pregnancy (23). It could then be discussed of having recourse to donor sperm or adoption.

In conclusion, studies on spermatozoa from carriers of a chromosomal structural abnormality help the comprehension of the mechanisms of meiotic segregation. They should be integrated in the genetic exploration of infertile men, in order to give them a

personalized risk assessment of unbalanced spermatozoa.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Aurore Perrin is the recipient of a doctoral studentship from the "Région Bretagne".

#### REFERENCES

1. De Braekeleer M, Dao TN. Hum Reprod 1991;6:245-250.
2. Wagner MG, Stephenson PA. Soz Praventivmed 1992;37:213-217.
3. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Int J Androl 2004;27:200-212.
4. Vincent MC, Daudin M, De MP, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F, Calvas P, Bujan L, Bourrouillou G. J Androl 2002;23:18-22.
5. De Braekeleer M, Dao TN (1991): Cytogenetic studies in human spontaneous abortions. In: Assisted human reproductive technology. ESE Hafez, ed. Hemisphere Publ. Co., New York, pp.41-45.
6. Kaiser P. Hum Genet 1984;68:1-47.
7. Fryns JP, Kleczkowska A, Van den Berghe H. Hum Genet 1986;73:205-213.
8. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. J Med Genet 1992;29:103-108.
9. Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, De Braekeleer M (2006): Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: Cytogenetics and Infertility. M De Braekeleer, ed. Transworld Research Network, Trivandrum (India), pp.53-112.
10. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press, 1999.
11. Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Mol Hum Reprod 2006;12:209-215.
12. Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S, Pellestor F. Hum Reprod 2006;21:3193-3198.
13. Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sele B. Hum Genet

- 1995;96:655-660.
14. Honda H, Miharu N, Samura O, He H, Ohama K. *Hum Genet* 2000;106:188-193.
  15. Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, Shaffer LG. *Am J Hum Genet* 2002;71:1456-1462.
  16. Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KH, Shaffer LG. *Hum Mol Genet* 1996;5:1279-1288.
  17. Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL. *Fertil Steril* 2004;81:682-685.
  18. Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. *Hum Reprod* 2007;22:136-141.
  19. Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. *Fertil Steril* 2008;89:1637-1640.
  20. Guichaoua MR, Delafontaine D, Taurelle R, Taillemite JL, Morazzani MR, Luciani JM. *Chromosoma* 1986;93:313-320.
  21. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:297-304.
  22. Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali Franchi P, Tiboni GM. *Hum Reprod* 2005;20:437-442.
  23. Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S. *Fertil Steril* 2003;79:1528-1534.
  24. Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S. *Prenat Diagn* 2000;20:599-602.
  25. Morel F, Roux C, Bresson JL. *Mol Hum Reprod* 2001;7:483-488.
  26. Frydman N, Romana S, Le Lor'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. *Hum Reprod* 2001;16:2274-2277.
  27. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. *Hum Reprod* 2004;19:1345-1351.
  28. Brugnion F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. *Hum Reprod* 2006;21:685-693.
  29. Kekesi A, Erdei E, Torok M, Dravucz S, Toth A. *Fertil Steril* 2007;88:212-11.
  30. Nishikawa N, Sato T, Suzumori N, Sonta S, Suzumori K. *Int J Androl* 2008;31:60-66.
  31. Chen Y, Huang J, Liu P, Qiao J. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:406-411.
  32. Rives N, Ravel C, Duchesne V, Siffroi JP, Mousset-Siméon N, Mace B. *J Hum Genet* 2005;50:360-364.
  33. Hatakeyama C, Gao H, Harmer K, Ma S. *Hum Reprod* 2006;21:976-979.
  34. Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P, Pellestor F. *Hum Reprod* 2006;21:1166-1171.
  35. Anahory T, Hamamah S, Andreo B, Hedon B, Claustres M, Sarda P, Pellestor F. *Hum Reprod* 2005;20:1850-1854.
  36. Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, Al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E. *Int J Androl* 1997;20:11-19.
  37. Acar H, Yildirim MS, Cora T, Ceylaner S. *Mol Reprod Dev* 2002;63:232-236.
  38. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, Delobel B, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. *Hum Reprod* 2004;19:2227-2230.
  39. Perrin A, Douet-Guilbert N, Laudier B, Couet ML, Guerif F, Royere D, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Morel F. *Hum Reprod* 2007;22:729-732.
  40. Spriggs EL, Martin RH. *Mol Reprod Dev* 1994;38:247-250.
  41. Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sele B. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:240-246.
  42. Prigent Y, Viguié F. IXème Colloque de l'Association des Cytogénééticiens de Langue Française 1996, Paris.
  43. Estop AM, Cieply KM, Aston CE. *Eur J Hum Genet* 1997;5:78-82.
  44. Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ. *Am J Hum Genet* 1997;61:651-659.
  45. Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:202-208.
  46. Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E. *Cytogenet Cell Genet* 1998;83:193-198.
  47. Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F. *Cytogenet Cell Genet* 1998;83:275-280.
  48. Mercier S, Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL. *Hum Genet* 1998;102:446-451.
  49. Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E, de Die-Smulders CEM, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Geraedts JPM. *Hum Genet* 1998;102:157-165.
  50. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. *Hum Genet* 1999;105:428-436.
  51. Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E. *Hum Genet* 1999;104:412-417.
  52. Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. *Mol Hum Reprod* 1999;5:682-

- 690.
53. Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet I. *Eur J Hum Genet* 2001;9:395-403.
  54. Cora T, Acar H, Kaynak M. *J Androl* 2002;23:793-798.
  55. Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briançon G, Boucher D. *Hum Reprod* 2002;17:325-331.
  56. Lim AS, Lim TH, Kee SK, Chieng R, Tay SK. *Am J Med Genet* 2003;117:172-176.
  57. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. *Reprod Biomed Online* 2004;9:637-644.
  58. Wiland E, Hobel CJ, Hill D, Kurpisz M. *Prenat Diagn* 2008;28:36-41.
  59. Vozdova M, Oracova E, Morinova V, Rubes J. *Hum Reprod* 2008;23:581-588.
  60. Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R, Kurpisz M. *Am J Med Genet* 2006;140:245-256.
  61. Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y, Egeli U. *Am J Med Genet* 2006;140:1074-1082.
  62. Wiland E, Midro AT, Panasiuk B, Kurpisz M. *J Androl* 2007;28:262-272.
  63. Perrin A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Keromnes G, Langlois ML, Barriere P, Amice J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. *Hum Reprod* 2008;23:227-230.
  64. Giltay JC, Kastrop PMM, Tiemessen CHJ, Van Inzen WG, Scheres JMJC, Pearson PL. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84:67-72.
  65. Yakut T, Acar H, Egeli U, Kimya Y. *Mol Reprod Dev* 2003;66:67-71.
  66. Jaarola M, Martin RH, Ashley T. *Am J Hum Genet* 1998;63:218-224.
  67. Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP. *Mol Hum Reprod* 2007;13:55-59.
  68. Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. *Am J Med Genet* 2004;127A:139-143.
  69. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:149-154.
  70. Mikhaail-Philips MM, McGillivray BC, Hamilton SJ, Ko E, Chernos J, Rademaker A, Martin RH. *Hum Genet* 2005;117:357-365.
  71. Malan V, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Dumerin I, Martin-Pont B, Hugues JN, Wolf JP, Benzacken B. *Hum Reprod* 2006;21:2052-2056.
  72. Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:293-296.
  73. Vialard F, Pellestor F. *Pathol Biol* 2008 (Epub ahead of print).
  74. Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bouy B, Aubriot FX, Selva J. *Fertil Steril* 2007;87:418.

Les échanges de matériel chromosomique qui se produisent lors d'une translocation réciproque concernent le plus souvent deux autosomes mais peuvent aussi impliquer un gonosome.

#### B- Translocations réciproques équilibrées entre autosomes et gonosome et ségrégation méiotique chez des patients infertiles

A ce jour, trois cas d'étude de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes infertiles porteurs d'une translocation Y-autosome ont été rapportés (Mennicke *et al.*, 1997; Giltay *et al.*, 1999; Kekesi *et al.*, 2007), une étude de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'un homme fertile porteur d'une translocation Y-autosome (Vialard *et al.*, 2009) et d'un patient infertile porteur d'une translocation X-Y (Morel *et al.*, 2001). Aucune étude de la ségrégation méiotique dans les gamètes de patients infertiles porteurs d'une translocation X-autosome n'est rapportée.

Ainsi, après avoir analysé la ségrégation méiotique chez des hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée entre deux autosomes, nous nous sommes intéressés à la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes porteurs de translocations réciproques équilibrées X-autosome.

---

#### **Article 5 : Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: Case Report**

A. Perrin, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, G. Keromnes, M.-L. Langlois, P. Barrière, J. Amice, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel. *Human Reproduction*. 2008, 23(1), 227-230

---

#### **Article 6 : Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction**

A. Perrin, F. Vialard, N. Douet-Guilbert, D. Molina Gomes, P. Barrière, B. Guthausen, M.-J. Le Bris, M. De Braekeleer, J. Selva, F. Morel. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009, 18(6), 850-855

---

## Résultats :

Nous avons étudié la ségrégation méiotique, par FISH, dans les gamètes de deux patients infertiles porteurs d'une translocation  $t(X;2)(q21;p25.3)$  et  $t(X;18)(q11;p11.1)$ . Plus de 400 spermatozoïdes ont pu être analysés pour chacun des patients étant donné leur faible numération spermatique. Le taux de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés pour nos deux patients est respectivement de 37,95% et 54,36%. Chez le patient porteur de la  $t(X;2)$ , le mode de ségrégation méiotique préférentiel est le mode alterne, puis les modes adjacent I, adjacent II et 3:1. Chez l'autre patient, le mode préférentiel est bien le mode alterne mais le second mode de ségrégation est le mode 3:1, puis les modes adjacent I et adjacent II.

## Discussion :

Les différents profils de ségrégation méiotique obtenus chez nos deux patients montrent que les déséquilibres chromosomiques des gamètes varient chez les porteurs de translocation  $t(X;autosome)$  au même titre que chez les patients porteurs de translocation réciproque équilibrée entre deux autosomes (respectivement 45,64% à 62,05% et 50,88% à 65,60%).

Le quadrivalent formé au stade pachytène de méiose I détermine la ségrégation méiotique. Une étude a montré en 1980 (Jalbert *et al.*, 1980) que le mode de ségrégation adjacent I se produit préférentiellement lorsque la somme des longueurs des segments chromosomiques comportant les centromères est supérieure à la somme des longueurs des segments chromosomiques transloqués (comme notre patient avec la  $t(X;2)$ ). Par contre, lorsqu'un chromosome du quadrivalent est acrocentrique ou petit (comme le patient avec la  $t(X;18)$ ), le mode de ségrégation 3:1 est plus fréquent (Jalbert *et al.*, 1980).

Au vu des résultats de l'analyse FISH sur gamètes obtenus pour le patient porteur de la  $t(X;2)$  et de l'âge de la conjointe (42 ans), le conseil génétique s'est montré en défaveur d'une tentative d'ICSI. En revanche, pour l'autre couple, la majorité des gamètes étant chromosomiquement normale ou équilibrée, une ICSI a été proposée suivie d'un

diagnostic prénatal. Cet examen a indiqué qu'il s'agissait d'un fœtus de caryotype 46,XY. Grâce à cette étude, il a été possible de personnaliser le risque d'une descendance chromosomiquement déséquilibrée pour chaque couple. Ceci a permis un meilleur conseil génétique et une meilleure prise en charge des patients.

## Article 5

Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: Case report

# Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: Case Report

A. Perrin<sup>1</sup>, N. Douet-Guilbert<sup>1,2</sup>, M.J. Le Bris<sup>2</sup>, G. Keromnes<sup>3</sup>, M.L. Langlois<sup>4</sup>, P. Barrière<sup>4</sup>, J. Amice<sup>1,2</sup>, V. Amice<sup>2</sup>, M. De Braekeleer<sup>1,2,5</sup> and F. Morel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, Avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest Cedex 3, France; <sup>2</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Kerlann, Vannes, France; <sup>4</sup>Service de Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>5</sup>Correspondence address. Tel: +33-2-98-01-64-76; Fax: +33-2-98-01-81-89; E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Balanced reciprocal translocations are the most common structural abnormalities; most involve two autosomes while a few involve a gonosome (X or Y chromosome) and an autosome. These rearrangements are usually associated with infertility and/or a higher risk of chromosomal imbalances among offspring. This 26 years old man was first seen because of a 3-year history of primary infertility. He had been found to have a translocation, t(X;18)(q11;p11.1), inherited from his mother when he was 9 years old. Semen analysis showed a very severe oligoasthenoteratozoospermia (OAT). A total of 447 spermatozoa were analysed using three-colour fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The alternate segregation pattern, leading to a normal or balanced chromosomal content, was found in 54.36% of the spermatozoa studied. The frequencies of Adjacent I, Adjacent II, 3:1 segregation and diploidy (or 4:0 segregation) were 8.28, 5.14, 22.37 and 2.01%, respectively. Balanced reciprocal translocations between an autosome and the X chromosome lead to important disruptions in human spermatogenesis. Almost all the males with an X-autosome translocation have azoospermia. The man reported here had very severe OAT and is the first in whom the meiotic segregation pattern was analysed. This case further emphasizes the interest in performing FISH studies in infertile males with a chromosomal translocation to provide them with a personalized imbalance risk.

**Keywords:** meiotic segregation; FISH; X-autosome translocation

## Introduction

Balanced reciprocal translocations are the most frequent structural chromosomal abnormalities in humans. Their frequency is estimated at 0.12% in the general population but is 6.5 times more frequent among infertile males (De Braekeleer and Dao, 1991; De Braekeleer *et al.*, 2006). They result from material exchange between two non-homologous chromosomes, without loss or gain of material. The majority of reciprocal translocations occurs between two autosomes. Translocations involving gonosomes are rare and belong to three subgroups: Y-autosome translocations (Hsu, 1994; Giltay *et al.*, 1999; Brisset *et al.*, 2005; Pinho *et al.*, 2005), X-autosome translocations (Fraccaro *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2007) and X–Y translocations (Yamada *et al.*, 1982; Gabriel-Robez *et al.*, 1990; Taiar *et al.*, 1995; Morel *et al.*, 2001). Most of the men carrying a translocation involving gonosomes have azoospermia (Lee *et al.*, 2003; Brisset *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2007), although some show a severe oligozoospermia (Fraccaro *et al.* 1977; Giltay *et al.* 1999; Morel *et al.* 2001; Ma *et al.*, 2003).

Meiotic segregation, studied by heterospecific fecundation or fluorescent *in situ* hybridization (FISH), of >80 men carrying a translocation between two autosomes has been reported (Morel *et al.*, 2006). However, there are only two reports on males having a Y-autosome translocation (Mennicke *et al.*, 1997; Giltay *et al.*, 1999) and a sole report concerning a t(X;Y) (Morel *et al.*, 2001). To our knowledge, we report here the first meiotic segregation analysis in a male carrying an X-autosome translocation.

## Case Report

### Patient

The patient was first seen when he was 9 years old, because of his parents' secondary infertility following his birth. The cytogenetic analysis revealed a 46,Y,t(X;18)(q11;p11.1) karyotype, inherited from his mother.

The couple (female 24 years old; male 26 years old) presented with a 3-year history of primary infertility. The female partner had a normal karyotype. Semen analysis

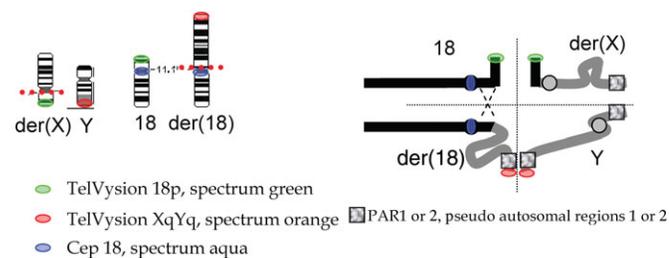
showed a very severe oligoasthenoteratozoospermia with 0.4 million spermatozoa/ml, 95% immobile sperm and 90% abnormal forms. Prior to this study, the patient was informed of the investigations and subsequently gave his consent.

### Meiotic segregation analysis

Triple FISH was carried out using the specific alphoid probe of chromosome 18 (D18Z1, spectrum aqua, Abbott, Rungis, France), the 18p subtelomere probe (tel 18p, spectrum green, Abbott) and the subtelomere Xq/Yq probe (telXq/Yq, spectrum orange, Abbott). An ideogram showing the translocation, the localization of the probes and the quadrivalent is shown in Fig. 1.

The sperm sample of the patient was also analysed in triple FISH with specific alphoid probes of chromosomes Y (DYZ3, spectrum orange, Abbott) and 18 (D18Z1, spectrum aqua, Abbott) and the 18p subtelomere probe (tel 18p, spectrum green, Abbott).

Detailed procedures for sperm preparation and FISH have been previously described (Morel *et al.*, 2004b; Douet-Guilbert *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2007). The slides were analysed using a Zeiss Axio Plan microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (significant *in situ* imaging system) (MetaSystems, Altlußheim, Germany).



**Figure 1:** Ideogram showing the t(X;18)(q11;p11.1), the localization of the probes and the quadrivalent at the pachytene stage

Spermatozoa with one green, one orange and one blue signal were classified as normal or balanced whereas spermatozoa with other signal combinations were scored as unbalanced.

### Results

A total of 447 spermatozoa was analysed (Table I). A preferential alternate segregation mode was observed with a rate of 54.36%. The probe combination could not distinguish whether the studied spermatozoa had a chromosomally balanced or normal content.

All other spermatozoa were unbalanced (45.64%). Among the unbalanced spermatozoa, the 3:1 segregation mode was the most frequent with 22.37% of analysed spermatozoa, followed by the Adjacent I (8.28%) and Adjacent II modes (5.14%). Moreover, 2.01% of the spermatozoa were diploid or segregated in the 4:0 mode. The remaining spermatozoa (7.83%) showed ambiguous signals or hybridization failure (Caer *et al.*, 2007).

A total of 287 spermatozoa was analysed in triple FISH using DYZ3, D18Z1 and tel18p probes (Table II). The frequency of spermatozoa exhibiting one orange spot, one blue spot and one green spot was assessed at 29.27%. We could not distinguish normal (23,Y) from unbalanced (24,Y,der(X)) spermatozoa as they showed the same fluorescent combination. Nevertheless, with triple FISH using D18Z1, tel18p and telXqYq, we had observed that 2.68% of spermatozoa were 24,Y,der(X) (Table I). Thus, using this correction factor, we estimated that 26.59% (29.27–2.68) was the rate of normal spermatozoa (23,Y).

### Discussion

Balanced reciprocal translocations between two autosomes are the most common structural chromosomal rearrangements in humans. X-autosome translocations are rare and usually of maternal origin or arising *de novo* (Kalz-Fuller *et al.*, 1999). In general, female carriers exhibit normal reproductive function (Cantu *et al.*, 1985; Ma *et al.*, 2003; Panasiuk *et al.*, 2004) while

**Table I.** Results of the meiotic segregation in the sample from the 46,Y,t(X;18)(q11;p11.1) carrier using triple FISH with D18Z1, tel18p and telXq/Yq probes.

Fluorescencesignals	Segregation modes	Chromosomal content	n (%) by combinations	% by mode
OGB	Alternate	Y/18 der(X)/der(18)	243 (54.36)	54.36
GGB	Adjacent I	der(X)/18	16 (3.58)	8.28
OOB		Y/der(18)	21 (4.70)	
OG	Adjacent II	der(X)/Y	0 (0)	5.14
OGBB		18/der(18)	12 (2.68)	
GGBB	Adjacent II + crossing-over		9 (2.01)	
OOBB			2 (0.45)	
GB			34 (7.61)	
OOGB	3: 1	18	12 (2.68)	22.37
OB		der(X)/Y/der(18)	30 (6.71)	
OGGB		der(X)/Y/18	12 (2.68)	
G		der(X)	1 (0.23)	
OOGBB		Y/der(18)/18	6 (1.34)	
O		Y	3 (0.67)	
OGGBB		der(X)/der(18)/18	2 (0.45)	
OOGGBB		4: 0 or diploidy	9 (2.01)	
Others*			35 (7.83)	7.83

O, orange; G, green; B, blue.

\*Ambiguous signals or hybridization failure.

**Table II.** Results of the meiotic segregation in the sample from the 46,Y,t(X;18)(q11;p11.1) carrier using triple FISH with DYZ3, D18Z1 and tel18p probes.

Fluorescent signals	Chromosomal content	n (%) by combinations
OGB	Y/18	84 (29.27)
B	der(X)/Y/18	98 (34.15)
	der(X)/der(18) der(18)	
BG	der(X)/18	32 (11.15)
BO	18	22 (7.67)
	Y/der(18)	
O	der(X)/Y/der(18)	14 (4.88)
	der(X)/Y	
BBG	Y	2 (0.70)
	18/der(18)	
BBGO	der(X)/der(18)/18	8 (2.79)
	der(X)/Y/der(18)/18 diploidy	
Others*		27 (9.41)

O, orange; G, green; B, blue.

\*Ambiguous signals or hybridation failures.

male carriers have azoospermia (Quack *et al.*, 1988; Solari *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2007).

Histologic examinations of biopsied testicular tissue from males carrying a X-autosome translocation show spermatogenic arrest at the primary spermatocyte level with most of the cells being arrested at the pachytene stage (Quack *et al.*, 1988), although a few germ cells at the spermatid level are sometimes found (Ishikawa *et al.*, 2007). Indeed, balanced reciprocal translocations between an autosome and the X chromosome lead to important disruptions in human spermatogenesis. This is explained by the fact that the derivative X chromosome may be interfering in an abnormal sexual vesicle formation, leading to meiotic disturbances and, consequently, to spermatogenic arrest.

Two males carrying a X-autosome translocation and a severe oligozoospermia have been reported thus far, one carrying a t(X;15)(p11.3;p1) (Fraccaro *et al.*, 1977), the other, a t(X;20)(q10;q10) (Ma *et al.*, 2003). In this latter case, the translocation was inherited from his mother and transmitted to his daughter through ICSI (Ma *et al.*, 2003). Two other males have each fathered a child, one having a t(X;14)(p-;q+) (Buckton *et al.*, 1971), the other, a t(X;1)(p-;q+) (Leichtman *et al.*, 1978).

Mattei *et al.* (1982) studied the cytogenetic characteristics of the X-autosome translocations. They found that the breakpoints distribution on the X chromosome did not differ significantly from the expected distribution (Mattei *et al.*, 1982). Interestingly, in two subjects each with a balanced t(X;autosome), one of whom had one 46,XY normal son (although paternity was not proven) (Buckton *et al.*, 1971; Leichtman *et al.*, 1978), and in three t(X;autosome) carriers with severe oligozoospermia (Fraccaro *et al.*, 1977; Ma *et al.*, 2003) (our case), the breakpoint on the X chromosome appeared to be always in the pericentromeric region or at the centromere. These balanced translocations may have fewer deleterious effects on spermatogenesis than other X chromosome breakpoints. Thus, when the breakpoint is located near the centromere of the X chromosome, a few germinal cells could be able to complete the meiotic process by producing spermatozoa.

To our knowledge, this is the first cytogenetic study of the chromosomal content in the spermatozoa of a man with a X-autosome translocation. Solely, a small number of spermatozoa could be analysed because of his severe oligozoospermia. The majority of the analysed nuclei showed normal or balanced equipment resulting from alternate segregation with normal (23,Y) or balanced (23,der(X),der(18)) spermatozoa in similar proportions. A 23,Y or a 23,der(X),der(18) spermatozoon fertilizing a normal 23,X oocyte will lead, respectively, to the birth of a 46,XY boy or a 46,X,t(X;18)(q11;p11.1) girl carrying the same translocation as her father and her grandmother. Nevertheless, balanced t(X-autosome) in girls is not necessarily associated with the same phenotype as that of the mother or, as in this case, as that of the grandmother. As proposed by Ma *et al.* (2003), it is of clinical significance to determine to what degree skewed X chromosome inactivation is present in the resulting female newborns with X-autosome translocation so that the parents can be counselled accordingly (Ma *et al.*, 2003).

The frequency of gametes exhibiting a chromosomal unbalanced equipment was 45.64% with the preferential mode of imbalance being the 3:1 mode. This preferential unbalanced 3:1 segregation is particularly described in the t(11;22)(q23;q11) (Estop *et al.*, 1999; Geneix *et al.*, 2002; Escudero *et al.*, 2003). The same results were found in other reciprocal translocations involving small or acrocentric chromosomes (Geneix *et al.*, 2002; Escudero *et al.*, 2003) or with breakpoints close to the telomeric regions (Martini *et al.*, 1998; Escudero *et al.*, 2003). The 3:1 mode is also favoured when chromosome 9 is involved in the translocation or when, as in our patient, breakpoints are near the centromere (Simpson and Bischoff, 2002; Trappe *et al.*, 2002; Rives *et al.*, 2003; Brugnon *et al.*, 2006).

Theoretically, in the 3:1 mode, gametes with 22 or 24 chromosomes should be found in equal proportions. However, in our case, 15.22% of the spermatozoa had 22 chromosomes and 7.15% had 24 chromosomes. These differences could be explained by a differential viability of the spermatocytes and/or spermatids according to their chromosomal content (Estop *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1998), but more likely, by the overestimation of the frequency of spermatozoa with 22 chromosomes, possibly due to technical problems (Morel *et al.*, 2004a).

Meiotic segregation patterns of men carrying a balanced reciprocal translocation between two autosomes have been recently reviewed (Morel *et al.*, 2006). The frequency of unbalanced spermatozoa was shown to vary from 19% to >80%. Overall, the frequencies of normal/balanced and unbalanced gametes were, on average, 44% and 56%, respectively. Thus, the risk for X-autosome translocation carriers of producing a chromosomally unbalanced offspring is not higher than that for carriers of a reciprocal translocation between two autosomes, at least in our patient.

During genetic counselling, preimplantation genetic diagnosis (PGD) and conventional prenatal diagnosis were discussed with the couple. As the waiting list for PGD is very long in France, given the frequency of normal or balanced gametes of ~55%, the couple decided to try an *in vitro* fertilization

with sperm microinjection followed by conventional prenatal diagnosis. There were 19 oocytes collected, 12 injected and 6 embryos obtained. One embryo was transferred and a 46,XY newborn baby with no malformation was born.

## Funding

A.P. is the recipient of a doctoral studentship from the Région Bretagne.

## References

- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F. FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 1998;**83**:275–280.
- Brisset S, Izard V, Misrahi M, Aboura A, Madoux S, Ferlicot S, Schoevaert D, Soufir JC, Frydman R, Tachdjian G. Cytogenetic, molecular and testicular tissue studies in an infertile 45,X male carrying an unbalanced (Y;22) translocation: case report. *Hum Reprod* 2005;**20**:2168–2172.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:685–693.
- Buckton KE, Jacobs PA, Rae LA, Newton MS, Sanger R. An inherited X-autosome translocation in man. *Ann Hum Genet* 1971;**35**:171–178.
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Different mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 2007; June 29 (Epub ahead of print).
- Cantu JM, Diaz M, Moller M, Jimenez-Sainz M, Sandoval L, Vaca G, Rivera H. Azoospermia and duplication 3qter as distinct consequences of a familial t(X;3)(q26;q13.2). *Am J Med Genet* 1985;**20**:677–684.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;**6**:245–250.
- De Braekeleer M, Perrin A, Morel F. Chromosomal abnormalities in male infertility. In: De Braekeleer M (ed). *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006,27–52.
- Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, De Braekeleer M, Morel F. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;**28**:372–379.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003;**79**:1528–1534.
- Estop AM, Levinson F, Cieply KM, Van Kirk V. The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 1992;**89**:425–429.
- Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 1999;**104**:412–417.
- Fraccaro M, Maraschio P, Pasquali F, Scappaticci S. Women heterozygous for deficiency of the (p21 leads to pter) region of the X chromosome are fertile. *Hum Genet* 1977;**39**:283–292.
- Gabriel-Robez O, Rumpler Y, Ratomponirina C, Petit C, Levilliers J, Croquette MF, Couturier J. Deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex-chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X;Y translocation. *Cytogenet Cell Genet* 1990;**54**:38–42.
- Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briançon G, Boucher D. Sperm analysis by FISH in a case of t(17;22)(q11;q12) balanced translocation: case report. *Hum Reprod* 2002;**17**:325–331.
- Giltay JC, Kastrop PMM, Tiemessen CHJ, Van Inzen WG, Scheres JMJC, Pearson PL. Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1999;**84**:67–72.
- Hsu LYF. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 1994;**53**:108–140.
- Ishikawa T, Konho Y, Yamaguchi K, Oba T, Sakamoto Y, Takenaka A, Fujisawa M. An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic man. *Fertil Steril*. Epub ahead of print, 2007.
- Kalz-Fuller B, Slegers E, Schwanitz G, Schubert R. Characterization, phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. *Clin Genet* 1999;**55**:362–366.
- Lee S, Lee SH, Chung TG, Kim HJ, Yoon TK, Kwak IP, Park SH, Cha WT, Cho SW, Cha KY. Molecular and cytogenetic characterization of two azoospermic patients with X-autosome translocation. *J Assist Reprod Genet* 2003;**20**:385–389.
- Leichtman DA, Schmickel RD, Gelehrter TD, Judd WJ, Woodbury MC, Mellinger KL. Familial Turner syndrome. *Ann Intern Med* 1978;**89**:473–476.
- Ma S, Ho Yuen B, Penaherrera M, Koehn D, Ness L, Robinson W. ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report. *Hum Reprod* 2003;**18**:1377–1382.
- Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E, de Die-Smulders CEM, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Geraedts JPM. Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 1998;**102**:157–165.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F. X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum Genet* 1982;**61**:295–309.
- Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, Al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E. Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 1997;**20**:11–19.
- Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL. Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X)t(X;Y)(qter->p22;q11->qter) carrier. *Cytogenet Cell Genet* 2001;**92**:63–68.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 2004a;**27**:200–212.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogne C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL. Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004b;**81**:682–685.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M (ed). *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006,53–112.
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;**22**:136–141.
- Panasiuk B, Usinskiene R, Kostyk E, Rybalko A, Stasiewicz-Jarocka B, Krzykwa B, Pienkowska-Grela B, Kucinkas V, Michalova K, Midro AT. Genetic counselling in carriers of reciprocal chromosomal translocations involving the short arm of chromosome X. *Ann Génét* 2004;**47**:11–28.
- Pinho MJ, Neves R, Costa P, Ferras C, Sousa M, Alves C, Almeida C, Fernandes S, Silva J, Ferras L et al. Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Hum Reprod* 2005;**20**:689–696.
- Quack B, Speed RM, Luciani JM, Noel B, Guichaoua M, Chandley AC. Meiotic analysis of two human reciprocal X-autosome translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1988;**48**:43–47.
- Rives N, Jarnot M, Mousset-Siméon N, Joly G, Mace B. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9;10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 2003;**48**:535–540.
- Simpson JL, Bischoff F. Genetic counseling in translocations. *Urol Clin N Am* 2002;**29**:793–807.
- Solari AJ, Rahn IM, Ferreyra ME, Carballo MA. The behavior of sex chromosomes in two human X-autosome translocations: failure of extensive X-inactivation spreading. *Biocell* 2001;**25**:155–166.
- Taiar N, Qumsiyeh MB, Croteau S, Rollet J, Benkhalifa M. Detection of t(X;Y) in 2 XX males using fluorescent in situ hybridization. *Ann Génét* 1995;**38**:102–105.
- Trappe R, Bohm D, Kohlhasse J, Weise A, Liehr T, Essers G, Meins M, Zoll B, Bartels I, Burfeind P. A novel family-specific translocation t(2;20)(p24.1;q13.1) associated with recurrent abortions: molecular characterization and segregation analysis in male meiosis. *Cytogenet Genome Res* 2002;**98**:1–8.
- Yamada K, Nanko S, Hattori S, Isurugi K. Cytogenetic studies in a Y-to-X translocation observed in three members of one family, with evidence of infertility in male carriers. *Hum Genet* 1982;**60**:85–90.

Submitted on April 21, 2007; resubmitted on July 30, 2007; accepted on September 5, 2007

## Article 6

Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications  
for assisted reproduction

## Article

# Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction



Aurore Perrin has been a PhD student since 2006 in the laboratory of Histology, Embryology and Cytogenetics and INSERM U613 at the University of Brest, France. She is the recipient of a doctoral studentship from the Région Bretagne. Current research interests focus on cytogenetics of male infertility.

Ms Aurore Perrin

Aurore Perrin<sup>1,2</sup>, François Vialard<sup>3,4</sup>, Nathalie Douet-Guilbert<sup>1,2,5</sup>, Denise Molina Gomes<sup>3,4</sup>, Bruno Guthauser<sup>6</sup>, Marc De Braekeleer<sup>1,2,5,7</sup>, Jacqueline Selva<sup>3,4</sup>, Frédéric Morel<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France; <sup>2</sup>INSERM U613, Brest; <sup>3</sup>Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Biologie de la Reproduction et Génétique Médicale, CHI Poissy-Saint-Germain, Poissy, France; <sup>4</sup>EA2493, Université Versailles St Quentin en Yvelines, France; <sup>5</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHU Brest, Brest; <sup>6</sup>Service de Biologie et Médecine de la Reproduction, CHR Dreux, France

<sup>7</sup>Correspondence: e-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

## Abstract

The aim of this study was to analyse and compare the meiotic segregation of X-autosome translocation in two male carriers and to discuss couple-specific treatment modality before intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Meiotic segregation was analysed by fluorescent in-situ hybridization (FISH) in spermatozoa of two men who were carriers of a X-autosome translocation: 46,Y,t(X;2)(p21;p25.3) (patient 1) and 46,Y,t(X;18)(q11;p11.1) (patient 2). The results indicated a majority of unbalanced spermatozoa (62.05%) for patient 1, but normal or balanced spermatozoa (54.36%) for patient 2. Moreover, the unbalanced gametes resulted from adjacent I, adjacent II and 3:1 segregation, in decreasing frequencies, for patient 1 but from 3:1, adjacent I, adjacent II segregation for patient 2. The results of the meiotic segregation analysis had different treatment implications for assisted reproduction. Couple 1 were advised against ICSI, due to the results of the meiotic segregation in spermatozoa from patient 1 and the age of his wife. For couple 2, the clinic viewed favourably an attempt with ICSI followed by conventional prenatal diagnosis. A 46,XY child was born without malformations.

**Keywords:** FISH, genetic counselling, meiotic segregation, spermatozoa, X-autosome translocation

## Introduction

Cytogenetics has been an important diagnostic tool in male infertility since 1959, with the identification of a 47,XXY karyotype in patients with Klinefelter syndrome (Jacobs and Strong, 1959). The first studies found that the frequency of somatic chromosomal abnormalities was increased among infertile males (Chandley, 1979; De Braekeleer and Dao, 1991). Indeed, the frequency of chromosomal abnormalities at birth is approximately 0.85% (Nielsen and Wohlert, 1991) whereas, in the infertile male population, it ranges from 2% to 20% (De Braekeleer and Dao, 1991; Baschat *et al.*, 1996; Peschka *et al.*, 1999; Gekas *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2004a;

Clementini *et al.*, 2005; De Braekeleer *et al.*, 2006).

Generally, the risk of carrying a somatic chromosomal abnormality increases with the severity of the spermogram, numeration being the best predictive parameter (Vegetti *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2002). Moreover, males with oligozoospermia are more likely to have an autosomal rearrangement, including reciprocal or Robertsonian translocations or inversions, than those with azoospermia. On the contrary, males with azoospermia are much more likely to have a sex chromosome numerical or structural abnormality than those with oligozoospermia (De Braekeleer *et*

*et al.*, 2006). Indeed, most of the males carrying a translocation involving a gonosome have azoospermia (Matsuda *et al.*, 1989; Buonadonna *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2007) although a few have severe oligozoospermia (Mattei *et al.*, 1982; Alves *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003).

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is now a widely-accepted procedure to assist fertilization in couples with severe male infertility (Palermo *et al.*, 1992). However, as these carriers can produce a significant percentage of gametes with an unbalanced combination of the parental rearrangement, there is a potentially elevated genetic risk, according to cases, of chromosomal imbalances for their offspring (Morel *et al.*, 2004b, 2006). The aim of this study was to analyse and compare the meiotic segregation of X-autosome translocation in two male carriers and to discuss couple-specific treatment modality before ICSI.

## Materials and methods

### Patients

Couple 1 (woman 42 years old; man 44 years old) presented with a 2-year history of primary infertility. The female partner had a normal karyotype. Semen analysis showed an oligoasthenoteratozoospermia with  $0.5\text{--}5 \times 10^6$  spermatozoa/ml, 40% mobile spermatozoa and 80% abnormal forms, according to the World Health Organization criteria (World Health Organization, 1999) and the method proposed by David *et al.* (1975). The karyotype of peripheral blood lymphocytes of

patient 1 was  $46, Y, t(X;2)(p21;p25.3)$ .

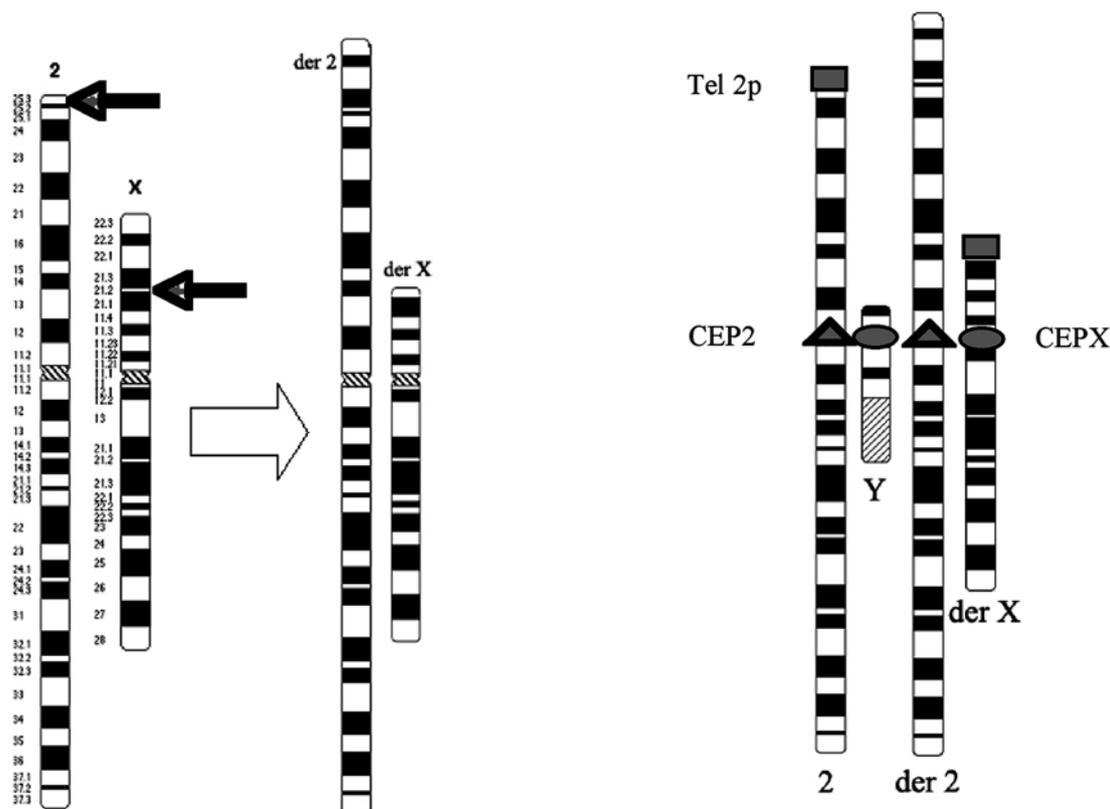
Couple 2 (woman 24 years old; man 26 years old) presented with a 3-year history of primary infertility. The female partner had a normal karyotype. Semen analysis showed a very severe oligoasthenoteratozoospermia with  $0.4 \times 10^6$  spermatozoa/ml, 95% immobile spermatozoa and 90% abnormal forms. The karyotype of patient 2 was  $46, Y, t(X;18)(q11;p11.1)$ .

Prior to this study, both patients were informed of the investigations and subsequently gave their consent.

### Meiotic segregation analysis in spermatozoa

Four probes were used to analyse the sperm sample of patient 1: specific alphoid probes of chromosome 2 (spectrum red; Abbott, Rungis, France), X chromosome (spectrum aqua; Abbott) and Y chromosome (spectrum aqua; Abbott) and 2p subtelomere probe (tel 2p; spectrum green; Abbott). Ideograms showing the translocation and the probes' localization are schematized in **Figure 1**.

The sperm sample of patient 2 was analysed in triple FISH using a specific alphoid probe of chromosome 18 (D18Z1; spectrum aqua), an 18p subtelomere probe (tel 18p; spectrum green), and a Xq/Yq subtelomere probe (telXq/Yq; spectrum orange). Ideograms showing the translocation and the probes' localization have been previously described (Perrin *et al.*, 2008).



**Figure 1.** Ideograms showing the  $t(X;2)(p21;p25.3)$  and the localization of the probes.

The hybridization procedure and analysis have been described elsewhere (Morel *et al.*, 2004c; Douet-Guilbert *et al.*, 2005; Vialard *et al.*, 2007; Caer *et al.*, 2008).

## Results

A total of 440 spermatozoa were analysed for patient 1. The frequency of normal or balanced spermatozoa, resulting from alternate segregation, was 37.95%. The majority of analysed spermatozoa (62.05%) showed unbalanced chromosomes resulting from adjacent I (21.59%), adjacent II (20.68%) and 3:1 (17.95%) segregation (**Table 1**). The remaining spermatozoa showed ambiguous signals or hybridization failure (0.91%) or were diploids or 4:0 segregation (0.91%).

A total of 447 spermatozoa were analysed for patient 2. The majority of the analysed nuclei (54.36%) showed normal or balanced chromosomes resulting from alternate segregation. All other spermatozoa (45.64%) were unbalanced (**Table 1**). The frequencies of adjacent I, adjacent II and 3:1 segregation were 8.28%, 5.15% and 22.37% respectively (Perrin *et al.*, 2008).

## Discussion

Translocation is the most frequent structural abnormality in human. The majority of reciprocal translocations occur between two autosomes. Translocations involving gonosomes are rare (Lee *et al.*, 2003; Brisset *et al.*, 2005; Pinho *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2007). Azoospermia is the common feature in male carriers of a X-autosome translocation (Kalz-Fuller *et al.*, 1999; Solari *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2007), although severe oligozoospermia has been observed in a few patients (Ma *et al.*, 2003; Perrin *et al.*, 2008). Indeed, interaction between autosomal derivatives and sexual vesicle leads to meiotic disturbances and, consequently, to gametogenic arrest (Gabriel-Robez *et al.*, 1986; Delobel *et al.*, 1998; Pinho *et al.*, 2005).

The profiles of meiotic segregation are different between the two carriers studied here. The results indicated a majority of unbalanced spermatozoa for patient 1 but of normal or balanced spermatozoa for patient 2. Moreover, the unbalanced gametes resulted from adjacent I, adjacent II and 3:1 segregation, in decreasing frequencies, for patient 1 but from 3:1, adjacent I, adjacent II segregation for patient 2.

These different profiles confirm that, as for the translocations between two autosomes, the risk of meiotic imbalance varies according to the chromosomes involved in the translocation (chromosome X and autosome of group A for patient 1; chromosome X and autosome of group E for patient 2) and the breakpoint positions (telomeric for chromosome 2 and Xp21 for patient 1 and juxtacentromeric (Xq11, 18p11) for patient 2). Moreover, the configuration of quadrivalent at pachytene strongly determines the segregation mode that will preferentially follow during anaphase I (Perrin *et al.*, 2007). Adjacent I segregation occurs preferentially in translocations for which the sum of both centric segment lengths is greater than the two translocation segment lengths (as for patient 1) whereas the 3:1 segregation is likely if one of the chromosomes of the quadrivalent is small (as for patient 2) or is an acrocentric chromosome (Jalbert *et al.*, 1980).

The risk of producing a chromosomally unbalanced offspring related to the presence of the X-autosome translocation was 62.05% for patient 1 and 45.64% for patient 2 if it is considered that the unbalanced spermatozoa have the same fertilizing potential as the normal or balanced spermatozoa (Brugnon *et al.*, 2006). The risk of meiotic imbalance is primarily determined by the characteristics of the chromosomes involved and the breakpoint positions as well as survival rate. As many of these imbalances are incompatible with survival, the risk values change during pregnancy (Stengel-Rutkowski *et al.*, 1988). Thus, the offspring viability was evaluated according to different segregation modes based on the hypothesis that an embryo is unviable if monosomy accounts for more than 1% of his genome and trisomy for more than 3% (**Table 2**) (adapted from Cohen *et al.*, 1994).

Based on the analysis of the chromosomes involved in the translocation, patient 1 had a probability of 6.36% of producing a fetus with Turner syndrome and 1.14% with Klinefelter syndrome. He also had a 23.40% risk of producing a chromosomally unbalanced viable fetus (leading to the birth of a child with a polymalformation syndrome and/or mental retardation) and a 31.14% risk of producing an unviable fetus (leading to early pregnancy loss or spontaneous abortion). Thus, the risk of having an ongoing pregnancy associated with a chromosomally unbalanced fetus was 30.90%. Panasiuk *et al.* (2004), using the indirect method of risk estimates proposed by Stengel-Rutkowski *et al.* (1988), found that the probability of occurrence for unbalanced offspring at birth ranged from 2.1% to 17% in four families of reciprocal X:A translocation carriers involving the short arm of the X chromosome. Information about the magnitude of the individual figures at birth is different in comparison to data from sperm karyotyping; this should be considered during genetic counselling of families. Patient 2 had a probability of 7.61% of producing a fetus with Turner syndrome and 2.68% with Klinefelter syndrome. He also had a 24.61% risk of producing a chromosomally unbalanced viable fetus and 10.74% of producing an unviable fetus. Thus, the risk of having an ongoing pregnancy associated with a chromosomally unbalanced fetus was 34.90%.

The results of the meiotic segregation analysis had different treatment implications for assisted reproduction.

For couple 1, there was a high proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa from the t(X;2)(p21;p25.3) carrier. Munné (2002) found that implantation rates in translocation carriers were directly correlated with the proportion of normal gametes and that pregnancy rates were inversely proportional to the number of abnormal gametes. Moreover, Escudero *et al.* (2003), analysing the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) from 11 couples in whom the male partner carried a translocation, found that, when the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa was higher than 63%, there were no pregnancies. Thus, due to the obtained results of the meiotic segregation in spermatozoa from patient 1 and the age of his wife (42 years), the clinic advised against ICSI during genetic counselling.

For couple 2, a majority of normal or balanced spermatozoa from the t(X;18)(q11;p11.1) carrier was found. This percentage was no higher than those found in carriers of autosome-autosome translocation (Morel *et al.*, 2004b; Nishikawa *et al.*,

**Table 1.** Results of the meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers.

Segregation mode	Chromosomal equipment	No. of spermatozoa (%)	
		Patient 1	Patient 2
Alternate	Y/A	167 (37.95)	243 (54.36)
	der(X)/der(A)		
Adjacent I	der(X)/A	44 (10.00)	16 (3.58)
	Y/der(A)	51 (11.59)	21 (4.70)
Adjacent II	der(X)/Y		
	A/der(A)	0 (0.00)	
3:1	Crossing-over	35 (7.95)	12 (2.68)
	A	10 (2.27)	11 (2.46)
	der(X)/Y/der(A)	28 (6.36)	34 (7.61)
	der(A)	5 (1.14)	12 (2.68)
	der(X)/Y/A	6 (1.36)	30 (6.71)
	der(X)	2 (0.45)	12 (2.68)
	Y/der(A)/A	29 (6.60)	1 (0.22)
	Y	3 (0.68)	6 (1.34)
	der(X)/der(A)/A	4 (0.91)	3 (0.67)
	der(X)	2 (0.45)	2 (0.45)
4:0 or diploidy	–	4 (0.91)	9 (2.01)
Others	–	4 (0.91)	35 (7.83)

A = Autosome involved in translocation (patient 1: A = 2, patient 2: A = 18).

**Table 2.** Percentage of potential viability of a fetus according to segregation modes in spermatozoa in two carriers.

Segregation mode	Chromosomal equipment	Viability (%)	
		Patient 1	Patient 2
Alternate	Y/A	Normal	Normal
	der(X)/der(A)	Balanced (37.95)	Balanced (54.36)
Adjacent I	der(X)/A	Unbalanced viable (10.00)	Unbalanced viable (3.58)
	Y/der(A)	Unbalanced viable (11.59)	Unbalanced viable (4.70)
Adjacent II	der(X)/Y	Not viable (10.45)	Not viable (0)
	A/der(A)	Not viable (7.95)	Unbalanced viable (2.68)
3:1	Crossing-over	Not viable (2.27)	Unbalanced viable (2.46)
	A	Turner syndrome (6.36)	Turner syndrome (7.61)
	der(X)/Y/der(A)	Klinefelter syndrome (1.14)	Klinefelter syndrome (2.68)
	der(A)	Unbalanced viable (1.36)	Unbalanced viable (6.71)
	der(X)/Y/A	Unbalanced viable (0.45)	Unbalanced viable (2.68)
	der(X)	Not viable (6.60)	Not viable (0.22)
	Y/der(A)/A	Not viable (0.68)	Unbalanced viable (1.34)
	Y	Not viable (0.91)	Not viable (0.67)
	der(X)/der(A)/A	Not viable (0.46)	Unbalanced viable (0.45)
	der(X)	Not viable (0.91)	Not viable (2.01)
4:0 or diploidy	–	Not viable (0.91)	Not viable (2.01)
Others	–	Not viable (0.91)	Not viable (7.83)

A = Autosome involved in translocation (patient 1: A = 2, patient 2: A = 18).

2008). Therefore, during genetic counselling, PGD and prenatal diagnosis were discussed with the couple. As the waiting list for PGD is very long in France, the clinic favoured attempting ICSI followed by conventional prenatal diagnosis even if the risk of having an ongoing pregnancy associated with a chromosomally unbalanced fetus was high (34.89%). A total of 19 oocytes were collected, 12 were injected and six embryos were obtained.

One embryo was transferred, prenatal diagnosis revealed no chromosomal abnormality and a 46,XY child was born without malformations (Perrin *et al.*, 2008).

In conclusion, for both carriers of a balanced reciprocal translocation involving an X chromosome, the obtained profiles of meiotic segregation were different; frequencies of unbalanced

spermatozoa, which are predictive of the risk of chromosomally unbalanced offspring, were also notably different. FISH on spermatozoa allowed a personalized risk evaluation and led to a better genetic counselling with appropriate treatment.

## Acknowledgements

AP is the recipient of a doctoral studentship from the Région Bretagne, France.

## References

- Alves C, Carvalho F, Cremades N et al. 2002 Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *European Journal of Human Genetics* **10**, 467–474.
- Baschat AA, Kupker W, al. Hasani S et al. 1996 Results of cytogenetic analysis in men with severe subfertility prior to intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* **11**, 330–333.
- Brisset S, Izard V, Misrahi M et al. 2005 Cytogenetic, molecular and testicular tissue studies in an infertile 45,X male carrying an unbalanced (Y;22) translocation: case report. *Human Reproduction* **20**, 2168–2172.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G et al. 2006 Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction* **21**, 685–693.
- Buonadonna AL, Cariola F, Caroppo E et al. 2002 Molecular and cytogenetic characterization of an azoospermic male with a de novo Y;14 translocation and alternate centromere inactivation. *Human Reproduction* **17**, 564–569.
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N et al. 2008 Different mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertility and Sterility* **89**, 1637–1640.
- Chandley AC 1979 The chromosomal basis of human infertility. *British Medical Bulletin* **35**, 181–186.
- Clementini E, Palka C, Iezzi I et al. 2005 Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* **20**, 437–442.
- Cohen O, Cans C, Mermet MA et al. 1994 Viability thresholds for partial trisomies and monosomies. A study of 1,159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Human Genetics* **93**, 188–194.
- David G, Bisson JP, Czyglick F et al. 1975 Anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction* **4**, 17–36.
- De Braekeleer M, Dao TN 1991 Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Human Reproduction* **6**, 245–250.
- De Braekeleer M, Perrin A, Morel F 2006 Chromosomal abnormalities in male infertility. In: De Braekeleer M (ed), *Cytogenetics and Infertility*. Transworld Research Network, Trivandrum (India), 27–52.
- Delobel B, Djelati R, Gabriel-Robez O et al. 1998 Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Human Genetics* **102**, 98–102.
- Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V et al. 2005 Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *International Journal of Andrology* **28**, 372–379.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M et al. 2003 Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertility and Sterility* **79**, 1528–1534.
- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B et al. 1986 Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenetics and Cell Genetics* **43**, 154–160.
- Gekas J, Thépot F, Turleau C et al. 2001 Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Human Reproduction* **16**, 82–90.
- Ishikawa T, Konho Y, Yamaguchi K et al. 2007 An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic man. *Fertility and Sterility* **88**, 705.
- Jacobs PA, Strong JA 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* **183**, 302–303.
- Jalbert P, Sele B, Jalbert H 1980 Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Human Genetics* **55**, 209–222.
- Kalz-Fuller B, Slegers E, Schwanitz G et al. 1999 Characterization, phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. *Clinical Genetics* **55**, 362–366.
- Lee S, Lee SH, Chung TG et al. 2003 Molecular and cytogenetic characterization of two azoospermic patients with X-autosome translocation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **20**, 385–389.
- Ma S, Ho Yuen B, Penaherrera M et al. 2003 ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report. *Human Reproduction* **18**, 1377–1382.
- Matsuda T, Hayashi K, Nonomura M et al. 1989 Azoospermic male with a balanced Y-autosome translocation. *Urologia Internationalis* **44**, 43–46.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S et al. 1982 X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Human Genetics* **61**, 295–309.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A et al. 2006 Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M (ed), *Cytogenetics and Infertility*. Transworld Research Network, Trivandrum (India), 53–112.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ et al. 2004a Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *International Journal of Andrology* **27**, 178–182.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ et al. 2004b Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *International Journal of Andrology* **27**, 200–212.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C et al. 2004c Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertility and Sterility* **81**, 682–685.
- Munné S 2002 Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive BioMedicine Online* **4**, 183–196.
- Nielsen J, Wohler M 1991 Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Human Genetics* **87**, 81–83.
- Nishikawa N, Sato T, Suzumori N et al. 2008 Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *International Journal of Andrology* **31**, 60–66.
- Palermo G, Joris H, Devroey P et al. 1992 Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**, 17–18.
- Panasiuk B, Usinskiene R, Kostyk E et al. 2004 Genetic counselling in carriers of reciprocal chromosomal translocations involving short arm of chromosome X. *Annales de Génétique* **47**, 11–28.
- Perrin A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ et al. 2008 Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: case report. *Human Reproduction* **23**, 227–230.
- Perrin A, Douet-Guilbert N, Laudier B et al. 2007 Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: a case report. *Human Reproduction* **22**, 729–732.
- Peschka B, Leygraaf J, van der Ven K et al. 1999 Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* **14**, 2257–2263.
- Pinho MJ, Neves R, Costa P et al. 2005 Unique t(Y;1)(q12;q12)

- reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Human Reproduction* **20**, 689–696.
- Solari AJ, Rahn IM, Ferreyra ME *et al.* 2001 The behavior of sex chromosomes in two human X-autosome translocations: failure of extensive X-inactivation spreading. *Biocell* **25**, 155–166.
- Stengel-Rutkowski S, Stene S, Gallano P 1988 *Risk estimates in balanced parental reciprocal translocations*. Monographie des Annales de Génétique, Expansion Scientifique Française, Paris.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A *et al.* 2000 Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction* **15**, 351–365.
- Vialard F, Delanete A, Clement P *et al.* 2007 Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertility and Sterility* **87**, 418.
- Vincent MC, Daudin M, De MP *et al.* 2002 Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *Journal of Andrology* **23**, 18–22.
- World Health Organization 1999 *Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, New York.

*Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*

*Received 6 June 2008; refereed 26 August 2008; accepted 4 February 2009.*

Afin de compléter notre analyse de ségrégation méiotique, nous avons étudié les spermatozoïdes d'hommes infertiles porteurs d'une translocation robertsonienne.

C- Translocations robertsoniennes et ségrégation méiotique chez des patients infertiles

La présence de translocations robertsoniennes peut entraîner des troubles de la fertilité et la production de gamètes chromosomiquement déséquilibrés nécessitant une analyse par FISH.

---

**Article 3\* : A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridisation.**

A. Perrin, F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, J. Amice, V. Amice, M. De Braekeleer.

Andrologia (sous presse)

---

**Résultats :**

Nous avons étudié la ségrégation méiotique, par FISH, dans les gamètes de 4 patients porteurs de translocations robertsoniennes. Nous avons analysé entre 1631 et 1846 spermatozoïdes par patient. Le taux de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés varie de 78,38% à 91,22%. Ces gamètes sont issus du mode de ségrégation alterne qui est donc le mode de ségrégation méiotique préférentiel.

**Discussion :**

Etant donné la configuration adoptée par le trivalent (*cis*), cela tend à favoriser un mode de ségrégation alterne, mode formant des gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Cela corrobore le fait que les gamètes des hommes porteurs de translocation robertsonienne sont majoritairement issus de ce mode.

\* : L'article 3, déjà cité dans la partie A, se trouve en p. 224.

Nos résultats (78,38% à 91,22% de gamètes normaux ou équilibrés) sont en accord avec la littérature qui rapporte un taux de gamètes équilibrés compris entre 60% et 96,6% chez les hommes porteurs de translocation robertsonienne (Morel *et al.*, 2004b; Roux *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2007). Ces variations pourraient résulter d'une formation différente du chromosome dérivé et/ou de différents points de cassure (dérivé dicentrique ou monocentrique) et/ou d'une variation du comportement méiotique (Page *et al.*, 1996; Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Moradkhani *et al.*, 2006). Cependant, les variations que nous observons chez les hommes porteurs de translocation robertsonienne sont beaucoup moins importantes que celles mises en évidence chez des patients porteurs de translocation réciproque équilibrée.

Ces analyses permettent un conseil génétique plus personnalisé et orientent vers la meilleure solution parmi les possibilités qui s'offrent au couple.

## D- Translocation non réciproque et ségrégation méiotique chez un patient infertile

En outre, nous avons eu l'opportunité de réaliser une étude de la ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une translocation atypique dont la formule chromosomique est 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3). L'analyse des gamètes nous a permis de comprendre la mécanique méiotique d'une telle anomalie de structure.

---

### Article 7 : Meiotic segregation in spermatozoa of a

#### 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: A case report.

A. Perrin, N. Douet-Guilbert, B. Laudier, M.-L. Couet, F. Guérif, D. Royère, M.-J. Le Bris, M. De Braekeleer and F. Morel. Human Reproduction, 2007, 22 (3):729-732

---

### Résultats :

L'analyse de la ségrégation méiotique sur deux éjaculats (prélevés à plus de 3 mois d'intervalle) de ce patient révèle un taux de gamètes issus du mode alterne, respectivement pour les éjaculats 1 et 2, de 87,26% et 90,97%. Les gamètes chromosomiquement déséquilibrés issus du mode adjacent sont retrouvés respectivement dans 9,08% et 6,95% des spermatozoïdes analysés, enfin les gamètes diploïdes ou issus du mode 3:0 sont trouvés respectivement à une fréquence de 1,83% et 0.

Les profils de ségrégation méiotique obtenus pour chacun des deux éjaculats ne sont pas significativement différents.

### Discussion :

Ce patient étudié n'est ni porteur d'une translocation robertsonienne ni d'une translocation réciproque équilibrée. C'est à notre connaissance la première étude de ségrégation méiotique rapportée chez un homme porteur d'une telle anomalie

chromosomique. Le phénotype de ce patient est normal car son chromosome dérivé est formé de tout le chromosome 18 (le subtélomère 18p est présent) et des bras longs du chromosome 14. Tout comme dans les translocations robertsoniennes, la perte des bras courts d'un chromosome acrocentrique est sans conséquence phénotypique.

Les modes de ségrégation dont sont issus les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés sont les modes adjacent et 3:0, comme chez les porteurs de translocations robertsoniennes. Le pourcentage de gamètes chromosomiquement déséquilibrés est de 9,03% et 12,74%, respectivement pour les éjaculats 1 et 2. Ces proportions sont identiques à celles rapportées dans la littérature chez les porteurs de translocations robertsoniennes. Ainsi, les résultats de l'analyse de la ségrégation méiotique de notre patient s'expliquent très probablement par la formation d'un trivalent en configuration *cis* entre le chromosome dérivé et les chromosomes 14 et 18 normaux. La configuration adoptée au stade pachytène, par les chromosomes impliqués dans l'anomalie, détermine le mode de ségrégation préférentiel.

D'autre part, nous n'avons pas noté de différence significative entre les deux éjaculats. Nous ne mettons pas en évidence de variations intraindividuelles. Ceci nous indique que le profil de ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une anomalie chromosomique de structure n'est pas aléatoire. La mécanique méiotique suit des règles qui restent les mêmes dans le temps.

Etant donné le fort taux de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés, une ICSI a été réalisée suivie du transfert d'un embryon mais, à notre connaissance, aucune grossesse n'a été obtenue.

## Article 7

Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3)  
translocation carrier: A case report

# Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: A Case Report

A.Perrin<sup>1</sup>, N.Douet-Guilbert<sup>1,2</sup>, B.Laudier<sup>3</sup>, M.L.Couet<sup>4</sup>, F.Guérif<sup>4</sup>, D.Royère<sup>4</sup>, M.J.Le Bris<sup>2</sup>, M.De Braekeleer<sup>1,2,5</sup> and F.Morel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, <sup>2</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, <sup>3</sup>Service de Génétique and <sup>4</sup>CECOS, Biologie de la Reproduction, CHU Bretonneau, Tours, France

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, Avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest Cedex 3, France. E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

**A 35-year-old male was found to have a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) karyotype during the investigations for a couple with infertility for 8 years. Two sperm samples were obtained and analysed in triple fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the D18Z1 and LSI IGH/BCL2 probes. The frequency of gametes exhibiting a normal or balanced chromosomal equipment was 87.26 and 90.97% in samples 1 and 2, respectively. No statistically significant difference was found between the results of meiotic segregation of both samples. These proportions are close to those observed among Robertsonian translocation carriers. They can probably be explained by the formation of trivalent in *cis* configuration during meiosis I between the derivative chromosome and the normal chromosomes 14 and 18, as in Robertsonian translocation carriers. These results suggest that the configuration adopted at pachytene strongly determines the segregation mode that will be preferentially followed during anaphase I.**

*Key words:* meiotic segregation/intra-individual variation/fluorescence *in situ* hybridization/chromosomal translocation

## Introduction

Balanced reciprocal and Robertsonian translocations are the most common structural chromosomal rearrangements in infertile men (De Braekeleer and Dao, 1991; De Braekeleer *et al.*, 2006). Balanced reciprocal translocations result from the exchange of chromosomal material between two heterologous chromosomes without loss or gain of material, giving a 46-chromosome karyotype. Robertsonian translocations involve the fusion of the long arms of two acrocentric chromosomes (13, 14, 15, 21 and 22 pairs), with subsequent loss of their short arms, leading to a 45-chromosome karyotype. Generally, carriers of these balanced reciprocal and Robertsonian translocations have no phenotypic consequences, but they can produce a significant percentage of chromosomally unbalanced gametes (ranging from ~5 to >80%) (Morel *et al.*, 2004a, 2006; Benet *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2005; Midro *et al.*, 2006; Moradkhani *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2006).

In this study, we analysed and compared the meiotic segregation in spermatozoa from two different samples of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) carrier using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The case reported here is neither a

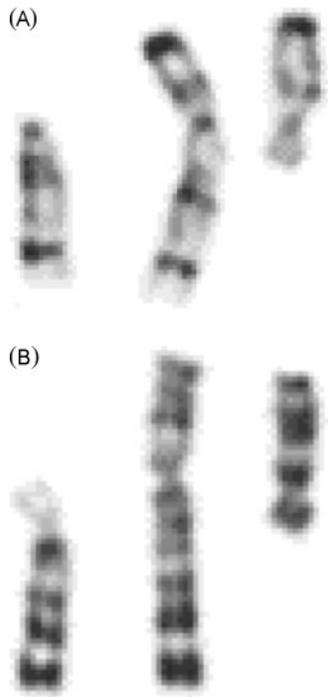
reciprocal translocation nor a Robertsonian translocation. To our knowledge, this is the first meiotic segregation study in a male carrier of such an abnormality.

## Materials and methods

### *Patient's history and cytogenetic analysis*

A couple (29-year-old female and 35-year-old male) presented with an 8-year history of primary infertility. The female partner had had one miscarriage, but no cytogenetic study was performed on the pregnancy loss. The male partner was found to have a very severe oligoasthenozoospermia on two consecutive semen analyses (0.01 and 0.02 million spermatozoa/ml).

Subsequent karyotyping of the male peripheral blood using G and R banding showed a translocation involving chromosomes 14 and 18 (Figure 1). His karyotype was 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3). A complementary FISH analysis using CEP14/22 (D14Z1 and D22Z1, spectrum green, Cytocell, Compiègne, France) and 18p subtelomere-specific probe (D18S552, spectrum red, Cytocell) allowed the accurate identification of the translocation. The karyotype was rewritten as 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3).ish der(18)t(14;18)(q11;p11.3) (D18S552+,D14Z1-,D22Z1-).



**Figure 1.** Partial G- (A) and R- (B) banded karyotype showing the 14 and 18 normal chromosomes and the der(18) in the 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) carrier.

The results of a physical examination were normal, and there was no evidence of mental retardation. Familial cytogenetic investigations showed the patient's parents to have a normal karyotype.

**Sperm analyses**

*Sample collection*

Before this study, the patient was informed of the investigations and gave his consent. Two sperm samples were obtained at >3 months

interval. Given the low sperm concentration, the spermogram and the spermocytogram were not performed again, the whole sample being used for FISH analysis.

*Analysis of the meiotic segregation*

Detailed procedures for sperm preparation and FISH have been previously described (Morel *et al.*, 2004c; Douet-Guilbert *et al.*, 2005). Triple FISH was carried out using the specific alphoid probe of chromosome 18 (D18Z1, spectrum aqua, Abbott, Rungis, France) and LSI IGH/BCL2 probes which are a mixture of the LSI IGH probe (~1.5 Mb, spectrum green, Abbott) and the LSI BCL2 probe (~750 kb, spectrum orange, Abbott).

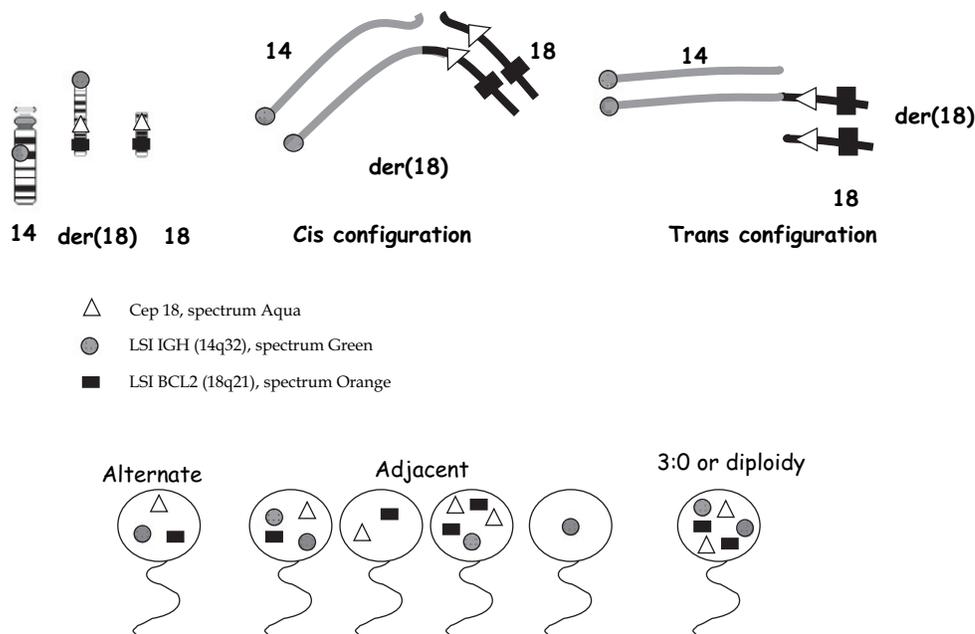
Ideogram showing the localization of the DNA probes and the various segregation patterns after analysis using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Le Pecq, France) and Isis (significant *in situ* imaging system) (MetaSystems, Altussheim, Germany) are schematized in Figure 2. Sperm nuclei were analysed using strict selection criteria (Morel *et al.*, 1997). All spermatozoa presenting at least one green and/or orange and/or aqua signal were scored.

Statistical analysis was carried out using the chi-square with correction for small numbers. The significance level was set at  $P < 0.05$ .

**Results**

A total of 981 (sample 1) and 144 (sample 2) spermatozoa were analysed after triple FISH. The results of the meiotic segregation in both samples are summarized in Table I. For samples 1 and 2, respectively, 87.26 and 90.97% of the analysed nuclei showed one orange, one green and one blue signal corresponding to a normal or balanced chromosomal complement resulting from alternate segregation.

The proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa resulting from the adjacent mode was estimated at 9.08 and 6.95% (samples 1 and 2, respectively). No statistically significant difference was found in the proportion of nuclei showing two orange, one green and two blue signals and those with one



**Figure 2.** Ideogram of the chromosomes involved in the rearrangement and the probes used. The trivalent (*cis* and *trans* configurations) and the various segregation patterns are schematized.

**Table I.** Results of the meiotic segregation in two different samples from a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) carrier

Fluorescence signals	Segregation modes	Chromosomal equipment	Number (%) of sperm	
			Sample 1	Sample 2
OGB	Alternate	14/18 or der(18)t(14;18)	856 (87.26)	131 (90.97)
OOGBB	Adjacent	18/der(18)t(14;18)	9 (0.92)	1 (0.70)
G	Adjacent	14	4 (0.41)	4 (2.78)
OGGB	Adjacent	14/der(18)t(14;18)	46 (4.69)	3 (2.08)
OB	Adjacent	18	30 (3.06)	2 (1.39)
OOGGBB	3:0 or diploidy	14/18/der(18)t(14;18)	18 (1.83)	0 (0)
Others			18 (1.83)	3 (2.08)

B, blue; G, green; O, orange.

green signal, or between the rate of spermatozoa showing one orange, two green and one blue signal and those with one orange and one blue signal.

No statistically significant difference was found between the results of meiotic segregation of both samples ( $P > 0.05$ ).

### Discussion

In this study, we report the results of the meiotic segregation in two different samples from a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) carrier. The patient has a normal phenotype because this translocation results in the formation of a metacentric chromosome composed of the whole chromosome 18 (18p subtelomere present) and the long arm of chromosome 14. The loss of the short arm of chromosome 14 is without consequence because it only contains nucleolar organizer genes. However, as a consequence of this rearrangement, the patient has only 45 chromosomes.

Meiotic segregation studies in males carrying a reciprocal translocation showed the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa to vary from 10 to >80% (Morel *et al.*, 2004a, 2006; Benet *et al.*, 2005). In males carrying a Robertsonian translocation, meiotic segregation studies showed most spermatozoa to be chromosomally normal or balanced (ranging from 72 to 93%) (Morel *et al.*, 2004a, 2006; Roux *et al.*, 2005; Brugnon *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2006).

The frequency of gametes exhibiting a normal or balanced chromosomal equipment in the patient reported here was 87.26 and 90.97% in samples 1 and 2, respectively. These proportions are close to those observed among Robertsonian translocation carriers. In Robertsonian translocation carriers, during prophase I meiosis, pairing of the involved chromosomes gives a trivalent structure (Vidal *et al.*, 1982; Luciani *et al.*, 1984). Thus, the results of meiotic segregation in spermatozoa of this 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) carrier can probably be explained by the formation of trivalent in *cis* configuration during meiosis I between the derivative chromosome and the normal chromosomes 14 and 18, as in Robertsonian translocation carriers.

Theoretically, in Robertsonian translocation carriers and in the patient reported here, *cis* or *trans* configurations are possible (Figure 2). Luciani *et al.* (1984) using meiotic cytogenetics on testicular biopsies found that the trivalent was always in *cis* configuration (Luciani *et al.*, 1984). Moreover, it is well known that the *cis* configuration tends to segregate in an alter-

nate way, producing chromosomally balanced and normal spermatozoa. However, a small proportion of unbalanced gametes deriving from adjacent or 3:0 segregation is also produced. Moreover, Luciani *et al.* (1984) found an association of trivalent and sex vesicle in most of the nuclei at the pachytene stage in a sterile t(13;14) carrier (Luciani *et al.*, 1984). This association could lead to gametogenic arrest and produce severe spermatogenic impairment (Johannisson *et al.*, 1993; Gabriel-Robez and Rumpler, 1996).

The results of meiotic segregation in both samples showed no variations. To the best of our knowledge, a single study on intra-individual variations was previously published; no difference was found in the meiotic segregation profiles between two samples from a male carrier of a t(9;22)(q21;q11.2) (Morel *et al.*, 2004b). Four studies have analysed the meiotic segregation of translocations within families; similar profiles were found in each family but not between families (Estop *et al.*, 1992; Rousseaux *et al.*, 1995; Cora *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2004c, 2006).

As the frequency of normal or balanced gametes was ~90%, it was decided to try an IVF with microinjection. Ten oocytes were collected, 3 fertilized, but a single embryo was obtained and transferred, without pregnancy. A new attempt will be made during the year.

In conclusion, this study shows that the configuration adopted at pachytene strongly determines the segregation mode that will be preferentially followed during anaphase I.

### Acknowledgements

A.P. is the recipient of a studentship from the region Bretagne.

### References

- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C and Navarro J (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111,281–290.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I and Van Steirteghem A (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21,685–693.
- Cora T, Acar H and Kaynak M (2002) Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21;q25). *J Androl* 23,793–798.
- De Braekeleer M and Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6,245–250.
- De Braekeleer M, Perrin A and Morel F (2006) Chromosomal abnormalities in male infertility. In De Braekeleer M (ed.) *Cytogenetics and Infertility*. Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 27–52.

- Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, De Braekeleer M and Morel F (2005) Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 28,372–379.
- Estop AM, Levinson F, Ciepły KM and Van Kirk V (1992) The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 89,425–429.
- Gabriel-Robez O and Rümpler Y (1996) The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness. II. Robertsonian and reciprocal translocations. A European collaborative study. *Ann Genet* 39,17–25.
- Johannisson R, Schwinger E, Wolff HH, vom Ende V and Lohrs U (1993) The effect of 13;14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenet Cell Genet* 63,151–155.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A and Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 38,14–22.
- Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R and Kurpisz M (2006) Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet* 140,245–256.
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P and Pellestor F (2006) Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* 21,1166–1171.
- Morel F, Mercier S, Roux C, Clavequin MC and Bresson JL (1997) Estimation of aneuploidy levels for 8, 15, 18, X and Y chromosomes in 97 human sperm samples using fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 67,1134–1139.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J and De Braekeleer M (2004a) Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 27,200–212.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, Delobel B, Amice V, Amice J and De Braekeleer M (2004b) Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Hum Reprod* 19,2227–2230.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M and Bresson JL (2004c) Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81,682–685.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J and De Braekeleer M (2006) Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In De Braekeleer M (ed.) *Cytogenetics and Infertility*. Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 53–112.
- Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A and Liebaers I (2006) Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 12,209–215.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J and Sele B (1995) Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 71,240–246.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC and Bresson JL (2005) Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocations carriers. *Cytogenet Genome Res* 111,291–293.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S and Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5,21–26.

*Submitted on May 31, 2006; resubmitted on August 3, 2006; accepted on August 8, 2006*

Les anomalies chromosomiques de structure peuvent concerner plus de deux chromosomes. Il s'agit alors de réarrangement chromosomique complexe (CCR).

E- Translocation réciproque équilibrée chez un fœtus après fécondation par un spermatozoïde recombinant d'un homme porteur d'un CCR

Un CCR peut être chromosomiquement équilibré. Les gamètes peuvent entraîner la formation d'un embryon chromosomiquement déséquilibré mais il arrive aussi que du fait de crossing-over, l'anomalie chez l'embryon soit simplifiée aboutissant à une translocation réciproque équilibrée simple (Madan *et al.*, 1997).

Nous avons été confrontés au cas d'un patient porteur d'un remaniement chromosomique complexe. Nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier la ségrégation méiotique dans les gamètes de ce patient. Mais, nous avons pu étudier le caryotype de son fœtus afin de comprendre quel type de spermatozoïde (d'un point de vue chromosomique) a dû féconder l'ovocyte permettant de former le fœtus étudié.

---

**Article 8 : Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18.**

A. Basinko, A. Perrin, H.-A.Nguyen, F. Morel, M.-J. Le Bris, A.-H. Saliou, M. Collet, P. Parent, C. Benech, S. Quemener, C. Ferec, N. Douet-Guilbert and M. De Braekeleer. *American Journal of Medical Genetics* (sous presse).

---

**Résultats :**

Le caryotype du père d'un fœtus a montré la présence d'une anomalie chromosomique de structure complexe avec l'implication de 3 chromosomes (2, 3 et 18) et de 4 points de cassure. La formule chromosomique du père est :

46,XY,t(2;3;18)(3pter->3p24::2p22->2qter;18qter->18q23::2p274->2p22::3p24->3qter;18pter->18q23::2p274->2pter). Le fœtus est porteur d'une translocation

réciroque équilibrée entre les chromosome 2 et 18, sa formule chromosomique est 46,XY,t(2;18)(p274;q23). La simplification de l'anomalie de structure observée chez le fœtus vient du fait que la fécondation d'un ovocyte a été réalisée par un spermatozoïde porteur du chromosome der(18) et d'un recombinant du chromosome 2 du père. La recombinaison s'est produite dans le spermatocyte I au stade pachytène de méiose I entre le chromosome 2 et le der(3). Une étude en CGH array n'a pas mis en évidence de déséquilibre chromosomique chez le fœtus par comparaison à l'ADN du père.

### **Discussion :**

Les modes de ségrégation méiotique chez un homme porteur d'un CCR équilibré produisent différents équipements gamétiques. L'implication de 3 chromosomes dans le réarrangement a induit la formation d'un hexavalent au stade pachytène de prophase de méiose I. Cette configuration produit des modes de ségrégation méiotique de type 3:3, 4:2, 5:1 ou encore 6:0. La simplification de l'anomalie de structure chez le fœtus peut s'expliquer par deux évènements. Dans un premier temps, il s'est produit un crossing-over entre le chromosome 2 et le der(3), le der(3) est constitué du chromosome 3 de 3qter à 3p24, d'une petite zone du bras court du chromosome 2 (2p274→2p22) puis de l'extrémité du bras long du chromosome 18 (18qter→18q23). Lors de l'appariement des régions homologues, un crossing-over dans la région 2p274→2p22 a entraîné la formation d'une recombinant rec(2). Celui-ci est composé du chromosome 2 de 2qter à 2p274 et de l'extrémité du bras long du chromosome 18 (18qter→18q23).

Dans un deuxième temps, la ségrégation méiotique s'est ensuite produite selon un mode 3:3, permettant d'associer dans un même gamète, le chromosome 3, le recombinant du chromosome 2 et le der(18). Cet équipement chromosomique entraîne, chez le fœtus, une simple translocation réciroque équilibrée.

Certains pensent que l'infertilité chez les hommes porteurs d'un CCR peut être due à un échec de synapsis et/ou à une perturbation de la vésicule sexuelle par les chromosomes impliqués dans le CCR (Madan *et al.*, 1997). Les femmes n'ayant pas de formation de

vésicule sexuelle, aucune interférence à ce niveau là ne peut se produire expliquant peut-être l'impact différent sur la gamétogenèse de la femme et celle de l'homme (Patsalis, 2007).

Dans le cas de notre étude, afin d'améliorer le conseil génétique de ce couple lors d'un nouveau désir de grossesse, il serait très intéressant de réaliser une FISH sur gamètes afin d'évaluer le taux de spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés.

## Article 8

Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement  
involving chromosomes 2, 3 and 18

# Balanced Transmission of a Paternal Complex Chromosomal Rearrangement Involving Chromosomes 2, 3, and 18

Audrey Basinko,<sup>1,2</sup> Aurore Perrin,<sup>1,2,3</sup> Huyen Anh Nguyen,<sup>1,2</sup> Frédéric Morel,<sup>1,2,3</sup> Marie-Josée Le Bris,<sup>1,2</sup> Anne-Hélène Saliou,<sup>4</sup> Michel Collet,<sup>4</sup> Philippe Parent,<sup>5</sup> Caroline Benech,<sup>6</sup> Sylvia Quemener,<sup>6</sup> Claude Ferec,<sup>6</sup> Nathalie Douet-Guilbert,<sup>1,2,3</sup> and Marc De Braekeleer<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Brest, Brest, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Brest, France

<sup>3</sup>INSERM U613, Brest, France

<sup>4</sup>Service de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Brest, France

<sup>5</sup>Service de Pédiatrie et de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Brest, France

<sup>6</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité, Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Brest, France

Received 19 January 2009; Accepted 18 May 2009

## TO THE EDITOR:

Complex chromosomal rearrangements (CCRs) are structural rearrangements involving at least three chromosomes or three breakpoints [Pai et al., 1980]. At present, more than 130 cases are reported [Goumy et al., 2006]. CCRs can be balanced or unbalanced, associated with normal or abnormal phenotype. Familial CCRs represent 1/3 of the cases. The majority of balanced CCR are carried by females. Most often, CCRs induce reduction of male fertility, disturbing gametogenesis, or spontaneous abortions. Few fertile male carriers of a CCR have been described [Cai et al., 2001; Grasshoff et al., 2003]. They were ascertained through abnormal offspring.

Here, we report the prenatal diagnosis of a recombinant of a balanced paternal CCR involving three chromosomes and four breakpoints using a combination of cytogenetic techniques and array comparative genomic hybridization (aCGH).

This couple (35-year-old woman and man) was referred for prenatal cytogenetic diagnosis because of a paternal chromosomal rearrangement. A CCR involving three chromosomes had been identified in another center 5 years earlier in a fetus following amniocentesis for increased maternal serum markers. An apparently balanced CCR involving three chromosomes was identified in the fetus and found to have been inherited from his father. The couple reported a history of two miscarriages. Familial cytogenetic investigations were not performed.

Chromosome analyses from peripheral blood lymphocytes of the parents using standard cytogenetic techniques with RHG-banding were first performed in another cytogenetic center and again in our laboratory in order to compare the karyotypes of both fetus and father. The father's karyotype was found to

## How to Cite this Article:

Basinko A, Perrin A, Nguyen HA, Morel F, Le Bris M-J, Saliou A-H, Collet M, Parent P, Benech C, Quemener S, Ferec C, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. 2009. Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3, and 18.

Am J Med Genet Part A 9999:1–5.

involve three chromosomes and four breakpoints; it was written as: 46,XY,t(2;3;18)(3pter → 3p24::2p22 → 2qter;18qter → 18q23::2 p2 ?4 → 2 p 22::3p24 → 3qter;18pter → 18q23::2p2?4 → 2pter) (Fig. 1A). Insertion of material of chromosome 2 in the derivative chromosome 3 was direct. Chromosomal analysis of the mother showed a normal 46,XX karyotype.

Chromosome analyses were performed on amniotic fluid cells using standard cytogenetic techniques with RHG-banding, after having obtained informed consent [Le Bris et al., 2003]. The fetus was found to be carrier of a simple reciprocal translocation between chromosome 2 and chromosome 18 with two breakpoints (Fig. 1B).

\*Correspondence to:

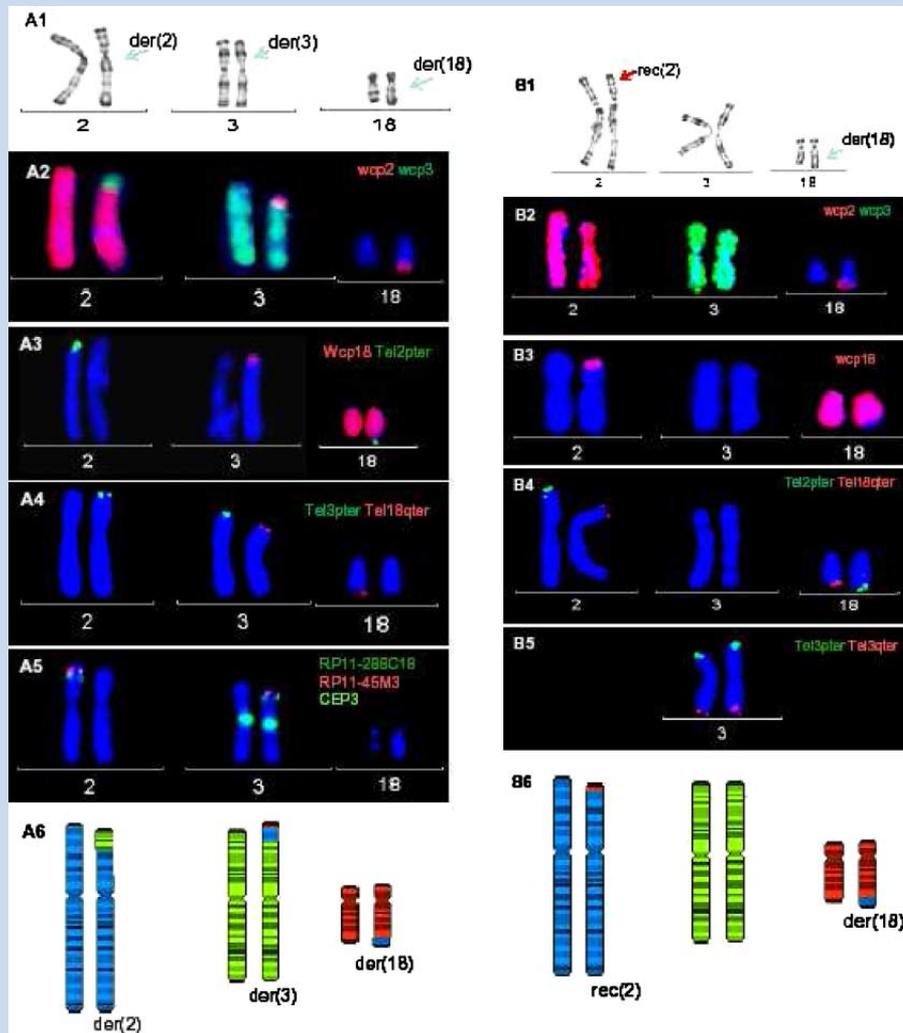
Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, Avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France.

E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

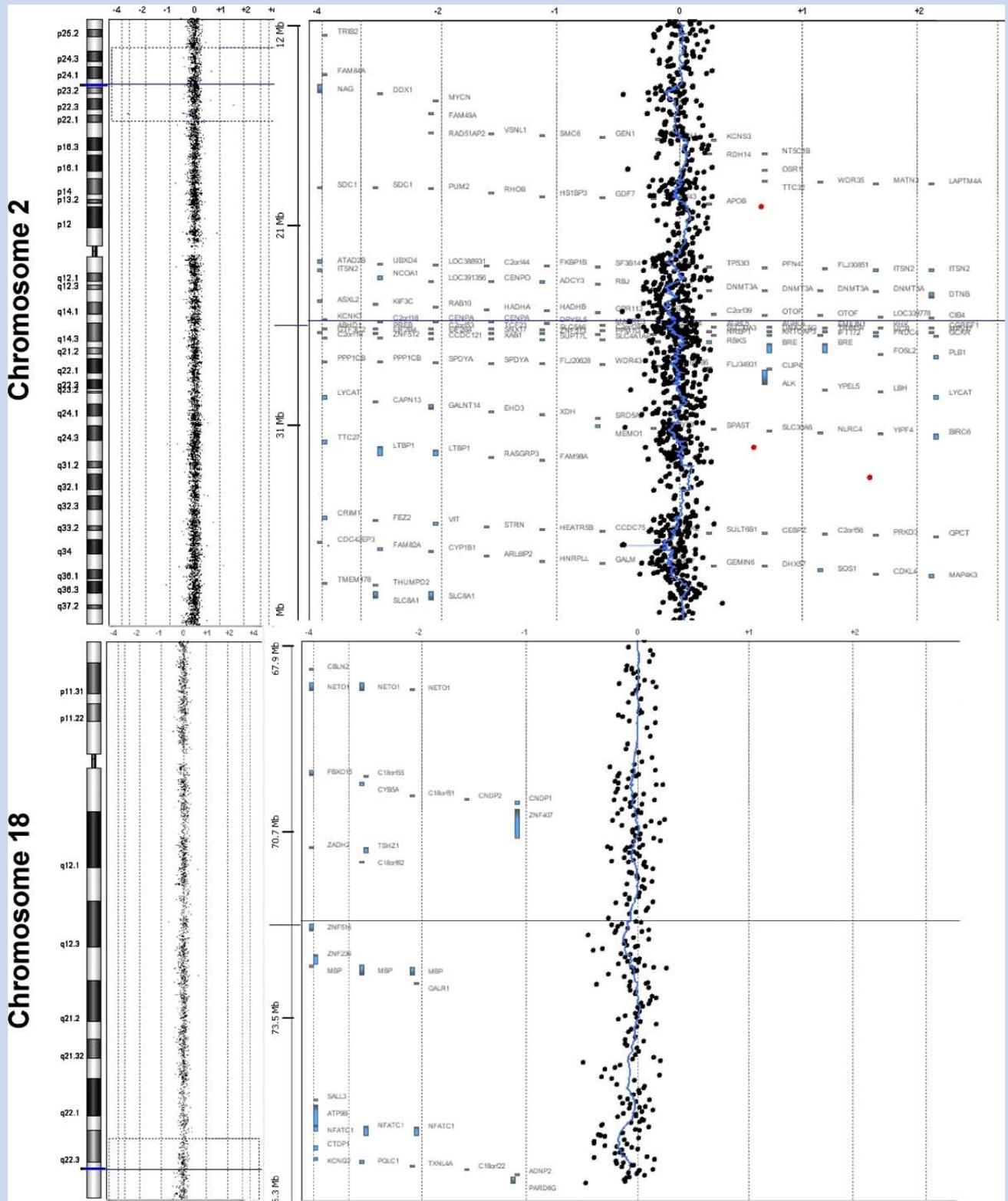
Published online 00 Month 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.32982



**FIG. 1. A:** Partial karyotype and FISH analyses of the father. **A1:** Partial RHG Karyotype showing normal chromosomes 2, 3, and 18 on the left and the derivative chromosomes 2 [der(2)], 3 [der(3)] and 18 [der(18)] on the right. **A2:** FISH with whole chromosome painting probes of chromosome 2 [wcp2, spectrum Red] and chromosome 3 [wcp3, spectrum Green] on normal chromosomes 2, 3, and 18 on the left and der(2), der(3), and der(18) on the right. The picture shows wcp3 on the der(2), wcp2 on the der(3), and wcp2 on the der(18). **A3:** FISH with wcp of chromosome 18 [spectrum Red] and specific subtelomeric probes of the short arm of chromosome 2 [Tel2pter, spectrum Green] shows wcp18 on der(3), no Tel2pter signal on der(2), and presence of Tel2pter signal on der(18). **A4:** FISH with specific subtelomeric probes of the long arm of chromosome 18 [Tel18qter, spectrum Red] and specific subtelomeric probes of the short arm of chromosome 3 [Tel3pter, spectrum Green] shows Tel3pter and Tel18qter on der(2) and der(3), respectively. **A5:** FISH with bacterial artificial chromosome (BAC) clones RP11-288C18 [spectrum Green] and RP11-45M3 [spectrum Red] mapping to the short arm on chromosomes 2 (2p22 → 2p24) and specific centromeric probes of chromosome 3 [spectrum Green] shows RP11-288C18 and RP11-45M3 on der(3). **A6:** Ideograms of chromosomes 2, 3, 18 and derivatives, respectively. **B:** Partial karyotype and FISH analyses of the fetus. **B1:** Partial RHG Karyotype showing normal chromosomes 2, 3, and 18 on the left and the recombinant chromosome 2 [rec(2)] and the derivative chromosome [der(18)] on the right. **B2:** FISH with whole chromosome painting probes of chromosome 2 [wcp2, spectrum Red] and chromosome 3 [wcp3, spectrum Red] on normal chromosomes 2, 3, and 18 on the left and rec(2), normal chromosome 3 and der(18) on the right. The picture shows wcp2 on the der(18). **B3:** FISH with wcp of chromosome 18 [spectrum Red] shows wcp18 on der(2). **B4:** FISH with specific subtelomeric probes of the long arm of chromosome 18 [Tel18qter, spectrum Red] and specific subtelomeric probes of the short arm of chromosome 2 [Tel2pter, spectrum Green] shows Tel18qter and Tel2pter on der(2) and der(18), respectively. **B5:** FISH with specific subtelomeric probes of the short and the long arm of chromosome 3 [Tel3pter, spectrum Green and Tel3qter, spectrum Red] shows normal chromosomes 3. **B6:** Ideograms of chromosomes 2, 3, 18, the recombinant of chromosome 2 and the derivative chromosome 18.



These results were confirmed by FISH techniques using whole chromosome painting probes of chromosomes 2 (wcp2), 3 (wcp3), and 18 (wcp18) (QBIOgene, Illkirch, France), specific subtelomeric probes of the short arm of chromosome 2 and long arm of chromosome 18 (Abbott, Rungis, France) and bacterial artificial chromosome (BAC) clones [Basinko et al., 2008]. The fetus inherited from his father the derivative chromosome 18 and a recombinant chromosome 2. The fetus' karyotype was 46,XY,rec(2)(18qter → 18q23::2p2?4 → 2qter)pat, der(18)(18pter → 18q23::2p2?4 → 2pter)pat or 46,XY,t(2;18)(p2?4;q23).

Detection of gene copy number was performed by aCGH experiments following standard and manufacturer's recommendations (Agilent™, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using 105000 oligo probes approximately spaced at 150 kb intervals across the genome (Human Genome CGH microarray 105A kit, Agilent™). The analysis revealed no cryptic chromosomal imbalance between father and fetus (Fig. 2).

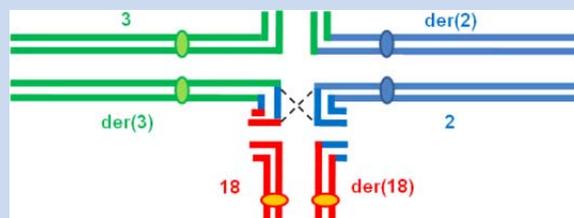
No morphological abnormalities were found in the fetal ultrasound examinations. The woman delivered a healthy boy at term. His weight was 3.870 kg and his length 55 cm. The clinical examination at birth was normal, but for bilateral epicanthal folds.

Balanced CCRs are rare [Rothlisberger et al., 1999], but their number has increased with the use of molecular techniques [Patsalis et al., 2004]. Familial cases have been mainly reported in CCRs with a three-way exchange. Familial transmission of CCR is more often observed in women than men [Batista et al., 1994; Rothlisberger et al., 1999]. In male carriers, abnormal meiotic segregation can induce arrest or abnormal spermatogenesis. However, male transmission of CCR without reduction of fertility has been described [Meer et al., 1981; Gorski et al., 1986; Rothlisberger et al., 1999; Cai et al., 2001; Grasshoff et al., 2003; Lespinasse et al., 2003]. In our case, the couple did not appear to have male infertility.

Meiotic segregation of a balanced CCR can produce different gametic combinations. At pachytene stage, a CCR involving three chromosomes induce a hexavalent. Many disjunctions could occur with 3:3, 4:2 and rarely 5:1 or 6:0 segregation modes. Alternate segregation would produce normal karyotype or balanced rearrangement. The first child had the same karyotype as his father, resulting from a 3:3 alternate segregation. Of the imbalanced segregations, adjacent-1 segregation is the most common [Madan et al., 1997; Rothlisberger et al., 1999]. CCR with four or more breakpoints would be expected to product a higher proportion of unbalanced gametes [Gorski et al., 1988].

Balanced gametic combination can result from alternate segregation or balanced recombinant. In the current pregnancy, the fetus karyotype resulted from a meiotic recombinant, defined as a structurally rearranged chromosome with a new segmental composition resulting from meiotic crossing-over between a displaced segment and its normally located counterpart (Fig. 3).

Recombinants are most likely to originate in inversion or insertion fragments [Masuno et al., 1993; Van Hemel and Eussen, 2000; Bartels et al., 2007]; they simplify the inherited complex rearrangement [Madan et al., 1997]. In our patient, synapsis of homologous chromosomes induced hexavalent configuration. The recombination between chromosome 2 and the derivative chromosome 3 in the direct inserted fragment (2p22-2p2?4) simplified the inherited rearrangement in the fetus (Fig. 3).



**FIG. 3. Pachytene diagram of the paternal CCR showing crossing-over between the normal chromosome 2 and the derivative chromosome 3 (in the inserted fragment) leading to a simplified and balanced translocation in the fetus.**

According to de Gregori et al. [2007], phenotypic abnormalities occur in 40% of apparently balanced chromosome rearrangements and in most patients with CCR [de Gregori et al., 2007]. Thus, many studies suggested the use of high-resolution techniques such as aCGH in addition to cytogenetic analysis to exclude cryptic imbalance at breakpoint sites or other sites [Borg et al., 2007; de Gregori et al., 2007]. In our case, aCGH profiles of the father and the fetus were superimposed (Fig. 2). Therefore, the chromosomal rearrangement in the fetus was considered to be balanced, as in his father, and chromosomal breakpoints had no influence on the phenotype. However, the simplification of the inherited paternal translocation cannot rule out uniparental disomy.

Recombination is a rare, but possibly recurrent, finding in families carrying a CCR [Rothlisberger et al., 1999]. The risk for the offspring of a balanced CCR carrier is difficult to be estimated. For future pregnancies, considering the familial history, the risk for this couple could be in the order of 50%. To improve genetic counseling, meiotic studies by FISH on spermatozoa could also be suggested to give this couple a personalized assessment of the risk for future pregnancies.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philippe Combot, Catherine Hunault, Véronique Rault, Janine Salaun, Gisèle Toullec, and Corinne Tous for their excellent technical assistance. Aurore Perrin is the recipient of a doctoral studentship from the "Région Bretagne."

## REFERENCES

- Bartels I, Starke H, Argyriou L, Sauter SM, Zoll B, Liehr T. 2007. An exceptional complex chromosomal rearrangement (CCR) with eight breakpoints involving four chromosomes (1;3;9;14) in an azoospermic male with normal phenotype. *Eur J Med Genet* 50:133–138.
- Basinko A, Douet-Guilbert N, Parent P, Blondin G, Mingam M, Monot F, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M. 2008. Familial interstitial deletion of the short arm of chromosome 4 (p15.33-p16.3) characterized by molecular cytogenetic analysis. *Am J Med Genet* 146<sup>Q1</sup>:899–903.
- Batista DA, Pai GS, Stetten G. 1994. Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet* 53:255–263.

- Borg K, Nowakowska B, Obersztyn E, Cheung SW, Brycz-Witkowska J, Korniszewski L, Mazurczak T, Stankiewicz P, Bocian E. 2007. Complex balanced translocation t(1;5;7)(p32.1;q14.3;p21.3) and two microdeletions del(1)(p31.1p31.1) and del(7)(p14.1p14.1) in a patient with features of Greig cephalopolysyndactyly and mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 143A:2738–2743.
- Cai T, Yu P, Tagle DA, Lu D, Chen Y, Xia J. 2001. A de novo complex chromosomal rearrangement with a translocation 7;9 and 8q insertion in a male carrier with no infertility. *Hum Reprod* 16:59–62.
- de Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previdere C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. 2007. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: A study of 59 patients. *J Med Genet* 44:750–762.
- Gorski JL, Emanuel BS, Zackai EH, Mennuti M. 1986. Complex chromosomal rearrangement and multiple spontaneous abortions. *Hum Genet* 74:326.
- Gorski JL, Kistenmacher ML, Punnett HH, Zackai EH, Emanuel BS. 1988. Reproductive risks for carriers of complex chromosome rearrangements: Analysis of 25 families. *Am J Med Genet* 29:247–261.
- Goumy C, Mihaescu M, Tchirkov A, Giollant M, Benier C, Francannet C, Jaffray JY, Geneix A, Vago P. 2006. De novo balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosome 8, 11 and 16 in a boy with mild developmental delay and psychotic disorder. *Genet Couns* 17:371–379.
- Grasshoff U, Singer S, Liehr T, Starke H, Fode B, Schoning M, Dufke A. 2003. A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: Ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q13 → q24.1 and partial monosomy 4q27 → q28 [corrected]. *Cytogenet Genome Res* 103:17–23.
- Le Bris MJ, Marcorettes P, Audrezet MP, Parent P, Heren P, Le Guern H, Herry A, Morel F, Collet M, Ferec C, De Braekeleer M. 2003. Prenatal diagnosis of mosaic tetrasomy 8p. *Am J Med Genet Part A* 120A:44–48.
- Lespinasse J, North MO, Paravy C, Brunel MJ, Malzac P, Blouin JL. 2003. A balanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failure. *Hum Reprod* 18:2058–2066.
- Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. 1997. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 99:806–815.
- Masuno M, Asano J, Yasuda K, Kondo T, Orii T. 1993. Balanced complex rearrangement involving chromosomes 8, 9, and 12 in a normal mother, derivative chromosome 9 with recombinant chromosome 12 in her daughter with minor anomalies. *Am J Med Genet* 45:65–67.
- Meer B, Wolff G, Back E. 1981. Segregation of a complex rearrangement of chromosomes 6, 7, 8, and 12 through three generations. *Hum Genet* 58:221–225.
- Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR. 1980. Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18:436–444.
- Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. 2004. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet* 12:647–653.
- Rothlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, Schinzel A. 1999. Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. *Eur J Hum Genet* 7:873–883.
- Van Hemel JO, Eussen HJ. 2000. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 107:415–432.

Q1: Please specify whether it is Part A, Part B, or Part C.

## F- Inversions péricentriques et ségrégation méiotique chez des patients infertiles

La dernière anomalie chromosomique de structure que nous avons étudiée est l'inversion péricentrique afin de comprendre la mécanique méiotique dans les gamètes d'hommes porteurs d'un tel remaniement.

---

### **Article 9 : Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8.**

E. Caer, A. Perrin, N. Douet-Guilbert, V. Amice, M. De Braekeleer, F. Morel  
Fertility and Sterility, 2008, 89(6):1637-1640

---

### **Article 10 : DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality.**

A. Perrin, E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel Fertility and Sterility (sous presse)

---

## **Résultats :**

Nous avons étudié la ségrégation méiotique, par FISH, dans les gamètes de 6 patients porteurs d'inversion péricentrique. Trois patients sont porteurs d'une inversion péricentrique du chromosome 8 dont les formules chromosomiques sont :

46,XY,inv(8)(p12q21), 46,XY,inv(8)(p12q24.1), 46,XY,inv(8)(p23q24).

Un patient a une inversion péricentrique d'un chromosome 1 (46,XY,inv(1)(p36.3q43)), un autre d'un chromosome 2 (46,XY,inv(2)(p11q13)) et le dernier patient a une inversion péricentrique d'un chromosome 20 (46,XY,inv(20)(p12.3q13.33)). En fonction de la richesse des éjaculats, nous avons analysé entre 69 et 3402 spermatozoïdes par patient. Le taux de gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés varie de 60,94% à 99,43%. Le taux de gamètes recombinants (dup(p)/del(q) ou l'inverse) varie de 0% à 37,71%. Lorsque des recombinants sont présents, le ratio des deux types de

recombinants est de 1 pour tous les patients. Le rapport de la taille du segment inversé par rapport au chromosome entier est compris entre 10% et 95%.

### **Discussion :**

Dans ces études, le taux de gamètes recombinants varie considérablement d'un patient à l'autre. Ainsi, le risque d'une descendance viable n'est pas identique même si l'inversion péracentrique touche un même chromosome. La production de gamètes recombinants varie selon le chromosome impliqué, la région inversée, les points de cassure mais surtout selon la taille du segment inversé par rapport à la taille totale du chromosome. En dessous de 30%, il n'y a aucun gamète recombinant. Le risque d'avoir une descendance avec un chromosome recombinant, lorsque le segment inversé fait entre 30% et 50% de la taille totale du chromosome, est légèrement accru. Au dessus de 50%, en revanche, le risque de produire des gamètes recombinants devient important.

D'autre part, plus le segment inversé est grand, plus la probabilité qu'un crossing-over ait lieu au sein de la boucle est élevée. Si un gamète recombinant féconde un ovocyte, l'embryon ainsi formé a une trisomie et une monosomie partielles de petite taille. Ainsi la probabilité que la grossesse aille à son terme et qu'il y ait naissance d'un enfant polymalformé avec retard psychomoteur est augmentée. A l'inverse, plus le segment inversé est petit, moins il y a de risque qu'un crossing-over se produise au niveau de la région inversée. Mais s'il se produit, l'embryon formé aura des régions monosomique et trisomique de grande taille. Le risque qu'il n'y ait pas d'implantation ou une fausse couche spontanée sera donc plus élevé. La probabilité que la grossesse aille à son terme sera faible.

## Article 9

Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8

## Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8

Emilie Caer, Pharm.,<sup>a,b</sup> Aurore Perrin, M.Sc.,<sup>b</sup> Nathalie Douet-Guilbert, M.D.,<sup>a,b</sup>  
Véronique Amice, M.D.,<sup>a</sup> Marc De Braekeleer, M.D., Ph.D.,<sup>a,b</sup> and Frédéric Morel, Ph.D.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan; and <sup>b</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

**Objective:** To determine the meiotic segregation of a pericentric inversion of chromosome 8 in three carriers.

**Design:** Analysis of sperm nuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH).

**Setting:** University hospital.

**Patient(s):** Three males with an inv(8).

**Intervention(s):** Triple FISH with the 8q and 8p subtelomeres and the specific alphoid of chromosome 9 probes.

**Main Outcome Measure(s):** Meiotic segregation differences between carriers.

**Result(s):** The frequencies of nonrecombinant gametes were 97%, 60.94%, and 61.03%. The frequencies of recombinant sperm were 1.44%, 37.71%, and 37.70%, whereas the size of the inverted segment represented 31%, 61%, and 80% of the size of the whole chromosome 8.

**Conclusion(s):** Many factors seem to influence the production of recombinant chromosomes: the affected chromosome and involved region, location of the breakpoints, or size of the inverted segment. Our results show that the rate of recombination varies principally according to the size of the inverted segment. (Fertil Steril® 2008;89:1637–40. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Meiotic segregation, spermatozoa, FISH, chromosome 8, pericentric inversion

Pericentric inversions are structural chromosomal abnormalities resulting in two breaks on both sides of the centromere within the same chromosome followed by a 180° rotation and reunion of the inverted segment. All the chromosomes, but most frequently chromosomes 2 and 8, are known to be involved in pericentric inversions (1, 2). Generally, carriers of these inversions have no phenotypic consequences, but they can produce a significant percentage of chromosomally unbalanced gametes. These recombinant spermatozoa have both duplicated and deleted chromosome segments involving the regions distal to the inversion (duplication q/deletion p or duplication p/deletion q).

Only 15 studies have analyzed the sperm nuclei of 21 pericentric inversion carriers using heterospecific fecundation or fluorescence in situ hybridization (FISH) (3, 4). In these studies, the frequencies of unbalanced spermatozoa varied from 0 to more than 50% (3, 5–10).

Received December 13, 2006; revised and accepted April 30, 2007.

Reprint requests: Marc De Braekeleer, M.D., Ph.D., Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, Avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest CEDEX 3, France (FAX: +33-0-2-98-01-81-89; E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr).

Our study used FISH to analyze the meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. To our knowledge, this is the first study analyzing the chromosomal equipment in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion involving the same chromosome.

### MATERIALS AND METHODS

#### Cytogenetic Analysis and Sperm Parameters

Patient 1, a 35-year-old man with a 46,XY,inv(8)(p12q21) karyotype, was referred after his wife (46,XX) had had one first-trimester spontaneous abortion with a 69,XXY,inv(8)(p12q21) fetus. His sperm parameters were normal according to the criteria of World Health Organization (Table 1) (11).

Patient 2, a 30-year-old man, was discovered following the birth of a child with a 46,XX,rec(8)dup(8p)inv(8)(p12q24.1) karyotype. Analysis of his semen showed a teratozoospermia with 88% abnormal forms.

Patient 3, a 43-year-old man and carrier of a pericentric inversion, inv(8)(p23q24), was referred for intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI). Semen analysis showed an asthenozoospermia with 50% immobile spermatozoa, very low

**TABLE 1****Patients, karyotype, and sperm parameters.**

Patient	Age (years)	Ascertainment	Karyotype	Sperm parameters	Sperm concentration × 10 <sup>6</sup> /mL	Motility (%)	Abnormal forms (%)
1	35	Fetus with abnormal karyotype	46,XY,inv(8)(p12q21)	Normal	76	86	45
2	30	Birth of a child with an unbalanced karyotype	46,XY,inv(8)(p12q24.1)	Teratozoospermia	31.2	45	88
3	43	Systematic exam before ICSI	46,XY,inv(8)(p23q24)	Asthenoteratospermia	200.8	50	97

Caer. Meiotic segregation of chromosome 8 inversion. *Fertil Steril* 2008.

velocity of the mobile ones, and a severe teratozoospermia with 97% abnormal forms.

Before this study, all three patients were informed of the investigation and gave their consent. The size of the inverted segment represented 31% (patient 1), 61% (patient 2), and 80% (patient 3) of the size of the whole chromosome 8.

### Analysis of Recombinant Products

The sperm samples of the three patients were analyzed in triple FISH with the 8q (labeled in spectrum orange) and 8p (labeled in spectrum green) subtelomeres and the specific alphoid of chromosome 9 (D9Z, labeled in spectrum aqua) probes (Abbott, Rungis, France).

Before hybridization, sperm heads were decondensed during 1 minute in a NaOH 1 mol/L solution. The hybridization procedure and analysis were previously described elsewhere (12). The slides were analyzed using a Zeiss Axio Plan microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (significant in-situ imaging system) (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

Spermatozoa with one green, one orange, and one blue signal were classified as nonrecombinant (normal or inverted); spermatozoa with one blue and two green signals or one blue and two orange signals were scored as recombinant. Nuclei with one blue and two green signals had partial 8p duplication/8q deletion; nuclei with one blue and two orange signals had partial 8q duplication/8p deletion.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the chi-square test to compare the frequencies of nonrecombinant spermatozoa obtained for the three chromosome 8 pericentric inversion carriers and to compare the frequencies of both types of recombinant products obtained for each patient.

### RESULTS

A total of 3402 spermatozoa for patient 1, 2601 spermatozoa for patient 2, and 2045 for patient 3 were analyzed (Table 2). The frequencies of nonrecombinant gametes were 97%, 60.94%, and 61.03% for patients 1, 2, and 3, respectively. There was a statistically significant difference between the frequencies of nonrecombinant spermatozoa among the three patients ( $P < .001$ ).

The frequencies of recombinant sperm with partial duplication of the p arm and deletion of the q arm were 1% (patient 1), 19.99% (patient 2), and 20% (patient 3) whereas the frequencies of recombinants with partial duplication 8q and deletion 8p were 0.44%, 17.72%, and 17.70% for patients 1, 2, and 3, respectively. For each patient, the frequencies of the two types of recombinant products (dup8q/del8p or del8q/dup8p) were not statistically significantly different from the expected 1:1 ratio ( $P > .05$ ).

**TABLE 2****Frequencies of recombinant sperm in four men heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 8.**

Patient	Karyotype	Inversion size (%)	No. of spermatozoa	Non-recombinants (%)	Recombinants (%)		
					dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	Others (%) <sup>a</sup>
1	inv(8)(p12q21)	31	3402	97	1.00	0.44	1.56
2	inv(8)(p12q24.1)	61	2601	60.94	19.99	17.72	1.35
3	inv(8)(p23q24)	80	2045	61.03	20	17.70	1.27
Martin 1993 (14)	inv(8)(p23q22)	62	3168	86.87	6.25	6.88	0

<sup>a</sup> "Others" includes nullisomies, ambiguous signals, and hybridization failures.

Caer. Meiotic segregation of chromosome 8 inversion. *Fertil Steril* 2008.

## DISCUSSION

In this study, we report the meiotic segregation from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8 using triple FISH. The frequencies of recombinant gametes were statistically significantly different among the three males.

For patient 1, 1.44% of spermatozoa had recombinant chromosomes. The risk of fetal chromosomal imbalance related to the presence of the inversion was thus 1.44% if we considered (the notion generally accepted by most teams) that the unbalanced spermatozoa are as capable of fertilizing as the normal or balanced spermatozoa (13).

In patient 2, 37.71% of his spermatozoa were recombinant (17.72% of spermatozoa with partial 8q duplication/8p deletion and 19.99% with partial 8p duplication/8q deletion). Thus, the risk of aneuploidy in the offspring was important. Indeed, the paternal inversion was discovered following the birth of a child with 46,XX,rec(8)dup(8p)inv(8)(p12q24.1). A spermatozoon with a partial 8p duplication/8q deletion had fertilized a normal oocyte, leading to a child with partial monosomy 8q/trisomy 8p. This case confirms that an embryo resulting from fertilization with a recombinant gamete can be viable. The smaller the duplicated and deleted segments are, the higher the risk of having a viable, unbalanced, recombinant zygote.

For patient 3, 37.7% of recombinant gametes were produced. Therefore, he had approximately the same risk of transmitting aneuploidy to his offspring as patient 2. Moreover, zygotes with 8q24→8qter monosomy and 8p23→8pter trisomy or 8p23→8pter monosomy and 8q24→8qter trisomy are potentially viable, and thus the risk for this couple of having a child with a polymalformation syndrome and mental retardation is important. It must be discussed with such couples of preimplantation genetic diagnosis and/or antenatal diagnosis, along with other solutions as such as donor spermatozoa or adoption.

Another case of pericentric inversion of chromosome 8 has been reported in the literature (2, 14). A 46,XY,inv(8)(p23q22) carrier was identified after his maternal first cousin

was born with a recombinant chromosome 8 (8q duplication/8p deletion). The meiotic segregation in spermatozoa of this inv(8)(p23q22) carrier was analyzed by two techniques. In one study, Martin et al. (14) analyzed the pronuclear chromosomes after in vitro penetration of golden hamster eggs. A total of 158 spermatozoa were analyzed; 88.6% were chromosomally balanced, and 11.4% were recombinant. In another study, Jaarola et al. (2) analyzed 3168 spermatozoa using a two-color FISH technique and found 86.87% to be balanced and 13.1% to be recombinant. These results, obtained by two different techniques, were not statistically significantly different ( $P>.05$ ).

In our study, the frequencies of recombinant gametes varied from 1.44% to 37.71%. These results show that the variation in the rate of recombination is wide; therefore, the risks for the offspring are variable for a pericentric inversion affecting the same chromosome.

Many factors seem to influence the production of recombinant chromosomes: the affected chromosome and involved region, location of the breakpoints, or size of the inverted segment. The rate of recombination varies principally according to the size of the inverted segment. The results of our study and those obtained in a recent study (3) are consistent with this hypothesis. Moreover, the results obtained in our study confirm that there is a slightly increased risk of aneuploidy of recombination in the offspring when the inverted segment concerns 30% to 50% of the whole chromosome length (patient 1), independent of the size of the inverted segment. Furthermore, when the size of the inverted segment is higher than 50% of the chromosome length (patients 2 and 3), the risk of aneuploidy becomes important.

*Acknowledgments:* The authors thank Drs. Béatrice Laudier, Jean-Luc Bresson, Christophe Roux, and Philippe Parent for having referred the patients.

## REFERENCES

1. Groupe Français des Cytogénéticiens Français. Pericentric inversions in man. A French collaborative study. *Ann Genet* 1986;29:129–68.

2. Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 1998;63:218–24.
3. Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136–41.
4. Malan V, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Durnerin I, Martin-Pont B, et al. Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 2006;21:2052–6.
5. Balkan W, Burns K, Martin RH. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 1983;35:295–7.
6. Jenderny J, Gebauer J, Rohrborn G, Ruger A. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 1992;89:117–9.
7. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:149–54.
8. Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 1994;93:135–8.
9. Colls P, Blanco J, Martinez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Marquez C, et al. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 1997;99:761–5.
10. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:297–304.
11. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.
12. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, et al. Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Hum Reprod* 2004;19:2227–30.
13. Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP. Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:202–8.
14. Martin RH. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 1993;62:199–202.

## Article 10

DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a  
chromosomal structural abnormality

# DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality

Aurore Perrin, M.Sc.,<sup>a,b</sup> Emilie Caer, M.D.,<sup>a,c</sup> Maria Oliver-Bonet, M.D.,<sup>d</sup> Joaquina Navarro, M.D.,<sup>d</sup> Jordi Benet, M.D.,<sup>d</sup> Véronique Amice, M.D.,<sup>c</sup> Marc De Braekeleer, M.D., Ph.D.,<sup>a,b,c</sup> and Frédéric Morel, Ph.D.<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, <sup>b</sup>INSERM U613, and <sup>c</sup>Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHU Brest, Brest, France; and <sup>d</sup>Unitat de Biologia Celular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola) Barcelona, Spain

**Objective:** To determine the meiotic segregation and DNA fragmentation in spermatozoa of carriers of a chromosomal structural abnormality.

**Design:** Case series.

**Setting:** University hospital.

**Patient(s):** Thirty-seven male carriers of a chromosomal structural abnormality (21 with a balanced reciprocal translocation, 7 with a robertsonian translocation, 9 with a pericentric inversion).

**Intervention(s):** Meiotic segregation was analyzed by the human sperm–hamster oocyte fusion technique or by fluorescent in situ hybridization, and DNA fragmentation was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling assay.

**Main Outcome Measure(s):** Relationships between abnormal sperm parameters, DNA fragmentation, and meiotic mechanisms.

**Result(s):** The average rates of chromosomally unbalanced spermatozoa were 55.22%, 14.09%, and 18.43% for reciprocal translocation, robertsonian translocation, and pericentric inversion carriers, respectively. The rates of DNA fragmentation were significantly higher in the whole group of carriers of a chromosomal structural abnormality and in each specific group than in the control group. No correlations between sperm DNA fragmentation and parameters of spermogram, age, or percentage of unbalanced chromosomal gametes were found.

**Conclusion(s):** The DNA fragmentation rate depends solely on the presence of a chromosomal structural abnormality, and, therefore, a chromosomal structural abnormality predicts DNA fragmentation. Both meiotic segregation and DNA fragmentation studies should be integrated in the genetic exploration of male carriers of a chromosomal structural abnormality. (Fertil Steril® 2009;92:583–9. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** DNA fragmentation, TUNEL, meiotic segregation, FISH, male infertility

Spermatogenesis is a process of cell differentiation involving mitotic and meiotic divisions and transforming spermatogonia to spermatozoa. This rapid expansion must be tempered by mechanisms controlling sperm production. The process that could be responsible for cell proliferation control in the testis and normal spermatogenesis is apoptosis. In the past years, data have accumulated on this process of cellular death based on a genetic program inducing biochemical, cellular, and morphologic changes (1–4).

Received April 18, 2008; revised June 17, 2008; accepted June 27, 2008; published online August 13, 2008.

A.P. has nothing to disclose. E.C. has nothing to disclose. M.O.-B. has nothing to disclose. J.N. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. V.A. has nothing to disclose. M.d.B. has nothing to disclose. F.M. has nothing to disclose.

A.P. is the recipient of a studentship from the “Région Bretagne.” M.O.-B., J.N., and J.B. are supported by FIS PI051834.

This study is dedicated to the memory of Professor Josep Egozcue.

Reprint requests to: Prof. Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, a22, avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France (FAX: + 33 (0)298 01 81 89; E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr).

During apoptosis, it is known that double-stranded DNA fragmentation occurs. These breaks can be evaluated by the terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (5–7). The presence of spermatozoa with DNA fragmentation in ejaculates is well documented, especially in infertile males (8–11). Therefore, it is likely that a proportion of spermatozoa used in assisted reproductive techniques could contain fragmented DNA, which in turn may lead to poor fertilization and/or cleavage rates obtained after in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and thus could explain male infertility (12–16).

Many other factors are known to explain male infertility and to influence spermatogenesis, chromosomal abnormalities being perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis (17, 18). Indeed, robertsonian and reciprocal translocations are found in 0.7% and 0.5% of the men investigated for infertility, respectively. Pericentric and paracentric inversions are seen in 0.16% of those men (18).

Although the infertility of the male carrier of a chromosomal structural abnormality could be explained by the

meiotic segregation of the rearrangement and/or by poor-quality semen (19), it cannot be excluded that aberration of the apoptotic process, as evidenced by DNA fragmentation, also participates in the infertility. Indeed, recently, Brugnon et al. (20) found significantly higher rates of apoptotic markers in ejaculated sperm among chromosomal translocation carriers than among sperm donors.

The aim of the present study was to evaluate DNA fragmentation rates and to analyze the meiotic segregation in ejaculated sperm of male carriers of a chromosomal structural abnormality. It was also aimed at investigating the relationships between abnormal sperm parameters, DNA fragmentation, and meiotic mechanisms in these infertile patients.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Thirty-seven male carriers of a chromosomal structural abnormality were included in the study. There were 21 men with a balanced reciprocal translocation, 7 with a robertsonian translocation, and 9 with a pericentric inversion (Table 1).

Twenty-four fertile men with normal karyotype and sperm parameters (according to World Health Organization recommendations, 1999 [21]) served as control subjects. Before the study, all 61 men were informed of the investigations and gave their consent.

### Analysis of Meiotic Segregation

Sperm samples of ten patients were analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH) with an appropriate cocktail of probes according to the chromosomal break points and sperm samples of five patients by the human sperm–hamster oocyte fusion technique in the Unitat de Biologia Celular and the Unitat de Biologia Celular i Genètica Mèdica (Universitat Autònoma de Barcelona) (Table 2). The remaining 22 samples were studied in the Brest laboratory with an appropriate cocktail probes according to the chromosomal breakpoints. The hybridization techniques and slide analyses have been previously published (22–31) (Table 2).

### Analysis of DNA Fragmentation Using the TUNEL Assay

All 61 sperm samples were analyzed in the Brest laboratory. The slides were immersed in a jar containing a 2× SSC/0.4% NP40 solution for 30 min at 37°C and then immediately passed through an ethanol series of growing concentration (70%/90%/100%).

The DNA fragmentation in sperm was detected by the ApopTag Red Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 50 μL equilibration buffer was put on the slide for 30 s at room temperature. Then 55 μL mix 1 (38.5 μL reaction buffer + 16.5 μL terminal deoxyribonucleotidyl transferase) were added. The slide, covered with a lamella, was incubated in a dark

humidified chamber at 37°C for 1 h. It was then shaken for 15 s in mix 2 (1.5 mL stop/wash buffer + 48.5 mL H<sub>2</sub>O) before being incubated for 10 min in the same mix at room temperature and washed for 1 min 30 s with 1× phosphate-buffered saline (PBS). Forty-three microliters of mix 3 (22.5 μL blocking solution + 20.5 μL antidigoxigenin-rhodamine) were added to the slide, which was covered with a lamella. Incubation was performed for 30 min in a dark humidified chamber at 37°C. The slide was washed twice for 4 min in 1× PBS. It was air-dried and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenolindol (DAPI).

The slides were analyzed using a Zeiss AxioPlan Microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with in situ imaging system (Metasystems, Altlußheim, Germany). Only spermatozoa with a flagellum were counted. A total of 500 sperm heads of each sample were analyzed. A spermatozoon was considered to contain either normal (blue nuclear fluorescence) or fragmented (partial or total red fluorescence) DNA.

### Statistical Analyses

Analysis of the data was carried out using the SPSS 14.0 program (SPSS, Paris, France). Values were compared by analysis of variance or Student *t* test; correlations were studied by the Spearman test. A *P* value of ≤ .05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Patients

The karyotype of 37 patients, their age, and their spermogram parameters are summarized in Table 1. Sperm ejaculates were obtained from patients aged 25 (patient 2) to 55 years (patient 29). Spermograms of 13 patients were considered to be abnormal because there was at least one abnormal sperm parameter, 20 were considered to be normal, and the spermograms were unknown for four patients.

### Analysis of Meiotic Segregation

The results of the meiotic segregation in sperm from the 37 carriers of a chromosomal structural abnormality are given in Table 2.

For the balanced reciprocal translocation carriers, between 128 (patient 14) and 6,590 spermatozoa (patient 15) could be analyzed. The frequencies of unbalanced spermatozoa ranged from 39.4% (patient 17) to 69.5% (patient 15), with an average of 55.22 ± 7.52%. For the robertsonian translocation carriers, the number of spermatozoa analyzed ranged from 1,002 (patient 36) to 2,901 (patient 35). The frequencies of unbalanced spermatozoa were between 8.78% (patient 34) and 21.62% (patient 31), with an average of 14.09 ± 3.99%. For the pericentric inversion carriers, we analyzed between 69 (patient 25) and 10,723 spermatozoa (patient 29). The frequencies of unbalanced spermatozoa ranged from 0.57%

TABLE 1

## Karyotype, age, and spermogram of 37 carriers of a chromosomal structural abnormality.

Patient	Karyotype	Age (yrs)	Spermogram	Reference
Reciprocal translocations				
1	46,XY,t(6;10)(p21;q26)	44	A	Not published
2	46,t(X;18)(q11;p11.1)Y	25	OAT	(52)
3	46,XY,t(8;18)(p22;q21)	32	OT	Not published
4	46,XY,t(9;22)(q21;q11.2)	32	OA	(53)
5	46,XY,t(1;17)(q31;p12)	33.5	A	Not published
6	46,XY,t(4;5)(p15;q12)	36	uk	Not published
7	46,XY,t(3;8)(q22;q23)	41	N	Not published
8	46,XY,t(4;6)(q34;q16.1)	42.5	uk	Not published
9	46,XY,t(3;13)(q27;q11)	29	O	Not published
10	46,XY,t(10;15)(p14;q26)	37.5	N	Not published
11	46,XY,t(7;22)(q32;q12)	27	N	Not published
12	46,XY,t(13;17)(q22;q23)	33	N	Not published
13	46,XY,t(1;13)(q41;q22)	36	N	(22)
14	46,XY,t(3;19)(p21;p13.3)	43	N	(22)
15	46,XY,t(4;8)(q28;p23)	31	N	(30)
16	46,XY,t(5;7)(q21;q32)	uk	N	(31)
17	46,XY,t(8;18)(p11;q11)	38	uk	Not published
18	46,XY,t(9;17)(p13;q21.3)	uk	N	(28)
19	46,XY,t(10;14)(q24;q32)	25	N	(54)
20	46,XY,t(11;17)(q13.1;p11.2)	31	T	(54)
21	46,XY,t(6;17)(q21;q25)	35	AT	Not published
Inversions				
22	46,XY,inv(8)(p12q21)	35	N	(25)
23	46,XY,inv(8)(p12q24.1)	30	T	(25)
24	46,XY,inv(2)(p11q13)	28	OA	(25)
25	46,XY,inv(1)(p36.3q43)	33	O	(25)
26	46,XY,inv(20)(p12.3q13.33)	32.5	O	(25)
27	46,XY,inv(8)(p23q24)	43	AT	(33)
28	46,XY,inv(2)(p11.2q13)	38	OA	(24)
29	46,XY,inv(10)(p13q22.3)	55	N	(24)
30	46,XY,inv(7)(p13q36)	38	N	(29)
Robertsonian translocations				
31	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	29.5	OT	Not published
32	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	41.5	uk	Not published
33	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	29	OAT	Not published
34	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	32	O	Not published
35	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	37	OA	(26)
36	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	33	OAT	(26)
37	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	30	OAT	(26)

Note: A = asthenospermia; N = normal; O = oligospermia; T = terotospermia; uk = unknown.

Perrin. Fragmentation and segregation in sperm. Fertil Steril 2009.

(patient 24) to 39.06% (patient 23), with an average of 18.43 ± 16.09%.

### Analysis of DNA Fragmentation

The percentage of DNA fragmentation among the control men varied from 0% to 3.6%, with a mean of 1.20 ± 0.95%.

For the 37 male carriers of a chromosomal structural abnormality, the percentage of DNA fragmentation varied between 1% (patient 13) and 27% (patient 8), with a mean of 6.23 ± 5.23% (Table 2). The rate of DNA fragmentation was significantly higher in the group of carriers of a chromosomal structural abnormality than in the control group ( $P < .001$ ).

**TABLE 2**

**Results of the meiotic segregation analysis by FISH and DNA fragmentation by the TUNEL assay in spermatozoa from 37 carriers of a chromosomal structural abnormality.**

Patient	Karyotype	Number of spermatozoa analyzed in segregation study	Normal or balanced spermatozoa (%)	Fragmented nucleus (%)
Reciprocal translocations				
1	46,XY,t(6;10)(p21;q26)	2150	38.56	10.4
2	46,t(X;18)(q11;p11.1)Y	447	54.36	13.6
3	46,XY,t(8;18)(p22;q21)	1141	48.38	3.4
4	46,XY,t(9;22)(q21;q11.2)	2573	54.68	2.8
5	46,XY,t(1;17)(q31;p12)	2036	49.12	1.2
6	46,XY,t(4;5)(p15;q12)	1062	45.57	3.6
7	46,XY,t(3;8)(q22;q23)	1788	34.4	9.06
8	46,XY,t(4;6)(q34;q16.1)	583	39.62	27
9	46,XY,t(3;13)(q27;q11)	546	34.43	4.6
10	46,XY,t(10;15)(p14;q26)	2733	43.36	1
11	46,XY,t(7;22)(q32;q12)	2619	41.73	7.6
12	46,XY,t(13;17)(q22;q23)	3082	47.3	1.6
13	46,XY,t(1;13)(q41;q22)	255 <sup>b</sup>	41.6	1
14	46,XY,t(3;19)(p21;p13.3)	128 <sup>b</sup>	39.1	19.2
15	46,XY,t(4;8)(q28;p23)	6590 <sup>a</sup>	30.5	3
16	46,XY,t(5;7)(q21;q32)	296 <sup>b</sup>	49.7	8.4
17	46,XY,t(8;18)(p11;q11)	3520 <sup>a</sup>	60.6	1.4
18	46,XY,t(9;17)(p13;q21.3)	131 <sup>b</sup>	51.1	5.4
19	46,XY,t(10;14)(q24;q32)	3111 <sup>a</sup>	44.6	7.6
20	46,XY,t(11;17)(q13.1;p11.2)	5371 <sup>a</sup>	40.8	8.8
21	46,XY,t(6;17)(q21;q25)	1082 <sup>a</sup>	50.7	4.2
Inversions				
22	46,XY,inv(8)(p12q21)	3402	97	5.38
23	46,XY,inv(8)(p12q24.1)	2601	60.94	8.6
24	46,XY,inv(2)(p11q13)	702	99.43	10.9
25	46,XY,inv(1)(p36.3q43)	69	68.12	1.27
26	46,XY,inv(20)(p12.3q13.33)	625	80	8.8
27	46,XY,inv(8)(p23q24)	2045	61.03	3.6
28	46,XY,inv(2)(p11.2q13)	5460 <sup>a</sup>	98.24	2
29	46,XY,inv(10)(p13q22.3)	10723 <sup>a</sup>	94.05	6
30	46,XY,inv(7)(p13q36)	140 <sup>b</sup>	75	6.4
Robertsonian translocations				
31	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	1707	78.38	5.2
32	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	1631	84.92	4.2
33	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	1846	86.67	5.8
34	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	1754	91.22	7.8
35	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	2901 <sup>a</sup>	87.49	3.2
36	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	1002 <sup>a</sup>	84.53	5.2
37	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	1272 <sup>a</sup>	88.13	1.6

Note: FISH = fluorescent in situ hybridization; TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling.

<sup>a</sup> Decondensed sperm FISH analysis.

<sup>b</sup> Human sperm-hamster oocyte fusion.

Perrin. Fragmentation and segregation in sperm. *Fertil Steril* 2009.

For balanced reciprocal translocation, robertsonian translocation, and pericentric inversion carriers, the percentages of DNA fragmentation were between 1% and 27%, 1.6% and 7.8%, and 1.27% and 10.9%, respectively. The rates of DNA fragmentation were statistically significantly higher in the reciprocal translocation group versus control group ( $P < .001$ ), in the robertsonian translocation group versus control group ( $P < .03$ ), and in the pericentric inversion group versus control group ( $P < .001$ ). There was no significant difference for DNA fragmentation rates between the three groups of chromosomal abnormality carriers ( $P > .05$ ).

A statistically significant difference was found in the DNA fragmentation rate between the 24 control men and the 13 carriers of a chromosomal abnormality with abnormal spermogram ( $P < .001$ ). Also, a statistically significant difference was found in the DNA fragmentation rate between the 24 control men and the 20 carriers of a chromosomal structural abnormality with normal spermogram ( $P < .002$ ). Nonetheless, no significant difference was found in the DNA fragmentation rate between carriers of chromosomal structural abnormality with normal spermogram and those with abnormal spermogram ( $P < .76$ ).

No correlations between sperm DNA fragmentation and age or percentage of unbalanced chromosomal gametes were found ( $P > .05$ ).

## DISCUSSION

In general, carriers of a chromosomal structural abnormality, as reciprocal or robertsonian translocations or pericentric inversions, have a normal phenotype but often have fertility problems.

In the present work, the analysis of meiotic segregation was performed by the human sperm–hamster oocyte fusion technique or by FISH with an appropriate mix of probes. For spermatozoa, FISH provides an alternative to sperm karyotyping that is less laborious, less time consuming, and easier to perform (19). Moreover, there are similarities between the results obtained by both analysis methods (28).

In this study, the majority of gametes from carriers of a reciprocal translocation arose from alternate segregation and, therefore, were normal or chromosomally balanced. The unbalanced gametes resulted mainly from the adjacent I and II modes. These results confirm those described in the literature (23, 28). Carriers of a robertsonian translocation produced more than 75% normal or balanced gametes. These results are similar with those described in the literature (26, 32). Frequencies of normal or balanced spermatozoa varied considerably from one carrier of a pericentric inversion patient to another. These results are consistent with the hypothesis that the rate of recombination varies principally according to the size and proportion of the inverted segment (24, 33).

In the present study, the rate of DNA fragmentation in a group of 24 patients with normal karyotype and spermogram was estimated at 1.2%. This value is consistent with

those previously reported in the literature (20, 34). The DNA fragmentation rate was higher among carriers of a chromosomal structural abnormality, with significantly increased rate among pericentric inversion and robertsonian and reciprocal translocation carriers compared with the control group.

To the best of our knowledge, only one earlier study has evaluated the DNA fragmentation rate in ejaculated sperm of patients carrying a chromosomal translocation. Brugnol et al. (20) compared semen samples from 20 translocation carriers (14 with reciprocal and 6 with robertsonian translocations) with those from donors. They found the DNA fragmentation rate to be significantly higher in the ejaculated sperm of carriers than in that of sperm donors (20). Therefore, a higher frequency of spermatozoa with DNA fragmentation could be another explanation of the infertility observed in men with a chromosomal structural abnormality.

The origin of DNA fragmentation in spermatozoa is still a matter of debate (10, 35–39), and many factors could be responsible for it (40–45). Dakouane et al. (40) found no difference in DNA fragmentation rate according to age among 212 men aged between 25 and 70 years. Singh et al. (46) found a significant diminution of sperm DNA fragmentation according to age among 66 men aged 20 to 57 years, whereas Wyrobeck et al. (47) found a positive correlation between sperm DNA fragmentation and age. Thus, the impact of age on sperm DNA fragmentation is still an unsolved question. In the present study, no correlation was found between the age of the patients and the DNA fragmentation rate.

Over the last years, several studies have found an increased DNA fragmentation frequency in sperm of infertile men (8–11, 34). Few studies attempted to correlate the DNA fragmentation rate with the main spermologic characteristics, leading to different conclusions. Studies found that the DNA fragmentation rate was inversely correlated to sperm quality (44), motility (45), necrozoospermia (41), sperm concentration, and/or teratozoospermia (9, 10, 15, 16).

In the present study, the DNA fragmentation rates were significantly different between the fertile men and the carriers of a chromosomal structural abnormality with abnormal or normal spermogram. No significant difference was found between the carriers of a chromosomal abnormality with normal spermogram and those with a structural abnormality and abnormal spermogram. Therefore, the present results suggest that the DNA fragmentation rate does not depend on the spermogram parameters but solely on the presence of a structural abnormality.

Sperm themselves could carry a mechanism for digesting their own DNA (48). Furthermore, it is known that mammalian spermatocytes from carriers of chromosomal rearrangements undergo a p53-independent apoptosis (49), and this apoptotic pathway is associated with synaptic disturbances in the carriers. It is also known that a feature common to the three rearrangements considered here is the labeling with gamma-H2AX and BRCA1 on the temporally synaptic regions of the multivalents or on the loops of inverted regions

(50). The presence of these protein markers in human spermatoocytes from carriers has been established (51). Therefore, the possibility that rearranged chromosomes may carry specially remodeled chromatin or even unrepaired double strand breaks could be suggested as a possible source of DNA fragmentation in sperm from carriers of a structural chromosomal rearrangement.

However, the present analysis concerned the whole ejaculate of each patient. It would be interesting to evaluate DNA fragmentation only in unbalanced chromosomal gametes.

In conclusion, the infertility of men carrying a chromosomal structural abnormality could be explained by the high frequency of unbalanced spermatozoa, the poor-quality semen, and/or the elevated rate of DNA fragmentation. It is evident that both meiotic segregation and DNA fragmentation studies should be integrated into the genetic exploration of male carriers of a chromosomal structural abnormality.

*Acknowledgments:* The authors thank E. Anton, J. Blanco, and F. Vidal (Unitat de Biologia Celular, Universitat Autònoma de Barcelona) for providing some of the samples.

## REFERENCES

- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997;16:2262–70.
- Sakkas D, Mariehoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31–7.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4:38–47.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2:103–17.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493–501.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202–5.
- Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:327–32.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:830–9.
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17:1266–73.
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129–38.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446–51.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602–7.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528–32.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331–45.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–8.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876–81.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245–50.
- De Braekeleer M, Perrin A, Morel F. Chromosomal abnormalities in male infertility. In: De Braekeleer M, ed. *Cytogenetics and infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006:27–52.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, et al. Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M, ed. *Cytogenetics and infertility*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2006:53–112.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21:685–93.
- World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction*. New York: Cambridge University Press, 1999.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 2002;8:958–63.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, et al. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 2004;27:200–12.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661–6.
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136–41.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345–51.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:297–304.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:281–90.
- Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet* 1993;53:214–9.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet I. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 2001;9:395–403.
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Miguez L, Egozcue J, et al. Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridization. *Eur J Hum Genet* 1999;7:231–8.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, et al. Segregation of chromosomes in sperm of robertsonian translocations carriers. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:291–6.
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Different mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 2008;89:1637–40.
- Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130–40.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;7:428–32.

36. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27:890–8.
37. Santiso R, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Fernandez JL. Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 2007;87:191–4.
38. Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 2007;14:384–95.
39. Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008;23:11–6.
40. Dakouane M, Albert M, Bergere M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, et al. Aging and spermatogenesis: an histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:659–64.
41. Guerin P, Matillon C, Bleau G, Levy R, Menezo Y. Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:665–8.
42. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 2006;85:496–9.
43. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy nonsmokers. *Hum Reprod* 2007;22:180–7.
44. Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, et al. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007;87:572–83.
45. Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey AR, Ozturk O, Groome NP, Serhal P, et al. Relationship between male reproduction hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online* 2007;14:159–65.
46. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;80:1420–30.
47. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Armheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9601–6.
48. Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 2003;69:2029–35.
49. Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998;18:257–61.
50. Turner JMA, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GVR, et al. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 2004;14:2135–42.
51. Scieurano R, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Solari AJ. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant gamma-H2AX and associates with the XY body. *Hum Reprod* 2007;22:142–50.
52. Perrin A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Keromnes G, Langlois ML, Barrière P, et al. Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: case report. *Hum Reprod* 2008;23:227–30.
53. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, et al. Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Hum Reprod* 2004;19:2227–30.
54. Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J, et al. From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod* 2004;19:2515–22.

## G- Anomalie de nombre et ségrégation méiotique chez un patient infertile

Nous avons étudié la ségrégation méiotique dans les gamètes d'un patient avec des troubles de la fertilité, porteur d'une anomalie chromosomique de nombre.

---

### **Article 11 : Increased aneuploidy rates in spermatozoa of a male carrier of a trisomy 18 mosaicism.**

A. Perrin, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, P. May-Panloup, A. Guichet, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel. *International Journal of Andrology*, 2009, 32(3):231-234

---

#### **Résultats :**

Le patient étudié a une oligotératozoospermie ( $1,2 \times 10^6$ /mL et 84% de formes anormales). L'analyse FISH sur gamètes chez un patient porteur d'une trisomie 18 en mosaïque décelée sur sang (47,XY,+18[13]/46,XY[16]) a montré qu'il y a significativement plus de disomies 13 (0,46% *versus* 0,14%) et 18 (0,68% *versus* 0,06%) ainsi que de disomies gonosomiques (0,78% *versus* 0,24%) que dans un groupe témoin. Le taux de diploïdie est également plus élevé dans les gamètes de ce patient que dans le groupe témoin (0,93% *versus* 0,32%).

#### **Discussion :**

Notre analyse montre que les mécanismes méiotiques sont perturbés. Ce patient a un risque multiplié par 3,8, par rapport au groupe témoin, d'engendrer une descendance aneuploïde et un risque multiplié par 2,9 d'engendrer une descendance triploïde. Ce risque accru de déséquilibre chromosomique est dû à la présence d'une anomalie de nombre en mosaïque mais aussi aux paramètres spermatiques anormaux. En effet, cette augmentation du risque s'observe aussi chez des patients au caryotype normal mais dont les paramètres spermatiques sont médiocres. Ainsi, le risque n'est pas plus élevé que

celui de la population prise en ICSI. De plus, nous connaissons l'estimation de la mosaïque dans les lymphocytes mais pas au niveau testiculaire.

## Article 11

Increased aneuploidy rates in spermatozoa of a male carrier of a trisomy 18  
mosaicism

## ORIGINAL ARTICLE

# Increased aneuploidy rates in spermatozoa of a male carrier of a trisomy 18 mosaicism

A. Perrin,\*† N. Douet-Guilbert,\*† M. J. Le Bris,\* P. May-Panloup,‡ A. Guichet,§ V. Amice,\* J. Amice,\*† M. De Braekeleer\*† and F. Morel\*†

\*Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, †Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, ‡Laboratoire de Fécondation In Vitro, CHU Angers, Angers and §Service de Génétique, CHU Angers, Angers, France

## Summary

### Keywords:

aneuploidy, fluorescence in situ hybridization, male infertility, mosaic trisomy 18, spermatozoa

### Correspondence:

M. De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest Cedex 3, France.  
E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Received 21 June 2007; revised 20 September 2007; accepted 9 October 2007

doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00840.x

Semen analysis of a 31-year-old infertile man showed a severe oligoteratozoospermia. Karyotyping of peripheral blood lymphocytes showed a 47,XY,+18[13]/46,XY[16] mosaicism. Cultured skin fibroblasts, right and left jugal smears showed 3, 50 and 65% trisomic cells respectively. The aim of the study was to evaluate the aneuploidy rates of chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 and the diploidy rate in his spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. The rate of disomy 18 was significantly increased in the spermatozoa of the patient (0.68%) compared to the control group (0.06%). A statistically significant difference in the rates of disomy for chromosome 13 (0.46% vs. 0.14%) and the gonosomes (0.78% vs. 0.24%) and diploidy (0.93% vs. 0.34%) was also found between the patient and the control group. However, no significant difference was observed for chromosome 21 (0.34% vs. 0.15%). Our results show evidence of a generalized perturbation of the meiotic mechanism that could lead to an increased risk for a mosaic trisomy 18 infertile male of producing offspring with aneuploidy that is not only on account of the father's mosaicism, but also more particularly because of severe oligoteratozoospermia.

## Introduction

Structural and numerical chromosomal abnormalities are known in humans. Trisomy 18 is a rare syndrome with an incidence estimated as 1/8000 live births (de Grouchy & Turleau, 1984). It is reported that approximately 5–10% of trisomy 18 patients are mosaics, a normal cell line being present together with the trisomic cell line (de Grouchy & Turleau, 1984; Carey, 2005).

To our knowledge, more than 10 males carrying a trisomy 18 mosaicism have been reported (Beratis *et al.*, 1972; Bass *et al.*, 1982; Carter *et al.*, 1985; Begleiter & Harris, 1995; Lim & Su, 1998; Peschka *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2007). The clinical picture varies considerably, from the typical phenotype associated with homogeneous trisomy 18 and early death to a normal phenotype with normal intelligence (Tolmie, 1997; Tucker *et al.*, 2007). For those men with normal phenotype and normal intelligence, the chromosomal abnormality is usually discovered because of infertility problems on account of severe oligozoospermia (Lim & Su, 1998) or

azoospermia (Peschka *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000) or the birth of a child with a homogeneous trisomy 18 (Beratis *et al.*, 1972).

Intracytoplasmic sperm injection is now a widely accepted procedure to assist fertilization in couples with severe male infertility. However, one problem remains – the potentially elevated genetic risk associated with the increased incidence of chromosomal abnormalities in infertile males (De Braekeleer & Dao, 1991; De Braekeleer *et al.*, 2006). The aim of this study was to determine whether there was an increased aneuploidy risk among the offspring of an infertile man with trisomy 18 mosaicism. Therefore, we evaluated the aneuploidy rates of chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 and the diploidy rate in his spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH).

## Materials and methods

### Patient

This 31-year-old man was first seen at the CHU Angers for infertility problems. Semen analysis showed a severe

oligozoospermia (1.2 million spermatozoa/mL) and teratozoospermia with 84% of morphologically abnormal forms. A testicular biopsy was not performed. Karyotyping of peripheral blood lymphocytes showed a 47,XY,+18[13]/46,XY[16] mosaicism. Cultured skin fibroblasts, right and left jugal smears showed 3, 50 and 65% trisomic cells respectively. A sample of leucocytes was analysed using interphase FISH; 47.95% of the nuclei were found to have three signals for the 18 centromeric probe (nuc ish (D18Z1x3)[35/73]).

Four fertile men with a normal karyotype and sperm parameters according to World Health Organization (1999) served as controls. Prior to this study, all five men were informed of the investigations and gave their consent.

### Analysis of aneuploidy in sperm cells

Each sample was analysed in dual FISH with a cocktail of 13q14 and 21q22 probes (LSI 13q14 and LSI 21q22, dual colour, PNAT2113; QBIogene, Illkirch, France) and in triple FISH X–Y–18 with specific alphoid probes of chromosomes X (DXZ1, spectrum green; Abbott, Rungis, France), Y (DYZ1, spectrum red; Abbott) and 18 (D18Z1, spectrum aqua; Abbott).

The hybridization techniques and analyses were previously described (Morel *et al.*, 2004). Briefly, sperm nuclei were decondensed with a solution of NaOH 1M during 3 min. The slides are immersed in a jar of 2× SSC/0.4% NP40 solution for 30 min at 37 °C and then immediately passed through an ethanol series of growing concentration (70, 90 and 100%). The denaturation was performed simultaneously on spermatozoa and probes for 1 min at 75 °C. The slides were incubated overnight in a dark humidified chamber at 37 °C. They were washed for 45 sec in 0.4× SSC/0.3% NP40 at 72 °C and for 20 sec in 2× SSC/0.1% NP40 at room temperature. Finally, they were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenol-indole.

The slides were analysed using a Zeiss AxioPlan Microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (in situ imaging system; Metasystems, Altusheim, Germany).

Slides were included for scoring when the hybridization efficiency was ≥98%. Sperm nuclei were analysed using strict selection criteria. Nuclei with no fluorescent signals, either nullisomic nuclei for the chromosomes or non-hybridized nuclei resulting from technical failure, were excluded (Morel *et al.*, 1997).

### Statistical analysis

An independent chi-squared test was used to compare the results obtained for the 47,XY,+18/46,XY patient and those observed in the control group.

## Results

In dual FISH 13–21, a total of 871 spermatozoa were analysed for the sperm sample from the patient and 18 736 spermatozoa for the fertile men. The rate of chromosome 13 disomy was significantly higher in the patient sample than that among the controls (0.46% vs. 0.14%) ( $p = 0.047$ ). No significant difference was observed for chromosome 21 (0.34% vs. 0.15%) ( $p > 0.05$ ).

In triple FISH X–Y–18, a total of 1924 spermatozoa from the 46,XY/47,XY,+18 patient and 20 874 spermatozoa from the fertile men were analysed. The disomy 18 rate was significantly higher in the spermatozoa from the patient (0.68%) than that in those of the control group (0.06%) ( $p < 0.001$ ). The rate of gonosome disomies was 0.78%, a value significantly higher than that of the control group (0.24%) ( $p < 0.001$ ).

The frequency of sperm diploidy found in the patient (0.93%) was also significantly higher than in the controls (0.32%) ( $p < 0.001$ ; Table 1)

## Discussion

Several studies have reported mosaicism in parents of children with homogeneous autosomal trisomies such as trisomy 16, trisomy 18, trisomy 21 and trisomy 22. For example, among five cases of homogeneous trisomy 18, Beratis *et al.* (1972) found trisomy 18 mosaicism in one of the fathers. This father, who was diagnosed as mosaic (47,XY,+18[4]/46,XY[96] in skin fibroblast culture and 47,XY,+18[5]/46,XY[65] in peripheral blood culture), had a normal phenotype and his intelligence was above average (Beratis *et al.*, 1972).

Thus, the question of a possible increased rate of aneuploidy in spermatozoa from patients with autosomal trisomy mosaicism remains to be answered. Lim & Su (1998) found that the rate of disomy 18 in spermatozoa from a mosaic trisomy 18 male (47,XY,+18[23]/

**Table 1** Disomy and diploidy rates (%) in spermatozoa from a 47,XY,+18/46,XY carrier and four men with a normal 46,XY karyotype and sperm parameters (controls)

	47,XY,+18/46,XY	Controls
Disomy X	0.15	0.09
Disomy Y	0.21	0.07
Disomy XY	0.42	0.08
Disomy 18 <sup>a</sup>	0.68	0.06
Disomy 13	0.46	0.14
Disomy 21	0.34	0.15
Diploidy	0.93	0.34

<sup>a</sup>Including 0.26% of 24,X,+18 and 0.42% of 24,Y,+18.

46,XY[9]) was not dissimilar to that found in a control sperm sample. However, his skin fibroblast cultures showed no trisomy 18 cell (Lim & Su, 1998).

In our study, the patient without phenotypic abnormalities and normal intelligence carried a mosaic trisomy 18 with an unequal distribution of cells with a pathological karyotype in different somatic tissues. The spermatogenesis alterations in this patient could be explained by the presence of two lines initially, one euploid and one aneuploid. The presence of an extra 18 chromosome may be responsible for the meiotic arrest during meiosis I (at pachytene or metaphase stages), on account of the presence of one chromosome 18 univalent at pachytene stage. Spermatozoa are produced specifically by the 46,XY line. Maybe the degree of mosaicism is different in germ cell line with essentially a 47,XY,+18 line, responsible for the severe oligozoospermia. Another explanation is the presence of an abnormal microenvironment on account of the extra 18 chromosome disrupting the spermatogenesis in the line XY. Unfortunately, the presence or not of mosaicism in germ cells in our patient was not elucidated because a testicular biopsy was not performed.

In our study, the rate of disomy 18 in spermatozoa from a patient with a mosaic trisomy 18 is significantly increased compared with the control group but remains relatively moderate. Thus, if we consider that the unbalanced spermatozoa are as capable of fertilizing as the balanced spermatozoa, the risk of foetal homogeneous trisomy 18 is higher than in the general population.

We also found a statistically significant difference in the rates of disomy for chromosome 13 and the gonosomes between the patient and the control group but did not find such a difference for chromosome 21. Moreover, an increased incidence of diploid spermatozoa was observed in our patient. Several studies found increased autosomal, gonosomal and diploidy rates in spermatozoa, of the same order as those found in our patient, from patients with a normal karyotype but with a severe oligozoospermia (Rives *et al.*, 1999; Mehdi *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2006). Thus, we agree with the fact that aneuploidy observed in spermatozoa are due preferentially to non-disjunctions in the normal 46,XY germ cell line rather than to the presence of an extra chromosome 18 in line 47,XY,+18.

In conclusion, our results show evidence of a generalized perturbation of the meiotic mechanism that could lead to an increased risk for a mosaic trisomy 18 infertile male of producing offspring with aneuploidy that is not only on account of the father's mosaicism but more particularly because of severe oligozoospermia.

## Acknowledgements

The authors thank the referees for their constructive criticisms. A. Perrin is the recipient of a doctoral studentship from the Région Bretagne.

## References

- Bass, H. N., Fox, M., Wulfsberg, E., Sparkes, R. S. & Crandall, B. F. (1982) Trisomy 18 mosaicism: clues to the diagnosis. *Clinical Genetics* 22, 327–330.
- Begleiter, M. L. & Harris, D. J. (1995) Trisomy 18 mosaicism in a 15-year-old boy with normal intelligence and short stature. *American Journal of Medical Genetics* 56, 426–427.
- Beratis, N. G., Kardon, N. B., Hsu, J. Y., Grossman, D. & Hirschhorn, K. (1972) Parental mosaicism in trisomy 18. *Pediatrics* 50, 908–911.
- Carey, J. C. (2005) Trisomy 18 and trisomy 13. In: Management of Genetic Syndromes (eds S. B. Cassidy & J. E. Allanson), pp. 555–568. Wiley-Liss, New York.
- Carter, P. E., Pearn, J. H., Bell, J., Martin, N. & Anderson, N. G. (1985) Survival in trisomy 18. Life tables for use in genetic counselling and clinical paediatrics. *Clinical Genetics* 27, 59–61.
- De Braekeleer, M. & Dao, T. N. (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Human Reproduction* 6, 245–250.
- De Braekeleer, M., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Amice, V., Amice, J. & Morel, F. (2006) Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. In: Cytogenetics and Infertility (ed. M. De Braekeleer), pp. 113–129. Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- de Grouchy, J. & Turleau, C. (1984) Atlas des Maladies Chromosomiques. Expansion Scientifique Française, Paris.
- Lim, A. S. & Su, L. C. (1998) Mosaic trisomy 18 male with normal intelligence who fathered a normal baby girl. *American Journal of Medical Genetics* 76, 365–366.
- Mehdi, M., Smatti, B., Saad, A., Guerin, J. F. & Benchaib, M. (2006) Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomal aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia* 38, 137–141.
- Morel, F., Mercier, S., Roux, C., Clavequin, M. C. & Bresson, J. L. (1997) Estimation of aneuploidy levels for 8, 15, 18, X and Y chromosomes in 97 human sperm samples using fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 67, 1134–1139.
- Morel, F., Douet-Guilbert, N., Moerman, A., Duban, B., Marchetti, C., Delobel, B., Le Bris, M. J., Amice, V. & De Braekeleer, M. (2004) Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Molecular Human Reproduction* 10, 835–838.
- Morel, F., Douet-Guilbert, N., Perrin, A., Le Bris, M. J., Amice, V., Amice, J. & De Braekeleer, M. (2006) Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: Cytogenetics and

- Infertility (ed. M. De Braekeleer), pp. 53–112. Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- Peschka, B., Leygraaf, J., van der Ven, K., Montag, M., Scharmann, B., Schubert, R., van der Ven, H. & Schwanz, G. (1999) Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 14, 2257–2263.
- Rives, N., Saint Clair, A., Mazurier, S., Sibert, L., Simeon, N., Joly, G. & Mace, B. (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Human Genetics* 105, 266–272.
- Tolmie, J. L. (1997) Down syndrome and other autosomal trisomies. In: *Principles and Practice of Medical Genetics* (eds A. E. H. Emery & D. L. Remoin), pp. 945–950. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Tucker, M. E., Garringer, H. J. & Weaver, D. D. (2007) Phenotypic spectrum of mosaic trisomy 18: two new patients, a literature review, and counseling issues. *American Journal of Medical Genetics* 143, 505–517.
- Wei, H. J., Chiang, H. S., Lin, W. M. & Wen, J. Y. (2000) Pregnancy after preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization using 18-, X-, and Y-chromosome probes in an infertile male with mosaic trisomy 18. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17, 229–231.
- World Health Organization (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, New York.

## H- Fragmentation de l'ADN spermatique et ségrégation méiotique chez des hommes porteurs d'anomalies chromosomiques constitutionnelles

Nous nous sommes intéressés à la ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'anomalies chromosomiques de structure mais également à l'intégrité de leur ADN spermatique afin de rechercher si un lien existe entre ces deux paramètres. Nous avons pour cela effectué une collaboration avec un laboratoire de Barcelone.

---

### **Article 10\* : DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality.**

A. Perrin, E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel Fertility and Sterility (sous presse)

---

#### **Résultats :**

L'analyse de la ségrégation méiotique a été réalisée dans les gamètes de 37 patients porteurs d'anomalies chromosomiques de structure. Quinze patients du laboratoire de Barcelone et 22 du laboratoire de Brest ont été étudiés. Parmi ces patients, 21 ont une translocation réciproque équilibrée, 7 ont une translocation robertsonienne et 9 ont une inversion péricentrique.

Chez les hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée entre deux autosomes, la FISH révèle un taux de déséquilibre chromosomique compris entre 39,40% et 69,50%. Pour les hommes porteurs d'une translocation robertsonienne, ce taux est compris entre 8,78% et 21,62%. Chez les hommes porteurs d'une inversion péricentrique, ce taux s'échelonne entre 0,57% et 39,06%.

Les patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure ont un taux de fragmentation compris entre 1% et 27%.

\* : L'article 10, déjà cité dans la partie F, se trouve en p. 330.

Ce taux est significativement supérieur à celui d'un groupe d'hommes fertiles au caryotype lymphocytaire normal (taux de fragmentation entre 0% à 3,6%).

Nous avons également trouvé une différence significative du taux de fragmentation entre le groupe témoin et les patients que leurs paramètres spermatiques soient normaux ou non. Aucune corrélation n'est mise en évidence entre le taux de fragmentation de l'ADN et les paramètres spermatiques, l'âge des patients ni même avec le pourcentage de gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

### **Discussion :**

Grâce à cette étude, nous avons montré que le taux de fragmentation est accru en présence d'une anomalie chromosomique de structure indépendamment des paramètres spermatiques. Mais ce taux de fragmentation ne dépend pas de la proportion de gamètes chromosomiquement déséquilibrés. Nous pensons que chez les patients infertiles porteurs d'une anomalie de structure, il est nécessaire de réaliser à la fois une étude de la ségrégation méiotique et une évaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique dans leurs gamètes. D'autre part, il serait très intéressant de savoir si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont majoritairement ceux dont l'ADN est fragmenté. En effet, notre étude et la seule autre menée jusqu'à ce jour (Brugnon *et al.*, 2006) sont toutes réalisées sur un éjaculat total. Or, l'information qui est de savoir si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que les autres peut être perdue au sein d'un éjaculat total.

Au vu de ces travaux, nous recommandons donc de réaliser, chez les hommes porteurs d'une anomalie de structure, une analyse de l'équipement gamétique par FISH et une analyse du taux de fragmentation de l'ADN spermatique. En effet, ce dernier paramètre peut se trouver significativement augmenté et participer aux troubles de la reproduction.

Ces études contribuent à la compréhension de la mécanique méiotique. Elles permettent d'expliquer l'infertilité des couples (absence de grossesse, fausses couches spontanées, naissance d'enfants polymalformés et/ou retardés mentalement) et d'améliorer le conseil génétique. Selon les résultats des analyses de ségrégation méiotique, il pourra être conseillé aux patients d'avoir recours au diagnostic prénatal, au diagnostic préimplantatoire ou encore au don de sperme. Les couples pourront également être orientés vers l'adoption.



# TRAVAUX EN COURS



## Recherche d'une éventuelle relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique des gamètes

### Contexte

Dans la littérature, jusqu'à présent seulement deux études ont analysé la fragmentation de l'ADN spermatique chez des patients porteurs d'anomalies chromosomiques de structure (Brugnon *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2008). Aucune corrélation entre le taux de fragmentation et le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés n'est montrée. Cependant, ces travaux ayant été réalisés sur éjaculat total, nous ne savons pas si les gamètes fragmentés sont majoritairement ceux dont l'équipement chromosomique est déséquilibré. Le but de notre travail est de déterminer si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal/équilibré que les patients aient ou non une anomalie de structure. La stratégie utilisée pour répondre à cette question consiste en l'analyse de l'équipement chromosomique et du taux de fragmentation dans les spermatozoïdes, d'une part, d'hommes infertiles avec un caryotype normal mais ayant un taux de fragmentation supérieur à celui de notre groupe témoin fertile et, d'autre part, d'un groupe de patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

### Patients et méthodes

Les trois hommes inclus dans l'étude sont infertiles mais se distinguent par leur caryotype : l'un a un caryotype normal (P1 : 46,XY). Ce patient, ayant une oligoasthénospermie, a été inclus dans un programme d'ICSI et 3 ICSI ont été réalisées mais aucun embryon n'a été obtenu. Les deux autres patients ont une translocation réciproque équilibrée. La formule chromosomique de P2 est 46,XY,t(13;15)(q31;q26.2), celle de P3 est 46,XY,t(7;8)(p12;p22).

## Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique :

Pour chaque patient (P1, P2 et P3), la technique TUNEL, comme précédemment décrite, est réalisée sur deux lames. L'une est utilisée pour le diagnostic, l'autre pour notre étude, en recherche. Le taux de fragmentation est estimé sur les deux lames afin de vérifier la fiabilité des résultats et la reproductibilité de la technique (Figure 40).

Pour la lame "recherche", en plus de l'analyse, une galerie d'images est constituée en identifiant chacun des gamètes comme étant fragmenté ou non comme précisé lors de l'explication de la stratégie (IV.B p. 150 à 152). La rhodamine est ensuite éliminée.

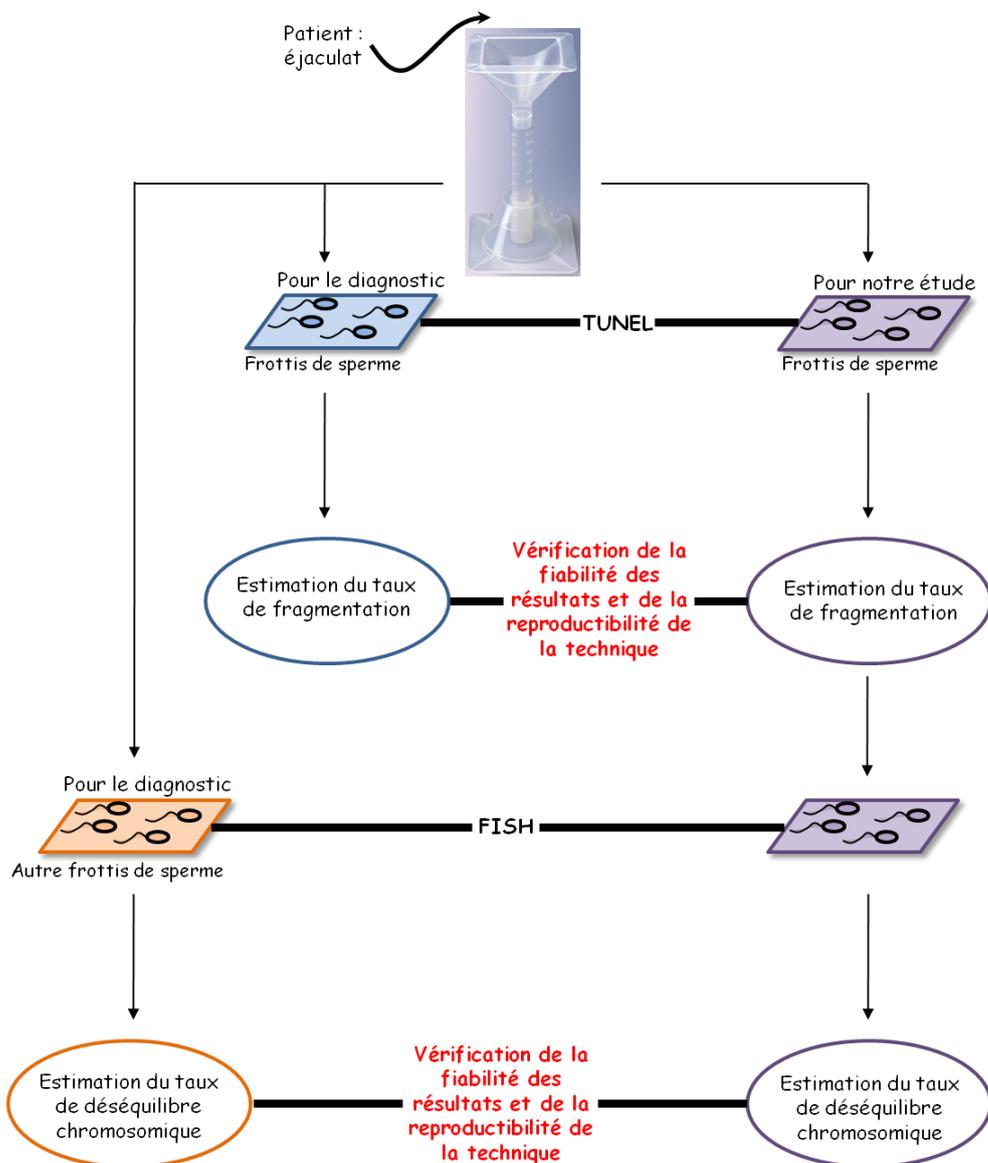


Figure 40 : Lames utilisées pour le diagnostic et lors de notre étude (recherche) et succession des techniques appliquées.

### Etude de la ségrégation méiotique :

Comme indiqué par la figure 40, la technique FISH est réalisée au diagnostic pour chaque patient sur un autre frottis de sperme. La lame " recherche " sur laquelle la technique TUNEL a été réalisée est reprise afin d'effectuer la FISH. L'estimation du taux de déséquilibre chromosomique est réalisée sur les deux lames (diagnostic et recherche) afin de vérifier la fiabilité des résultats et la reproductibilité de la technique.

Les sondes utilisées sont une CEPX (spectrum green, Abbott), CEP Y (spectrum orange, Abbott) et CEP 18 (spectrum aqua, Euromedex) pour le patient P1.

Pour le patient P2, les sondes choisies sont une subtélomérique TelVysion13q (spectrum orange, Abbott), CEP 15 (spectrum green, Abbott) et un pool de BACs s'hybridant en 15q26.3 (RP11-90E5, RP11-959F17, RP11-414K11, RP11-259N2 et RP11-277L10) (spectrum aqua, Euromedex).

Enfin, pour le patient P3, les sondes choisies sont une CEP 7 (spectrum aqua, Abbott), CEP 8 (spectrum orange, Abbott) et TelVysion8p (spectrum green, Abbott).

### Tests statistiques :

Afin de vérifier la fiabilité des résultats trouvés après les techniques TUNEL et FISH entre les lames utilisées au diagnostic et celles en recherche, nous avons utilisé respectivement un test Z et un test de Khi-deux (SPSS 15.0). Pour le test Z, l'hypothèse de départ est qu'il n'y a aucune différence de la proportion de gamètes fragmentés entre la lame de diagnostic et celle de recherche. Cette hypothèse est rejetée si  $p > 1,96$ . Le test du Khi-deux permet de comparer un effectif observé à un effectif théorique. Celui-ci est obtenu en considérant que la distribution est aléatoire. Ainsi, l'hypothèse de départ considère qu'il n'y a aucune différence significative entre les fréquences observées et les fréquences théoriques. Si la valeur p obtenue est supérieure à 0,05, alors l'hypothèse de départ est retenue, sinon, elle est rejetée.

Afin de comparer le taux de fragmentation des gamètes chromosomiquement normaux/équilibrés avec celui des gamètes déséquilibrés, un test de Khi-deux a été effectué (SPSS 15.0).

De plus, un test Z a également été utilisé pour comparer le taux de gamètes fragmentés versus le taux de gamètes non fragmentés issus d'un même mode de ségrégation méiotique.

## Résultats

### Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique :

Au diagnostic, après la technique TUNEL, le taux de fragmentation est de 17,2%, 6% et de 5,2% respectivement pour P1, P2 et P3 (Tableau 17).

En recherche, nous avons analysé 2583, 2717 et 2531 spermatozoïdes respectivement pour les patients P1, P2 et P3. Le taux de fragmentation est de 16,1% pour P1, de 7,2% pour P2 et de 4,7% pour P3. La fiabilité des résultats de l'analyse de la fragmentation de l'ADN est vérifiée, il n'y a pas de différence significative du pourcentage de fragmentation entre celui trouvé au diagnostic et celui trouvé en recherche (Tableau 17).

	Taux de fragmentation au diagnostic (%)	Taux de fragmentation en recherche (%)
P1	17,2	16,1
P2	6	7,2
P3	5,2	4,7

Tableau 17 : Résultats de l'analyse du taux de fragmentation au diagnostic et lors de l'étude, en recherche.

### Etude de la ségrégation méiotique :

En recherche, nous avons analysé 2549 spermatozoïdes en FISH pour le patient P1, 2399 pour P2 et 2239 pour le patient P3. Moins de spermatozoïdes ont pu être analysés qu'en TUNEL, car certains ont été perdus ou pour d'autres, les signaux n'étaient pas interprétables. Ainsi, nous avons eu un taux de perte de 1,3%, 11,7% et 11,5% respectivement pour les patients P1, P2 et P3.

**Pour le patient P1**, au diagnostic, nous avons mis en évidence 96,5% de gamètes avec un équipement chromosomique normal et 3,5% avec un équipement chromosomique déséquilibré. Ces valeurs sont en accord avec celles trouvées en recherche (96,1% de normaux et 3,9% de chromosomiquement déséquilibrés) (Tableau 18).

	Equipement chromosomique /	Mode de ségrégation méiotique	FISH au diagnostic (%)	FISH en recherche (%)
P1	Normal	X-18/Y-18	96,5	96,1
	Déséquilibré	X-X-18/ X-Y-18/Y-Y-18	1,6	1,7
		X-18-18/ Y-18-18	0,2	0,4
		X/Y/18	1,0	1,4
		Diploïdie	0,7	0,4
Total			100	100

Tableau 18 : Equipement chromosomique des gamètes après analyse FISH au diagnostic et lors de notre étude chez P1.

L'analyse FISH réalisée au diagnostic et celle réalisée lors de notre étude ne montre aucune différence, notre technique est donc reproductible et nos résultats sont fiables. Il est donc possible de poursuivre l'étude.

En recherche, nous avons trouvé 15,7% de gamètes fragmentés et chromosomiquement normaux et 22,7% de gamètes fragmentés et chromosomiquement déséquilibrés (Tableau 19).

	Equipement chromosomique des gamètes	Intégrité de l'ADN spermatique	
		F (%)	NF(%)
P1	Normal	15,7	84,3
	Déséquilibré	22,7	77,3

Tableau 19 : Répartition des gamètes fragmentés et non fragmentés par rapport à ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou déséquilibré chez le patient P1.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative du taux de gamètes fragmentés parmi ceux dont l'équipement chromosomique est normal et ceux dont l'équipement chromosomique est déséquilibré.

**Pour le patient P2**, au diagnostic, nous avons mis en évidence 38,1% de gamètes avec un équipement chromosomique normal ou équilibré et 61,9% avec un équipement chromosomique déséquilibré. Ces valeurs sont en accord avec celles trouvées en recherche (38,6% de normaux/équilibrés et 61,4% de chromosomiquement déséquilibrés) (Tableau 20).

	Equipement chromosomique /	Mode de ségrégation méiotique	FISH au diagnostic (%)	FISH en recherche (%)
P2	Normal/Equilibré	Alterne	38,1	38,6
	Déséquilibré	Adjacent 1	34	38
		Adjacent 2	13,2	11,7
		3:1	14,2	11,3
		4:0	0,1	0,1
		Autres	0,4	0,3
Total			100	100

Tableau 20 : Equipement chromosomique des gamètes après analyse FISH au diagnostic et lors de notre étude chez P2.

L'analyse FISH réalisée au diagnostic et celle réalisée lors de notre étude ne montre aucune différence, notre technique est donc reproductible et nos résultats sont fiables. Il est donc possible de poursuivre l'étude.

En recherche, nous avons trouvé 4,3% de gamètes fragmentés et chromosomiquement normaux/équilibrés et 7,6% de gamètes fragmentés et chromosomiquement déséquilibrés (Tableau 21).

	Equipement chromosomique des gamètes	Intégrité de l'ADN spermatique	
		F (%)	NF(%)
P2	Normal/équilibré	4,3	95,7
	Déséquilibré	7,6	92,4

Tableau 21 : Répartition des gamètes fragmentés et non fragmentés par rapport à ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou déséquilibré chez le patient P2.

L'augmentation du taux de fragmentation au sein des gamètes chromosomiquement déséquilibrés est significative ( $p=0,001$ ).

Etant donné qu'il y a significativement plus de gamètes avec un ADN fragmenté parmi ceux dont l'équipement chromosomique est déséquilibré, nous avons étudié la répartition des gamètes fragmentés selon les modes de ségrégation méiotique (Tableau 22 et Figure 41).

Equipement chromosomique / Mode de ségrégation méiotique		F (%)	NF (%)	
P2	Normal/Equilibré	Alterne	26,3	39,4
	Déséquilibré	Adjacent 1	34,2	38,3
		Adjacent 2	11,8	11,7
		3:1	25,7	10,4
		4:0	1,3	0,1
		Autres	0,7	0,1
	Total		100	100

Tableau 22 : Répartition des gamètes fragmentés et non fragmentés selon le mode de ségrégation méiotique chez P2.

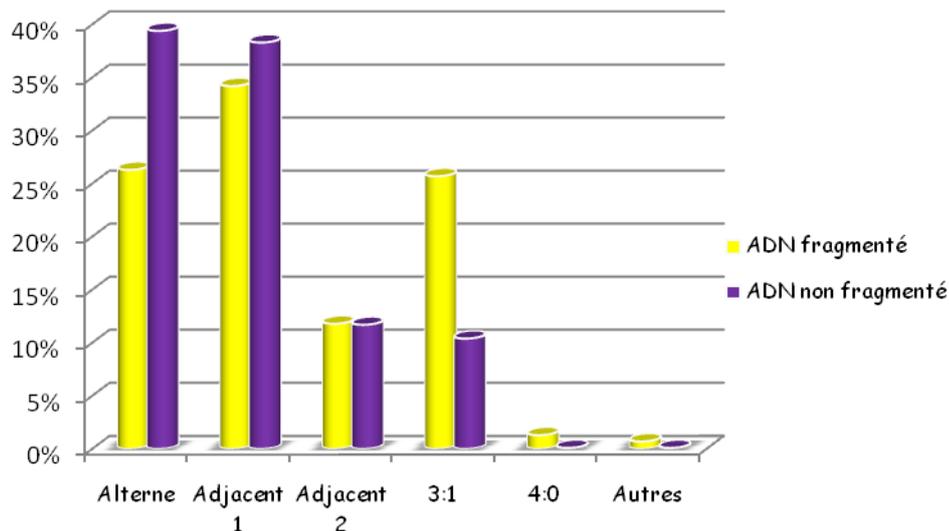


Figure 41 : Histogramme représentant la distribution des gamètes avec un ADN fragmenté et non fragmenté en fonction des modes de ségrégation méiotique chez P2.

Nous observons que le taux de gamètes fragmentés par rapport à celui des non fragmentés n'est pas différent pour les modes adjacent 1 et adjacent 2. En revanche, il y a significativement plus de gamètes fragmentés que de non fragmentés parmi les gamètes issus du mode 3:1 (respectivement 25,7% et 10,4%) ( $p=2,67$ ).

Concernant la ségrégation 4:0 et les gamètes "Autres", les effectifs sont trop réduits pour réaliser un test statistique.

La photo 22 montre des spermatozoïdes de P2 après la technique TUNEL (A) et les mêmes gamètes après la technique FISH (B).

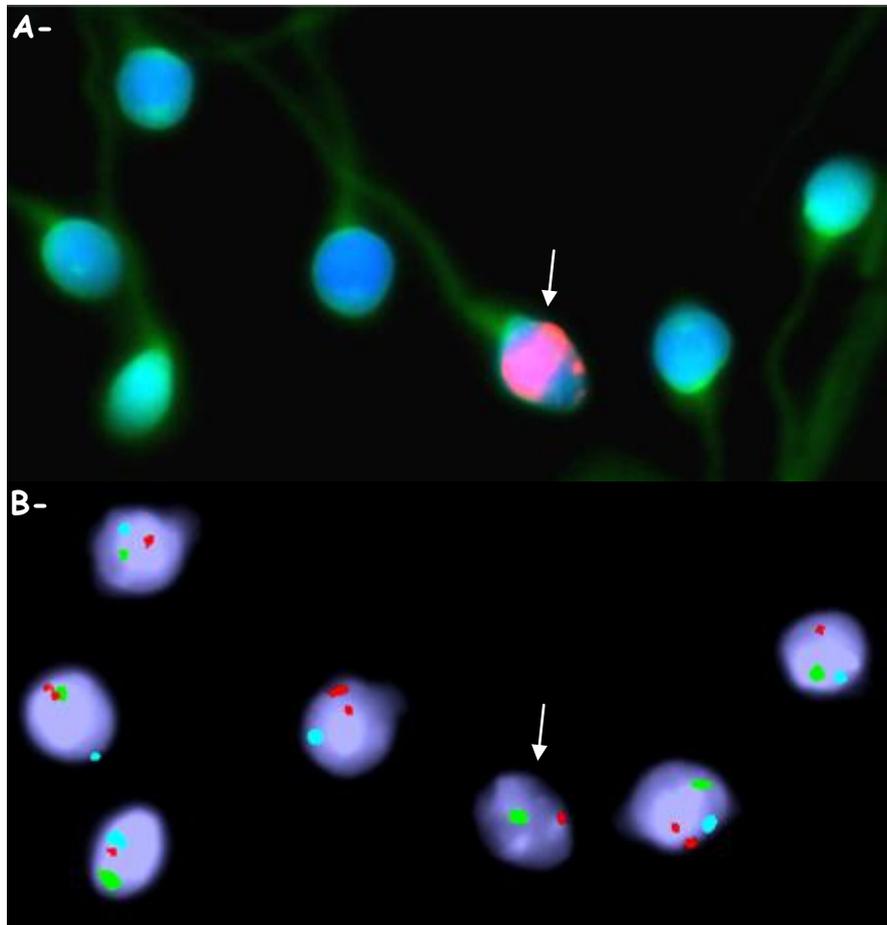


Photo 22 : Photographies de spermatozoïdes du patient P2 après la technique TUNEL (A-) et après la FISH (B- sondes TelVysion13q, CEP15 et pool de BACs en 15q26.3, avec respectivement les spectre orange, vert et aqua). Les flèches indiquent un spermatozoïde avec un ADN fragmenté (A-) et un équipement chromosomique déséquilibré issu du mode 3:1 (B-).

Pour le **patient P3**, au diagnostic, nous avons mis en évidence 45,4% de gamètes avec un équipement chromosomique normal ou équilibré et 54,6% avec un équipement chromosomique déséquilibré. Ces valeurs sont en accord avec celles trouvées en recherche (44,4% de normaux/équilibrés et 55,6% de chromosomiquement déséquilibrés) (Tableau 23).

	Équipement chromosomique /	Mode de ségrégation méiotique	FISH au diagnostic (%)	FISH en recherche (%)
P3	Normal/Équilibré	Alterne	45,4	44,4
	Déséquilibrés	Adjacent 1	28,2	29,0
		Adjacent 2	16,4	17,0
		3:1	8,1	7,9
		4:0	0,4	0,4
		Autres	1,5	1,3
Total			100	100

Tableau 23 : Équipement chromosomique des gamètes après analyse FISH au diagnostic et lors de notre étude chez P3.

L'analyse FISH réalisée au diagnostic et celle réalisée lors de notre étude ne montre aucune différence, notre technique est donc reproductible et nos résultats sont fiables. Il est donc possible de poursuivre l'étude.

En recherche, nous avons trouvé 2,9% de gamètes fragmentés et chromosomiquement normaux/équilibrés et 6,2% de gamètes fragmentés et chromosomiquement déséquilibrés (Tableau 24).

	Équipement chromosomique des gamètes	Intégrité de l'ADN spermatique	
		F (%)	NF(%)
P3	Normal/équilibré	2,9	97,1
	Déséquilibré	6,2	93,8

Tableau 24 : Répartition des gamètes fragmentés et non fragmentés par rapport à ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou déséquilibré chez le patient P3.

L'augmentation du taux de fragmentation au sein des gamètes chromosomiquement déséquilibrés est significative ( $p < 0,001$ ).

Etant donné qu'il y a significativement plus de gamètes avec un ADN fragmenté parmi ceux dont l'équipement chromosomique est déséquilibré, nous avons étudié la répartition des gamètes fragmentés selon les modes de ségrégation méiotique (Tableau 25 et Figure 42).

Equipement chromosomique / Mode de ségrégation méiotique		F (%)	NF (%)	
P3	Normal/Equilibré	Alterne	27,4	45,3
	Déséquilibrés	Adjacent 1	46,2	28,2
		Adjacent 2	16,0	17,0
		3:1	7,6	7,9
		4:0	0,9	0,4
		Autres	1,9	1,2
Total		100	100	

Tableau 25 : Répartition des gamètes fragmentés et non fragmentés selon le mode de ségrégation méiotique chez P3.

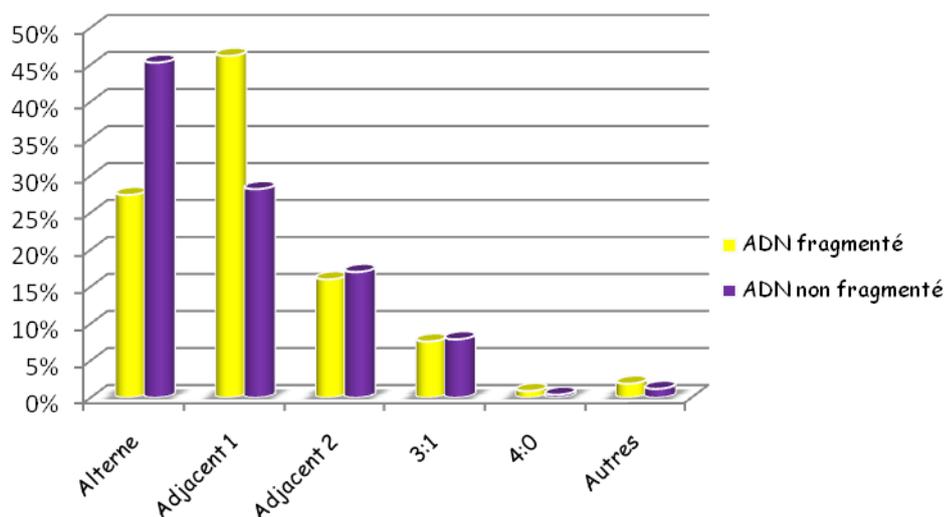


Figure 42 : Histogramme représentant la distribution des gamètes avec un ADN fragmenté et non fragmenté en fonction des modes de ségrégation méiotique chez P3.

Nous observons que le taux de gamètes avec un ADN fragmenté par rapport à celui des non fragmentés n'est pas différent pour les modes adjacent 2 et 3:1. En revanche, il y a significativement plus de gamètes fragmentés que non fragmentés parmi les gamètes issus du mode adjacent 1 (respectivement 46,2% et 28,2%) ( $p=2,66$ ).

Concernant la ségrégation 4:0 et les gamètes "Autres", les effectifs sont trop réduits pour effectuer un test statistique.

La photo 23 montre des spermatozoïdes de P3 après la technique TUNEL (A) et les mêmes gamètes après la technique FISH (B).

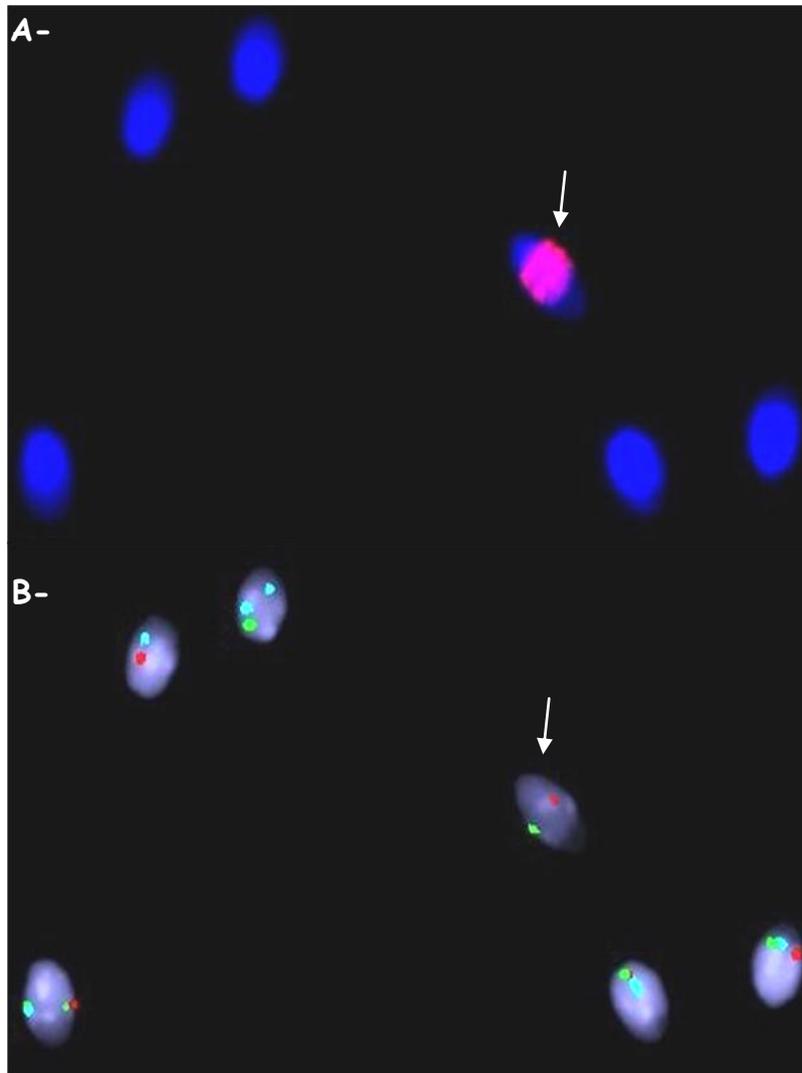


Photo 23 : Photographies de spermatozoïdes du patient P3 après la technique TUNEL (A) et après la FISH (B- sondes CEP7, CEP8 et TelVysion8p, avec respectivement les spectrums aqua, orange et vert). Les flèches indiquent un spermatozoïde avec un ADN fragmenté (A-) et un équipement chromosomique déséquilibré issu du mode 3:1 (B-).

## Discussion

Notre étude a été réalisée sur trois patients, l'un avec un caryotype normal et deux avec une translocation réciproque équilibrée. Chez le patient avec un caryotype normal, nous ne trouvons aucune différence quant à la répartition des gamètes fragmentés que l'équipement chromosomique soit normal ou non. En revanche, chez les deux patients ayant une anomalie de structure, le taux de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est significativement plus élevé parmi les gamètes chromosomiquement déséquilibrés que parmi ceux dont l'équipement chromosomique est normal/équilibré. De plus, chez chaque patient, il y a un mode de ségrégation méiotique particulier pour lequel il y a une différence entre le taux de gamètes fragmentés et non fragmenté (3:1 ou adjacent 1 respectivement pour P2 et P3). Cette constatation n'était pas attendue et est évidemment à confirmer sur un nombre de patients plus important. Toutefois, nous pouvons nous demander si, chez ces deux patients, le matériel chromosomique en excès (disomies) ou en défaut (nullisomies) dans un gamète ne pourraient pas avoir une influence sur la fragmentation de l'ADN.

Comme développé au cours de l'introduction, trois hypothèses principales sont émises pour tenter de comprendre l'origine de la fragmentation de l'ADN spermatique.

Une des hypothèses concerne les SOR qui auraient un impact négatif sur l'intégrité de l'ADN spermatique à cause, par exemple, de la formation de produits comme le 8-oxo-7,8-dihydroxyguanosine. Ce composé serait responsable d'une fragmentation de l'ADN (Lopes *et al.*, 1998) et aurait des effets mutagènes (Menezo *et al.*, 2007). En 2007, il a été montré que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- pouvait induire des événements apoptotiques dans les spermatozoïdes éjaculés comme l'activation de certaines caspases (3 et 9) (Bejarano *et al.*, 2008). En outre, les SOR peuvent avoir un impact plus fort s'il y a des défauts de compaction de l'ADN spermatique, autre hypothèse présentée, avec un pourcentage trop important d'histones par rapport aux protamines. De plus, une étude (Hammoud *et al.*, 2009) très intéressante a montré que le remplacement des histones par les protamines ne se fait pas au hasard. En effet, les régions les plus riches en nucléosomes concerneraient des gènes ou des loci particulièrement impliqués dans le développement

embryonnaire comme des promoteurs, des promoteurs de microRNAs ou encore des gènes homéotiques (HOX) qui jouent un rôle fondamental dans le contrôle génétique du développement embryonnaire. Ainsi, si la compaction est moins importante dans ces zones, afin de permettre une meilleure accessibilité aux régions impliquées dans le développement embryonnaire, nous pouvons nous demander si la fragmentation de l'ADN des gamètes ne pourrait pas concerner majoritairement des loci indispensables au développement et avoir alors un effet délétère sur le développement de l'embryon. Il est également intéressant de noter que la position et l'orientation des chromosomes au sein des gamètes n'est pas non plus aléatoire. Les chromosomes riches en gènes seraient préférentiellement localisés au centre du noyau (Manvelyan *et al.*, 2008).

S'il est démontré que les SOR sont responsables de la fragmentation de l'ADN chez les patients, l'administration d'antioxydants pourrait pallier ce problème. Cette voie thérapeutique est déjà utilisée actuellement. A ce jour, plus de 30 études ont été publiées sur les effets du traitement par antioxydants sur les paramètres spermatiques et le devenir des grossesses (Tremellen, 2008). Un travail, réalisé par Gréco *et al.* (Gréco *et al.*, 2005), sur l'évaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL avant et après un traitement par antioxydants, a montré une amélioration de la qualité de l'ADN chez la plupart des patients. Pour 1/4 des patients, en revanche, ce traitement n'a pas montré d'efficacité. Même si plusieurs équipes s'accordent à montrer un effet globalement positif de la prise d'antioxydants (Tremellen, 2008; Pons-Rejraji *et al.*, 2009), l'équipe de Menezo (Menezo *et al.*, 2007), a montré que la prise d'antioxydants, certes, diminuait significativement le taux de fragmentation mais que, d'un autre côté, cela augmentait la décondensation de la chromatine des spermatozoïdes. Or la structure de la chromatine des gamètes influe sur l'initiation et la régulation de l'activité des gènes paternels lors du développement préimplantatoire.

Menezo *et al.* (Menezo *et al.*, 2007) indiquent que dans leur cohorte de patients, aucune grossesse n'a été obtenue après FIV/ICSI lorsque plus de 28% des gamètes avaient une décondensation de la chromatine. Administrer un traitement antioxydant devrait donc être réalisé dans les cas où il est certain que le stress oxydatif est la cause de la

fragmentation de l'ADN spermatique, le prescrire à des patients dont le stress oxydatif n'a pas de lien avec leur fragmentation n'améliorerait non seulement pas leur taux de fragmentation mais pourrait au contraire avoir un effet délétère.

La dernière des hypothèses avancées pour tenter d'expliquer le mécanisme à l'origine de la fragmentation spermatique est la théorie de l'apoptose abortive. C'est vers cette hypothèse que tendent nos résultats pour les deux patients étudiés porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. En effet, puisqu'il y a significativement plus de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté parmi les gamètes chromosomiquement déséquilibrés, nous pouvons envisager que ces gamètes (entre les stades spermatocytes et spermatides) ont été "étiquetés" comme devant être détruits par apoptose de par un équipement chromosomique anormal. Ces gamètes auraient alors subi un processus apoptotique mais celui-ci n'aurait pas été mené à terme, pour un certain nombre d'entre eux. Ainsi, l'apoptose abortive pourrait contribuer à ce que des spermatozoïdes avec un ADN fragmenté soient retrouvés dans les éjaculats des patients.

Cette hypothèse de l'apoptose abortive est compatible avec les résultats des travaux réalisés par Brugnon *et al.* (Brugnon *et al.*, 2006). En effet, en plus de l'étude de la fragmentation de l'ADN par TUNEL, la présence de phosphatidylsérine (PS) à la surface membranaire des gamètes a été évaluée par liaison à l'annexine V. Le taux de gamètes exposant la PS à leur surface est plus important dans le groupe de patients porteurs d'une translocation que dans le groupe contrôle. Ceci suggère un plus grand nombre de spermatozoïdes apoptotiques chez ces patients. Toutefois, ils n'ont pas trouvé de corrélation entre les résultats de TUNEL et le test de l'annexine V. Cela peut s'expliquer par le fait que l'expression membranaire de la PS et la fragmentation de l'ADN sont deux évènements survenant à des stades différents du processus apoptotique. L'externalisation de la PS survient précocement au cours de l'apoptose contrairement à la fragmentation de l'ADN (Levy & Seifer-Akkin, 2001). De plus, la technique TUNEL met en évidence des cassures de l'ADN mais pas uniquement celles d'origine apoptotique. Enfin, une étude récente de Brugnon *et al.* suggèrent que l'activation du processus apoptotique (caspases activées) se produirait dans les

testicules lors de la spermatogenèse et que les spermatozoïdes épидидymaires ne pourraient plus avoir de déclenchement apoptotique (Brugnon *et al.*, 2008). Ce rôle probablement clé des caspases (caspase 3) dans le processus apoptotique des cellules germinales au niveau des testicules a également été souligné dans une publication de Bozec *et al.* (Bozec *et al.*, 2008).

Il est cependant nécessaire de rester prudent quant à l'interprétation des caractéristiques mises en évidence dans les spermatozoïdes éjaculés. Les traits apoptotiques que nous trouvons dans les spermatozoïdes de façon isolée ne signe pas nécessairement une mort des gamètes par apoptose. L'externalisation de la phosphatidylsérine accompagne l'étape de capacitation des spermatozoïdes ; les SOR ont des fonctions autres que la mort cellulaire ; les caspases sont également impliquées dans les processus de différenciation et de maturation cellulaire ; la fragmentation de l'ADN pourrait être le témoin d'une maturation incomplète durant la spermiogenèse ; le récepteur de mort Fas ne transmet pas uniquement des signaux apoptotiques. De plus, il a été montré que Fas ne serait en fait pas exprimé à la surface des spermatozoïdes. L'équipe de Perticarari suggère que le récepteur Fas aurait probablement été identifié à la surface de leucocytes plus qu'à la surface de gamètes (Perticarari *et al.*, 2008).

Quelle que soit l'origine de la fragmentation de l'ADN, au-delà d'un certain seuil, les mécanismes de réparation qu'offre l'ovocyte pourraient être dépassés et les anomalies persistantes entraveraient la poursuite du développement embryonnaire (fivfrance)<sup>11</sup>.

La fragmentation de l'ADN a un impact négatif sur le développement préimplantatoire de l'embryon pour atteindre le stade **blastocyste** (Meseguer *et al.*, 2008), tout comme sur le taux d'implantation et de grossesses cliniques (Frydman *et al.*, 2008). Pour certains, le taux de fécondation obtenu après ICSI est corrélé négativement au taux de fragmentation (Tavalaee *et al.*, 2009). Le taux de gamètes avec ADN spermatique fragmenté serait également un indicateur pronostique des fausses couches après AMP (Benchaib *et al.*, 2007; Zini *et al.*, 2008).

<sup>11</sup> : [http://www.fivfrance.com/page\\_spermio\\_news.html](http://www.fivfrance.com/page_spermio_news.html)

Toutefois, tous les spermatozoïdes fragmentés n'ont pas un déséquilibre chromosomique. En dehors du fait que les spermatozoïdes classés comme normaux en FISH le sont uniquement pour les chromosomes étudiés et qu'il est donc possible que certains d'entre eux aient une aneuploïdie pour d'autres chromosomes, il apparaît évident que les déséquilibres chromosomiques ne sont pas la seule cause de la fragmentation spermatique.

Il est indispensable de mener cette étude sur d'autres cas pour voir si nous aboutissons aux mêmes résultats. Concernant le patient avec un caryotype normal, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative quant à la répartition des gamètes fragmentés selon l'équipement chromosomique. La question se pose de savoir si cette voie d'apoptose abortive existe ou non lorsque le caryotype lymphocytaire est normal. Il serait nécessaire d'étudier d'autres patients présentant un caryotype lymphocytaire normal ainsi que des porteurs de translocations réciproques équilibrées mais aussi des patients porteurs de translocations robertsoniennes et d'inversion afin de savoir si les mêmes résultats sont obtenus indépendamment du type d'anomalie de structure présent.

Ces résultats originaux indiquant un lien entre le taux de fragmentation et l'équipement chromosomique des gamètes sont très intéressants et très encourageants.

La compréhension des origines de la fragmentation a un intérêt important au niveau fondamental pour comprendre les mécanismes mais cela peut également avoir un intérêt au niveau clinique.

# CONCLUSIONS PERSPECTIVES



Les travaux qui ont été menés au cours de ces trois années de thèse nous ont permis de mettre au point l'utilisation de BACs contigus afin de réaliser des analyses de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes quelle que soit l'anomalie constitutionnelle présente chez les patients, indépendamment de la disponibilité ou non de sondes commerciales. Nous avons mis au point, au niveau du laboratoire, l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL, la recherche de microdélétions de la région AZF sur le chromosome Y ainsi que la recherche de mutations sur le gène *AURKc*. Ces techniques ont été validées et sont fonctionnelles.

En dehors des nouveaux outils rendus disponibles, nous avons étudié la ségrégation méiotique et la fragmentation de l'ADN spermatique dans les gamètes d'hommes infertiles porteurs ou non d'anomalies chromosomiques constitutionnelles.

L'étude de la ségrégation méiotique est informative quant aux risques encourus par la descendance d'être porteuse d'un déséquilibre chromosomique.

Ainsi chez des patients sans anomalie chromosomique mais présentant une tératozoospermie sévère, le taux de spermatozoïdes aneuploïdes peut être normal ou légèrement augmenté ou au contraire la quasi-totalité des spermatozoïdes peut s'avérer déséquilibrée tels les gamètes macrocéphales et multiflagellés.

Les patients ayant ce type de gamètes ne peuvent donc malheureusement pas être pris en charge en AMP sans avoir recours à un sperme de donneur ou être orientés vers l'adoption.

Les études de la ségrégation méiotique réalisées chez les patients dont le caryotype lymphocytaire est anormal nous ont permis de mettre en évidence des variations importantes (42,10% à 65,60%) des taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés chez les patients porteurs de translocation réciproque équilibrée, selon les chromosomes impliqués dans le remaniement, la taille des bras, la localisation du centromère et des points de cassure. Au même titre que les translocations réciproques

équilibrées impliquant deux autosomes, celles impliquant un autosome et un gonosome s'accompagnent de variations importantes des taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés (45,64% à 62,05%). La simple implication du chromosome X dans des translocations réciproques équilibrées chez deux patients différents n'entraîne pas un même taux de spermatozoïdes déséquilibrés. Les points de cassure et les chromosomes impliqués dans le remaniement ont un rôle néfaste dans la mécanique méiotique, tout comme pour les translocations réciproques impliquant deux autosomes. Une analyse FISH systématique de la ségrégation méiotique dans les gamètes est donc recommandée chez ces patients.

Dans notre étude, chez les patients porteurs de translocation robertsonienne, le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés est plus faible que chez ceux présentant une translocation réciproque, il se situe entre 8,78% et 21,62%. Ces données sont compatibles avec la prépondérance du mode de ségrégation alterne de ces translocations. Nous avons étudié des translocations robertsoniennes rob(13;14) et rob(14;21) qui sont les plus fréquentes (respectivement 73% et 10% des translocations robertsoniennes) (Therman *et al.*, 1989; Anahory *et al.*, 2005). Les translocations robertsoniennes (13;22) sont très rares, leur fréquence est estimée à 1% des translocations robertsoniennes, les translocations robertsoniennes (14;22) et (13;21) ont une fréquence estimée respectivement à 1,2% et 2% (Therman *et al.*, 1989). Les études de ségrégation méiotique dans les gamètes de patients porteurs de ce type de translocations robertsoniennes indiquent que le mode alterne est également le mode le plus fréquent (Anahory *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). De plus, selon la localisation des points de cassure, le chromosome dérivé peut être monocentrique ou dicentrique. S'il est dicentrique, un des deux centromères est généralement inactivé. De telles différences de points de cassure pourraient avoir un impact sur la production de gamètes chromosomiquement déséquilibrés (Moradkhani *et al.*, 2006).

Nous avons étudié la ségrégation méiotique des gamètes d'un patient porteur d'une translocation non réciproque à partir de deux éjaculats. Les chromosomes impliqués sont

les 14 et 18. Un dérivé 18 s'est formé avec les bras longs du 14, le centromère et le bras court du chromosome 14 sont perdus, résultant en un caryotype à 45 chromosomes. De faibles taux de déséquilibre chromosomique des spermatozoïdes sont observés dans les deux éjaculats (6,95% et 9,08%). Ces résultats peuvent s'expliquer par une configuration en *cis*, adoptée par les chromosomes 14, der(14) et der(18), qui favorise le mode de ségrégation alterne. De plus, ces taux ne sont pas significativement différents entre les deux éjaculats, il n'existe donc pas de variation intraindividuelle, arguant pour le caractère non aléatoire de la mécanique méiotique. Très peu d'études ont été réalisées sur l'existence ou non de variations intraindividuelles de l'équipement chromosomique des gamètes entre différents éjaculats. Une étude des variations intraindividuelles a été rapportée en 2004 chez un homme porteur d'une translocation t(9;22) (Morel *et al.*, 2004c) et une autre chez 3 patients infertiles présentant un caryotype normal mais des paramètres spermatiques anormaux (Amiel *et al.*, 2002). Nos résultats et ces deux études sont en accord pour indiquer qu'il n'y a pas de variations intraindividuelles. Si de telles variations étaient mises en évidence, il serait alors possible de congeler chaque éjaculat provenant d'un même patient et d'utiliser, pour l'ICSI, celui qui indique le taux de déséquilibre chromosomique le plus bas. Malheureusement, du fait de l'absence de variations entre deux éjaculats, il n'est pas possible d'envisager une telle stratégie.

D'autre part, bien que les deux chromosomes impliqués dans l'anomalie de ce patient 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) ne soient pas des acrocentriques, la mécanique méiotique chez ce patient se comporte donc comme celle d'une translocation robertsonienne.

Les études de la ségrégation méiotique menées dans les gamètes de patients porteurs d'une inversion péricentrique ont montré une variabilité importante du taux de gamètes recombinants (0 à 37,71%). Ce taux varie selon les chromosomes impliqués et les points de cassure. Il est essentiellement dépendant de la taille du segment inversé par rapport à celle du chromosome entier. Ce n'est que lorsque le segment inversé représente au

moins 30% du chromosome entier que des gamètes recombinants sont produits. Plusieurs patients porteurs d'une inversion péricentrique du même chromosome n'ont pas le même taux de gamètes recombinants. Or, les seules différences entre ces inversions péricentriques sont les points de cassure, impliquant donc une taille de segment inversé différente d'un patient à un autre.

Enfin, nous avons étudié la ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une anomalie de nombre du chromosome 18 en mosaïque, ce patient a une oligotératozoospermie. Même s'il est possible que la mécanique méiotique soit perturbée par la présence de l'anomalie du caryotype, les taux d'aneuploïdies gamétiques trouvés sont également ceux qui existent chez des patients avec des paramètres spermatiques médiocres malgré un caryotype lymphocytaire normal. Ainsi la présence d'une trisomie en mosaïque chez ce patient n'implique pas nécessairement une augmentation d'aneuploïdie dans ses gamètes. Il est possible que la mosaïque soit très faible voire inexistante au niveau testiculaire.

Les analyses de la ségrégation méiotique par FISH sont très importantes puisqu'elles permettent de comprendre la mécanique méiotique, celle-ci n'est pas un phénomène aléatoire. C'est en comprenant cette mécanique qu'il nous a été possible de préjuger des événements qui se sont produits au niveau d'un spermatozoïde d'un homme porteur d'un CCR, à partir d'une anomalie constitutionnelle présente chez son fœtus (Basinko *et al.*, 2009). De plus, ces analyses permettent de personnaliser le conseil génétique et d'orienter les couples vers la meilleure solution pour tenter de remédier à leur difficulté de conception. Même si tous les couples porteurs d'une anomalie chromosomique de structure peuvent automatiquement bénéficier du diagnostic prénatal, si l'anomalie de structure est une inversion et qu'aucun gamète recombinant n'est trouvé en FISH, le couple pourra alors refuser sereinement de pratiquer cette analyse. En fonction de l'histoire d'infertilité des couples et des analyses de la ségrégation méiotique des gamètes, les couples peuvent alors bénéficier ou non du diagnostic préimplantatoire ou avoir recours à un donneur de sperme ou enfin à l'adoption.

D'autre part, nos études réalisées sur la fragmentation de l'ADN spermatique ont montré que les gamètes des patients ayant une sévère tératozoospermie ont un ADN plus fragmenté que ceux d'hommes fertiles. Ainsi, même si l'équipement chromosomique peut s'avérer normal ou avec de légères augmentations des taux d'aneuploïdies, il nous paraît important de réaliser une analyse systématique de la fragmentation de l'ADN chez les patients qui ont une sévère tératozoospermie. Des échecs répétés d'AMP pourraient alors être liés à une mauvaise intégrité de l'ADN, défaut qui pourrait conduire les patients à avoir recours à l'utilisation de sperme de donneur par exemple.

Notre étude des taux de fragmentation dans les spermatozoïdes de patients porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle avec un spermogramme normal ou non, révèle un taux de fragmentation significativement augmenté (1% à 27%) par rapport au groupe témoin (0 à 3,6%). Il n'est pas mis en évidence de différence selon le type de remaniement (translocation réciproque, translocation robertsonienne ou inversion péricentrique).

Chez les patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, notre étude n'a pas révélé de différence du taux de fragmentation que les patients aient des paramètres spermatiques normaux ou non. C'est donc, avant tout, la présence de l'anomalie chromosomique de structure qui paraît être liée au taux de fragmentation élevé. Même si ce constat ne permet pas de définir une origine de la fragmentation, il suggère l'implication de l'apoptose abortive.

Les taux de fragmentation de l'ADN spermatique observés chez les patients porteurs d'anomalie chromosomique de structure pourraient être une autre voie contribuant à expliquer leurs troubles de la reproduction.

Les études de la ségrégation méiotique et de la fragmentation de l'ADN sont complémentaires pour évaluer les chances de succès des AMP. Le patient 46,XY,inv(2)(p11q13) avait un taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés de

0,33% et un taux de fragmentation de 10,90%. L'analyse par FISH est, ici, peu explicative quant à l'origine de l'infertilité masculine, *a contrario* de l'analyse par TUNEL. A l'inverse, le patient 46,XY,t(1;13)(q41;q22) avait un taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés de 58,40% et un taux de fragmentation de 1%. Dans cet exemple, c'est l'étude de la ségrégation méiotique qui permet de mieux appréhender l'infertilité du patient (Perrin *et al.*, 2008).

De plus, puisque la présence d'une anomalie chromosomique de structure entraîne notamment la formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés, nous pouvons imaginer qu'une " destruction " programmée pourrait être mise en place afin d'évincer ces gamètes anormaux. Nous avons donc étudié l'éventuelle relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et la proportion de gamètes avec un déséquilibre chromosomique. Nos résultats ne nous ont pas permis de trouver une corrélation entre ces deux paramètres. Trois hypothèses peuvent être émises pour tenter de comprendre ces résultats. Premièrement, l'apoptose abortive n'existe pas, deuxièmement, un certain contingent de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés échappe aux étapes de contrôle ou reçoit l'ordre de subir une apoptose à un moment où sa mise en place n'est plus possible et troisièmement, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique étant faible au sein du grand nombre de gamètes analysés (chromosomiquement normaux ou non), il n'est pas possible de trouver une corrélation au sein de l'éjaculat total.

Pour étayer cette dernière hypothèse, nous avons décidé de réaliser une étude de la fragmentation de l'ADN des gamètes chromosomiquement normaux/équilibrés d'une part et gamètes chromosomiquement déséquilibrés d'autre part. A ce jour, ces travaux ont été réalisés sur deux patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée. En effet, ces analyses sont fastidieuses. Le temps nécessaire afin d'étudier un seul patient en TUNEL puis en FISH après avoir identifié et mémorisé, à l'aide d'un logiciel, l'état fragmenté ou non de l'ADN de 2 500 gamètes est long.

Chez les deux patients étudiés, nous avons montré, pour la première fois, que les gamètes avec un ADN fragmenté sont majoritairement ceux dont l'équipement

chromosomique est déséquilibré. Même s'il est évident que nous ne pouvons pas généraliser ces résultats à tout patient porteur d'une anomalie chromosomique de structure et qu'ils doivent être confirmés sur davantage de patients, nos premiers résultats sont encourageants et nous permettront peut-être de contribuer à la compréhension de l'origine de la fragmentation.

Au-delà des travaux effectués au cours de ces trois années, les études de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes infertiles seront poursuivies pour aider à la compréhension de la mécanique méiotique. Il en est de même pour les études de la fragmentation de l'ADN spermatique.

L'étude de la ségrégation méiotique est laborieuse, le temps d'analyse au microscope est long. Nous avons un logiciel (Metacyte) qui, en théorie, permet de comptabiliser le nombre de signaux présents dans un gamète. Cependant, nous ne l'utilisons pas car les résultats divergent trop par rapport à une lecture manuelle. De ce fait et de par les compétences qui existent sur le site, nous prévoyons d'établir une collaboration avec l'équipe du LaTIM - INSERM U650 afin de mettre en place un projet d'automatisation du comptage des sondes dans les têtes de spermatozoïdes. Pour réaliser ce projet, nous avons besoin de déterminer le nombre de spots rouges, bleus et verts présents dans chaque gamète identifié grâce au DAPI.

La difficulté du comptage provient notamment du fait qu'avec une seule photo (plan x, y), certains spots peuvent être mal résolus et considérés comme du bruit de fond (étalement du signal, faible contraste). Lors d'une analyse manuelle, il est donc nécessaire de changer la focale du microscope (suivant z) afin de mettre en évidence tous les spots au sein de la tête de chaque spermatozoïde. La génération de plusieurs photos à différentes focalisations (z) permettrait de disposer de toutes les données. Il suffirait ensuite de les traiter et les fusionner pour obtenir un comptage automatique du nombre de spots. Les données nécessaires en entrée sont 4 piles d'images (une pour

chaque canal DAPI, Rouge, Aqua, Vert). Des photos seraient générées avec une discrétisation des focalisations suffisante ( $1/40^{\text{ème}}$  de  $\mu\text{m}$  sur  $2 \mu\text{m}$ ) pour produire une pile d'images contenant toute l'information requise au comptage (épaisseur d'une tête de spermatozoïde estimée aux environs de  $2 \mu\text{m}$ ) (Figure 43).

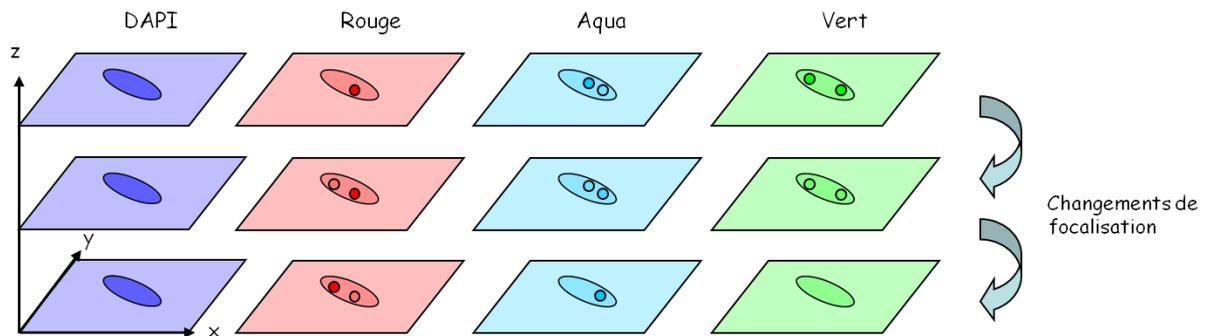


Figure 43 : Principe de la récupération des données nécessaires en entrée pour automatiser le comptage des spots dans les gamètes.

L'approche envisagée est illustrée par la figure 44.

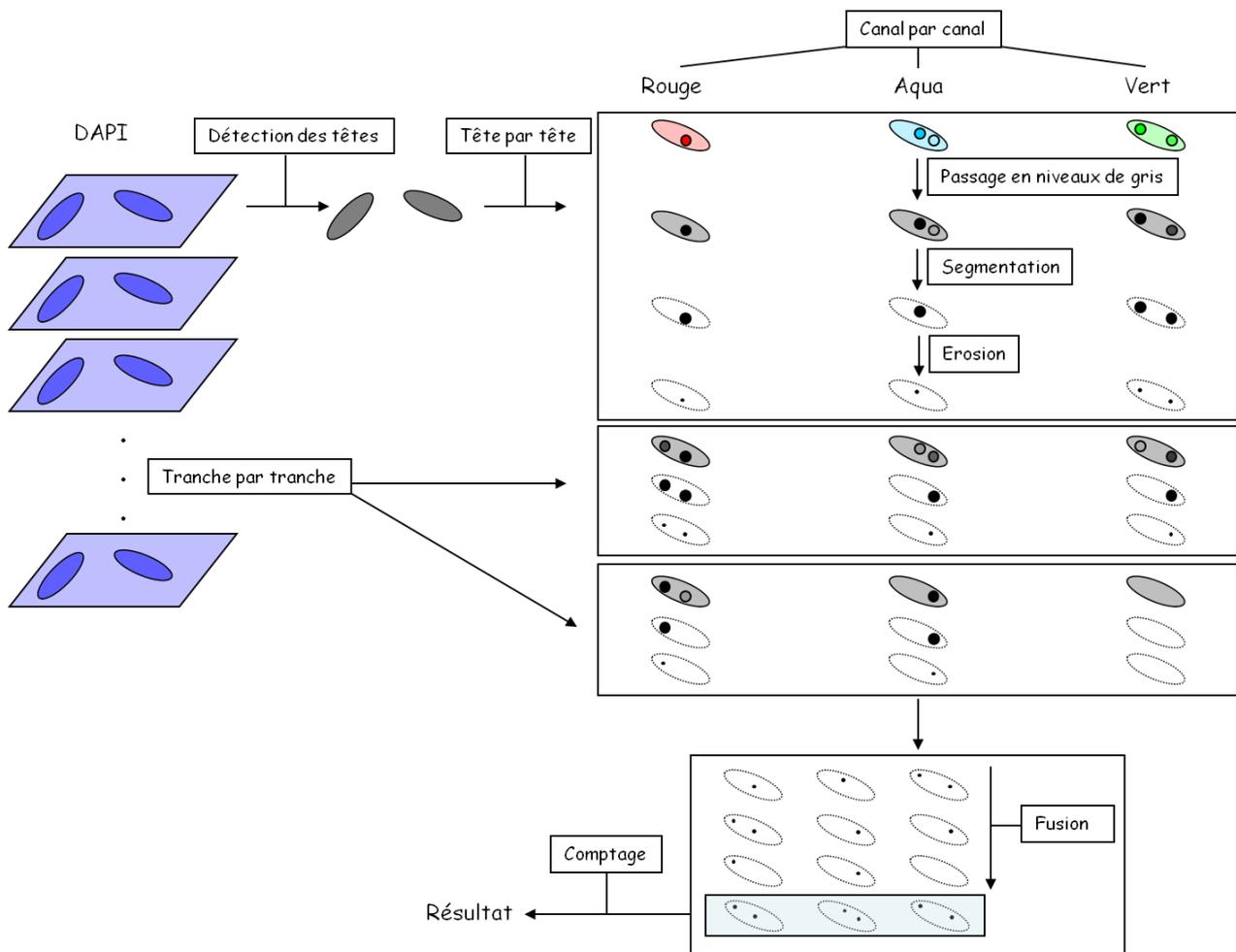


Figure 44 : Approche envisagée d'automatisation du comptage de spots appliquée sur chaque photo de gamètes.

La première étape consiste à repérer et isoler les têtes de chaque spermatozoïde grâce au canal DAPI par une segmentation (définition de régions dans une image) simple des images. L'utilisation d'informations *a priori* sur la forme de la tête et l'intensité attendue est souhaitable afin d'éviter d'extraire des tâches ou des cellules autres que des gamètes.

Dans un deuxième temps, il est nécessaire d'effectuer un traitement sur chaque tête de spermatozoïde (segmentation des spots). Chaque canal (rouge, aqua et vert) est traité séparément. Pour chaque canal, chaque image correspondant à une focalisation du microscope est d'abord passée en niveau de gris pour être segmenté par une approche non encore définie. Afin de limiter les faux positifs, de nombreuses informations peuvent être utilisées comme la taille, l'intensité, la position et la forme des spots. Une

fois les spots segmentés, cette segmentation est érodée avec un outil de morphologie mathématique à définir.

Il est ensuite nécessaire de fusionner toutes les tranches de focalisations différentes, l'image fusionnée contiendra les positions de tous les spots détectés à différentes focalisations.

Enfin, la dernière étape consiste à compter les points de l'image fusionnée. En effectuant le même traitement sur chaque tête de spermatozoïde et sur chaque photo, il doit être possible d'obtenir les statistiques de comptage pour toute une lame.

D'autre part, les mises au point de recherche de microdélétions du chromosome Y et de mutations de *AURKc* étant fonctionnelles, elles vont nous permettre de développer des axes de diagnostic et de recherche jusque là inexistantes au sein du laboratoire. Ces outils contribuent à un élargissement des savoir-faire à notre disposition.

De plus, nous voulons réaliser une étude multi-variée afin de corréliser les résultats issus de la FISH et du TUNEL (réalisés sur les patients cités dans la partie Travaux réalisés) aux résultats après tentatives d'ICSI. Le but est de déterminer la fréquence de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés ou fragmentés à partir de laquelle les chances de succès d'ICSI sont minimales ou nulles.

Afin de comparer les résultats de l'ICSI à partir de spermatozoïdes d'hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure en fonction de la fréquence de spermatozoïdes déséquilibrés ou fragmentés, les variables utilisées seront le nombre d'ovocytes fécondés ou de zygotes obtenus, la qualité des embryons, le nombre d'embryons transférés, le taux d'implantation embryonnaire, le nombre de grossesses biologiques, le nombre de grossesses cliniques, le nombre de fausses couches (avec caryotypage éventuel des produits de fausses couches), le nombre d'embryons congelés et le nombre de fœtus chromosomiquement normaux ou déséquilibrés (évaluation lors du diagnostic prénatal). Une analyse statistique sera réalisée à l'aide d'une régression logistique avec le logiciel SPSS.

Les intérêts de cette approche sont de permettre un conseil génétique et un calcul des chances de réussite plus précis. Selon les résultats, il pourra alors être discuté avec les couples du recours, ou non, au diagnostic préimplantatoire ou encore le recours à des spermatozoïdes de donneur voire à l'adoption.

Il est très important pour les couples demandant une ICSI de connaître leurs chances d'avoir un enfant, d'autant plus que la démarche est médicalement complexe et très coûteuse sur le plan psychologique et physique.

Nous souhaiterions également développer une étude des profils d'expression par puce à partir de l'ARN extrait de gamètes de patients pour lesquels l'infertilité est idiopathique. Certes le spermatozoïde est une cellule quiescente d'un point de vue de la traduction mais plusieurs ARNm fonctionnels sont délivrés dans l'ovocyte après fécondation. Ces ARNm sont synthétisés précocement lors de la spermatogenèse et sont ensuite conservés jusqu'à la fécondation (Kramer & Krawetz, 1997; Wykes *et al.*, 1997). Le transcriptome (ensemble des ARNm issus de l'expression d'une partie du génome) d'hommes fertiles a été décrit (Ostermeier *et al.*, 2002). Des travaux réalisés en 2009 (Garrido *et al.*, 2009) rapportent une expression différentielle de certains gènes chez des hommes infertiles au spermogramme normal et dans un groupe contrôle. La plupart de ces gènes sont sous-exprimés dans le groupe de patients infertiles, l'infertilité serait donc peut-être due au manque de certains facteurs impliqués dans les fonctions des spermatozoïdes. Cette étude est unique à ce jour, il est donc nécessaire d'étoffer nos connaissances dans ce domaine. Définir un profil d'expression des gènes spécifique aux spermatozoïdes d'hommes présentant des troubles de la spermatogenèse permettrait de disposer d'un outil objectif pour diagnostiquer des anomalies. L'identification de certains facteurs géniques prédisposant aux non disjonctions permettrait d'obtenir un nouvel outil diagnostique pour évaluer le risque de transmission éventuelle de cette pathologie à leur descendance. De plus, identifier certaines causes d'infertilité masculines pourrait contribuer à adapter une thérapeutique ou du moins adopter la meilleure stratégie pour y remédier.

Une plate-forme de CGH-array a été mise en place en 2007-2008 avec la pratique en routine des techniques d'analyse du génome mais aussi des profils d'expression au sein de notre unité Inserm U613. Ainsi, l'application de cette nouvelle technologie dans le domaine de la reproduction devrait se faire relativement aisément.

Pour compléter l'analyse du transcriptome chez ces patients ayant une infertilité idiopathique, il serait intéressant de se pencher également sur le protéome. Il serait possible de comparer les profils d'expression protéique des spermatozoïdes d'un groupe de patients et d'un groupe de témoins. Cette étude pourrait être réalisée par western-blot 2D (migration en fonction du point isoélectrique puis selon la taille des protéines). Les protéines d'intérêt pourraient ensuite être extraites du gel afin de les analyser par un spectromètre de masse de type MALDI-TOF-TOF (MALDI : matrix-assisted laser desorption/ionisation) (TOF : time-of-flight mass spectrometry) dans le but de les identifier.

Enfin, un dernier objectif serait d'élargir nos compétences en tentant de réaliser des analyses de l'équipement chromosomique en prélevant les globules polaires des ovocytes. Si l'un ou l'autre des deux globules polaires est analysé, il est ainsi possible de connaître l'équipement chromosomique après la première ou la deuxième division méiotique. L'équipement chromosomique du premier globule polaire ( $n$  chromosomes  $2n$  ADN) ou du deuxième globule polaire ( $n$  chromosomes  $n$  ADN) est le complément de celui de l'ovocyte. Il est alors possible de sélectionner les embryons normaux ou équilibrés pour les chromosomes analysés et de réaliser une ICSI uniquement sur ces ovocytes. Cette biopsie peut être réalisée en faisant un trou dans la zone pellucide de façon chimique, mécanique ou par laser (Dawson *et al.*, 2006). Ce diagnostic préconceptionnel (DPC) peut être utilisé chez des patientes ayant un âge maternel avancé (Naether *et al.*, 2008), ou présentant certaines pathologies monogéniques ou encore porteuses d'anomalie chromosomique de structure (Montag *et al.*, 2009). Une étude récente chez des femmes porteuses de translocations robertsoniennes suggère que le DPC pourrait être une alternative au DPI (Molina Gomes *et al.*, 2009). D'autre part, pour une même patiente, le

taux d'aneuploïdie observé dans les globules polaires obtenus après deux cycles successifs de stimulation ovarienne paraît être stable. En confirmant ces résultats sur une plus grande cohorte, le DPC pourrait être un outil supplémentaire pour préciser le conseil génétique (Vialard *et al.*, 2008). Des échecs répétés d'AMP chez des couples sans raison apparente pourraient peut-être s'expliquer par des déséquilibres chromosomiques fréquents des ovocytes avec par exemple une séparation prématurée des chromatides-sœurs plus fréquente chez certaines femmes (Vialard & Pellestor, 2008).

Beaucoup de zones d'ombre subsistent dans le domaine de la biologie de la reproduction ne permettant pas de pallier toutes les difficultés de reproduction. Il est indispensable de poursuivre les recherches dans le but ultime d'offrir des solutions efficaces aux couples concernés.



# ANNEXES



Annexe 1 : Caryotypes et cytogénétique moléculaire sur sang et sur spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

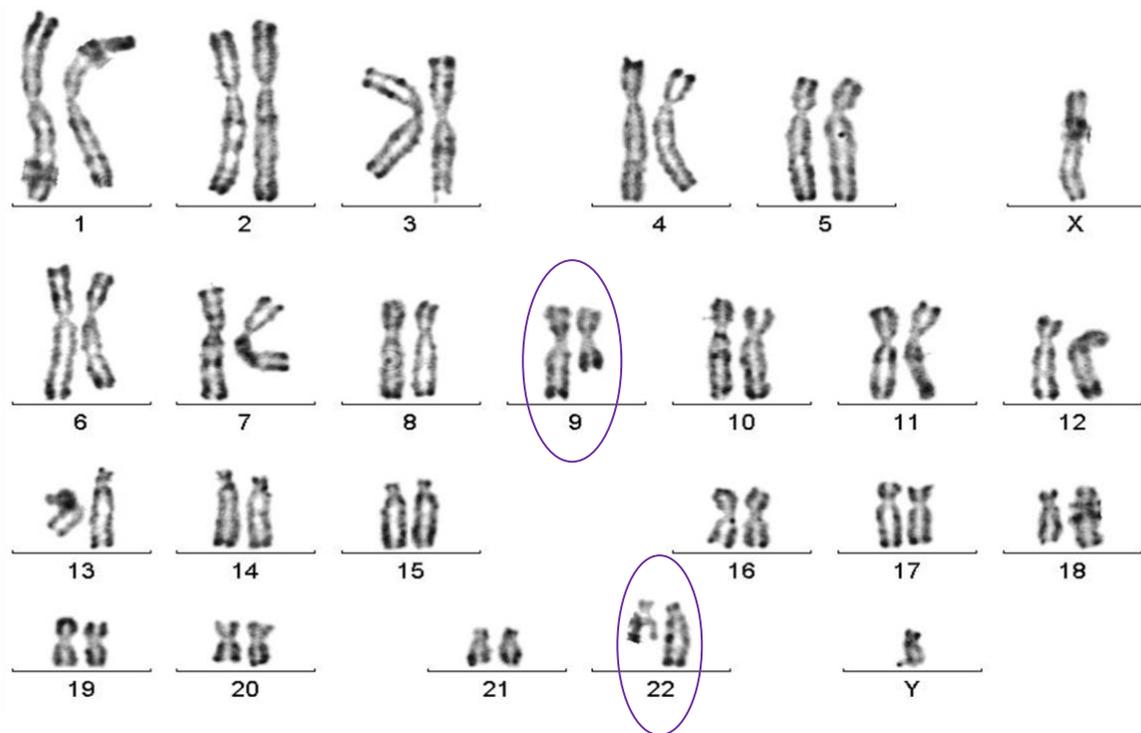


Figure 45 : Caryotype d'un patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée,  $46,XY,t(9;22)(q21;q11.2)$ .

Lors de l'étude de la ségrégation méiotique chez un homme porteur d'une translocation réciproque équilibrée, trois sondes doivent être utilisées. Nous devons associer une sonde spécifique du centromère d'un chromosome normal impliqué dans le quadrivalent, une sonde spécifique du centromère d'un chromosome dérivé impliqué dans le quadrivalent ainsi qu'une sonde spécifique de la région de ce chromosome qui est échangée. L'hybridation correcte des sondes est vérifiée sur métaphases (Photo 24 A-) avant d'être réalisée sur spermatozoïdes (Photo 24 B-).

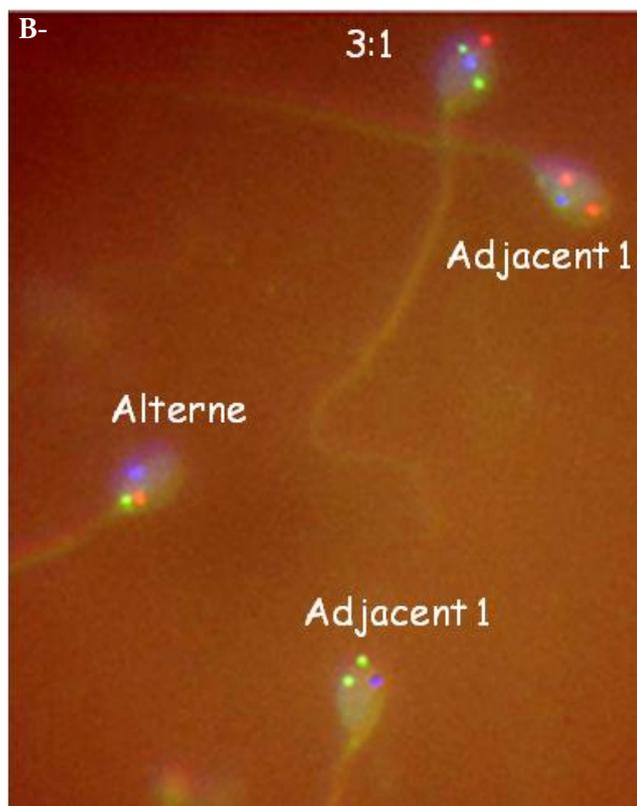
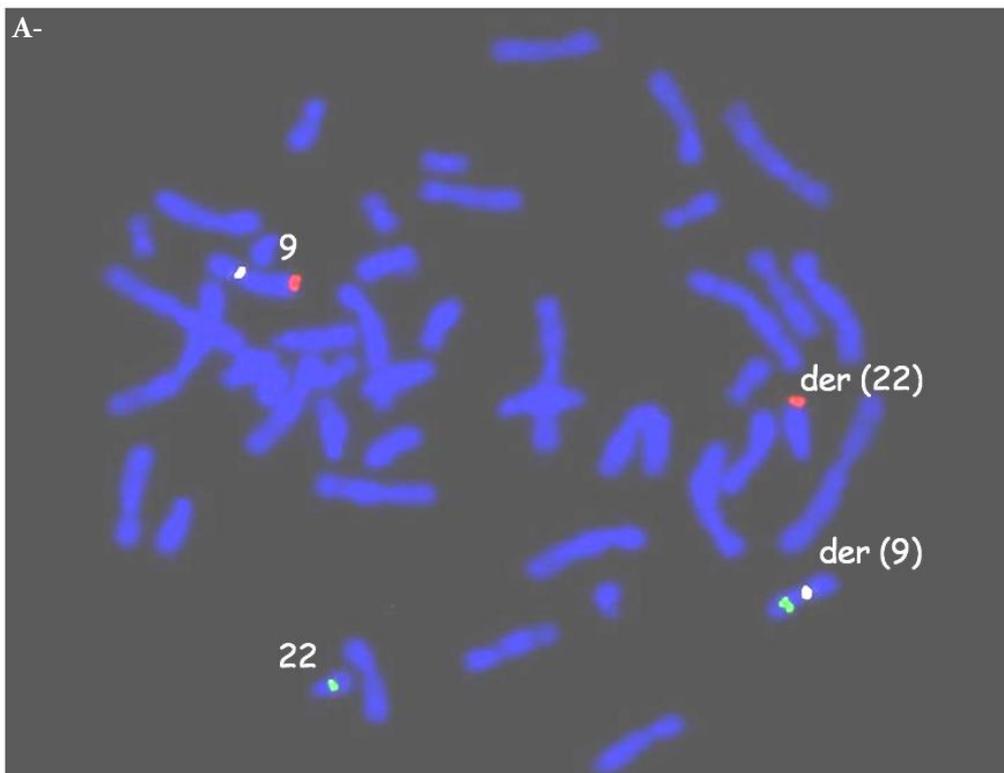


Photo 24 : Métaphase (A-) et spermatozoïdes (B-) après hybridation avec une CEP 9 (spectrum aqua), TelVysion 9q (spectrum orange) et une LSI 22q11.2 (spectrum vert).

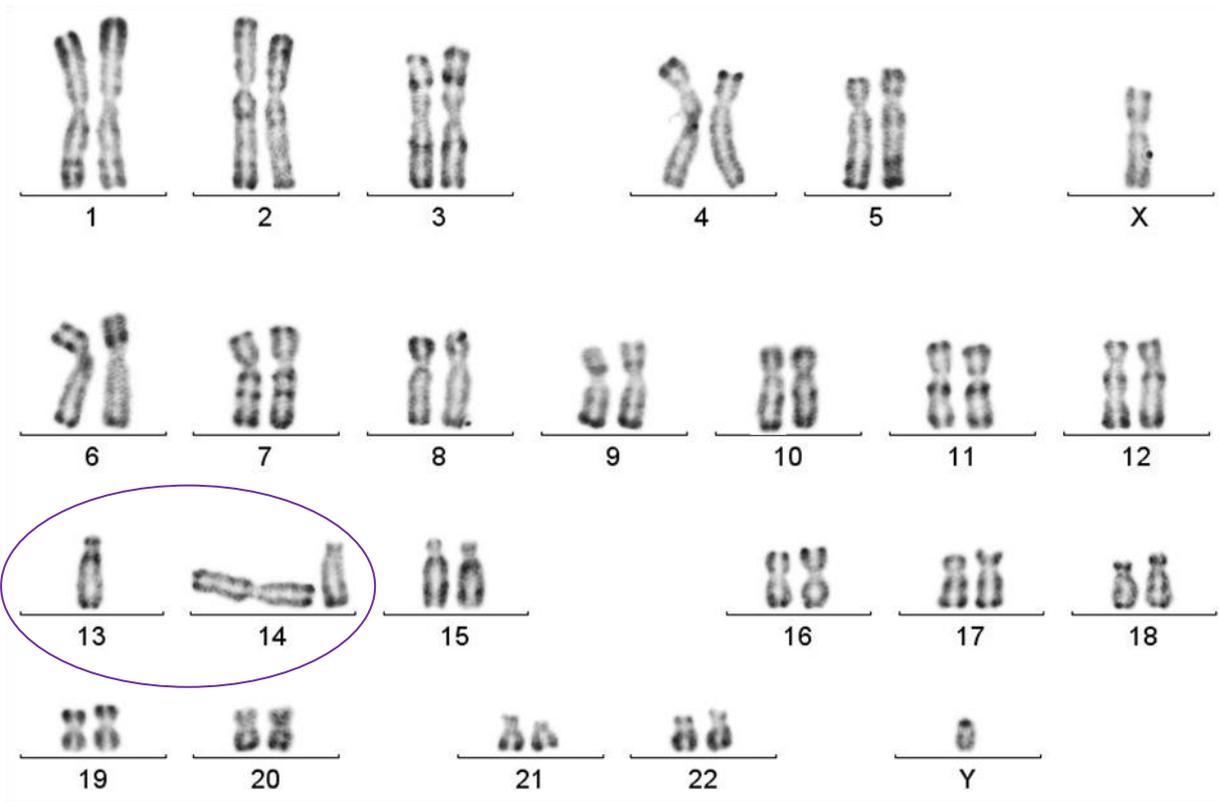


Figure 46 : Caryotype d'un patient porteur d'une translocation robertsonienne, 45,XY,rob(13;14)(q10;q10).

Lors de l'étude de la ségrégation méiotique par FISH chez un patient porteur d'une translocation robertsonienne, il suffit d'utiliser deux sondes différentes couplées à deux fluorochromes différents, chacune spécifique de chaque chromosome acrocentrique impliqué dans l'anomalie. L'hybridation correcte des sondes est vérifiée sur métaphases (Photo 25 A-) avant d'être réalisée sur spermatozoïdes (Photo 25 B-).

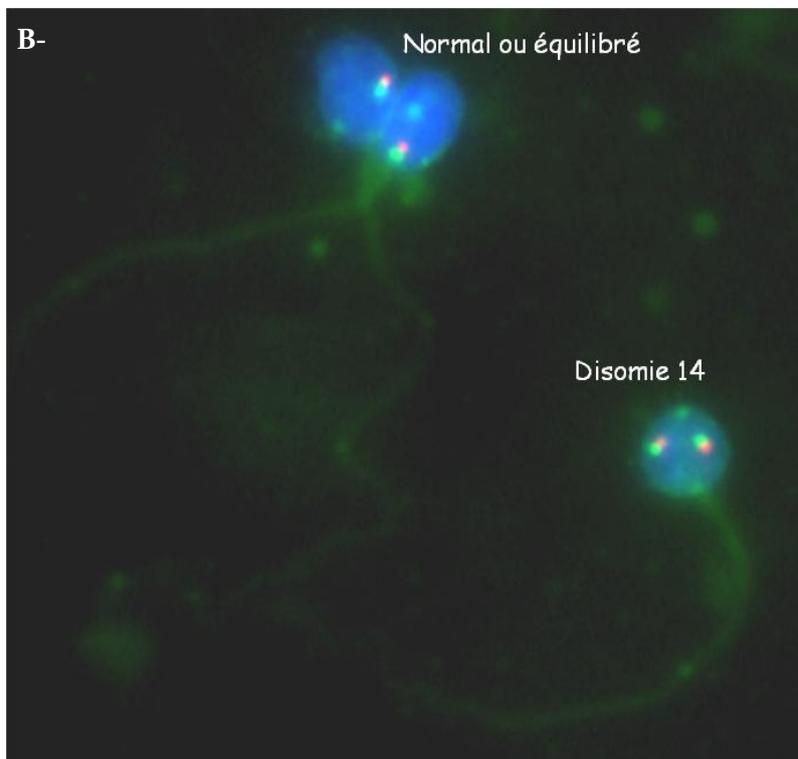
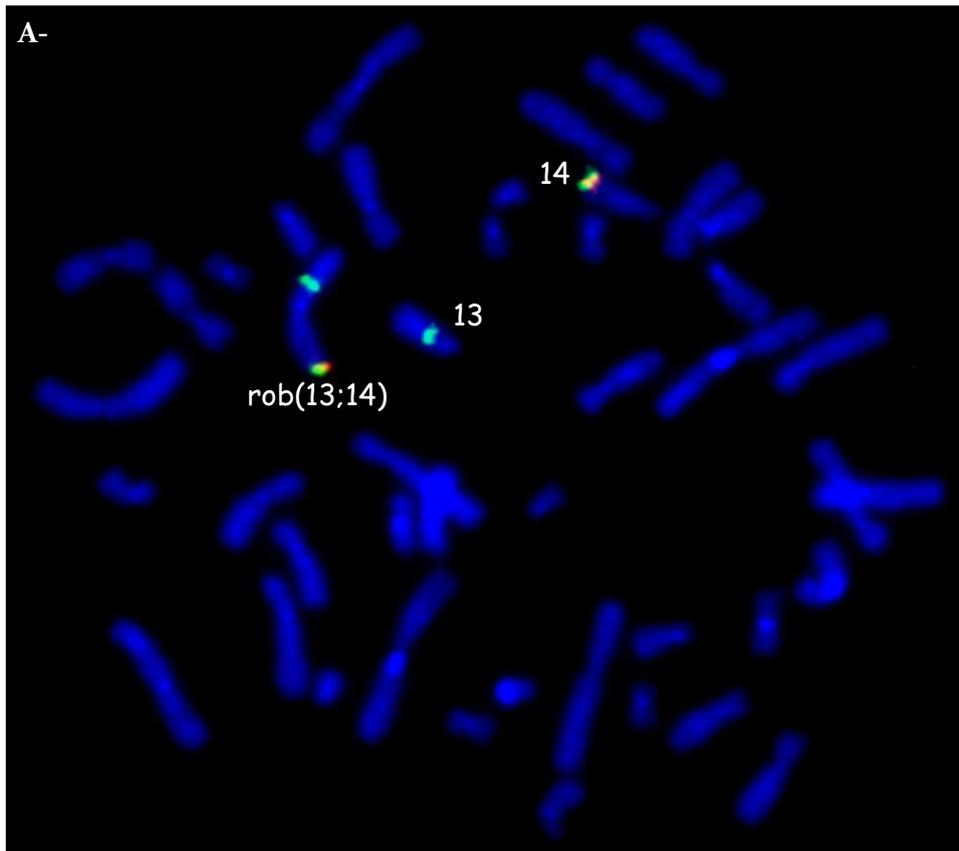


Photo 25 : Métaphase (A-) et spermatozoïdes (B-) après hybridation avec une sonde LSI 13q14 (spectrum vert) et une LSI IGH 14q32 (spectrum orange + vert).

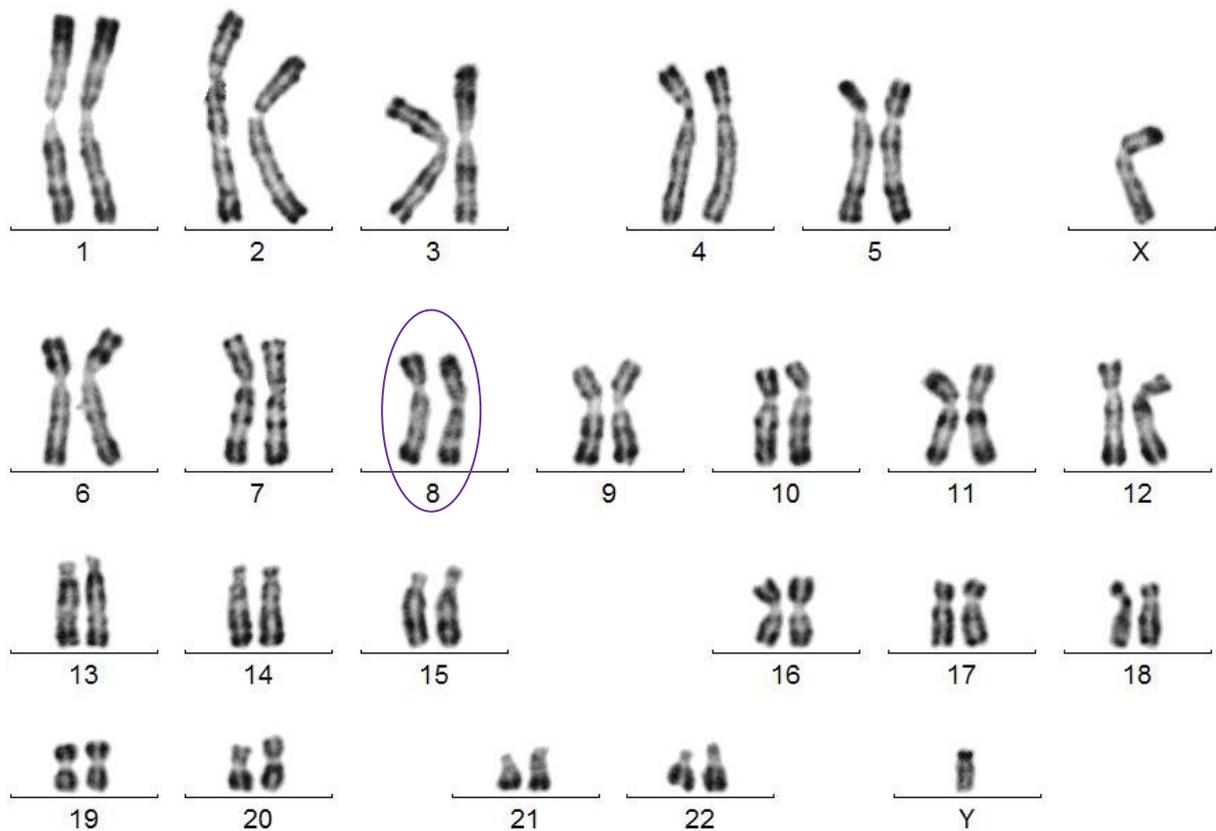


Figure 47 : Caryotype d'un patient porteur d'une inversion péricentrique, 46,XY,inv(8)(p12q21).

Lors de l'étude de la ségrégation méiotique par FISH chez un patient porteur d'une inversion péricentrique, il suffit d'utiliser deux sondes différentes couplées à deux fluorochromes différents, une spécifique de chaque télomère des bras court et long du chromosome impliqué dans l'anomalie et une sonde spécifique d'un autre chromosome afin de distinguer disomie et diploïdie. L'hybridation correcte des sondes est vérifiée sur métaphases (Photo 26 A-) avant d'être réalisée sur spermatozoïdes (Photo 26 B-).

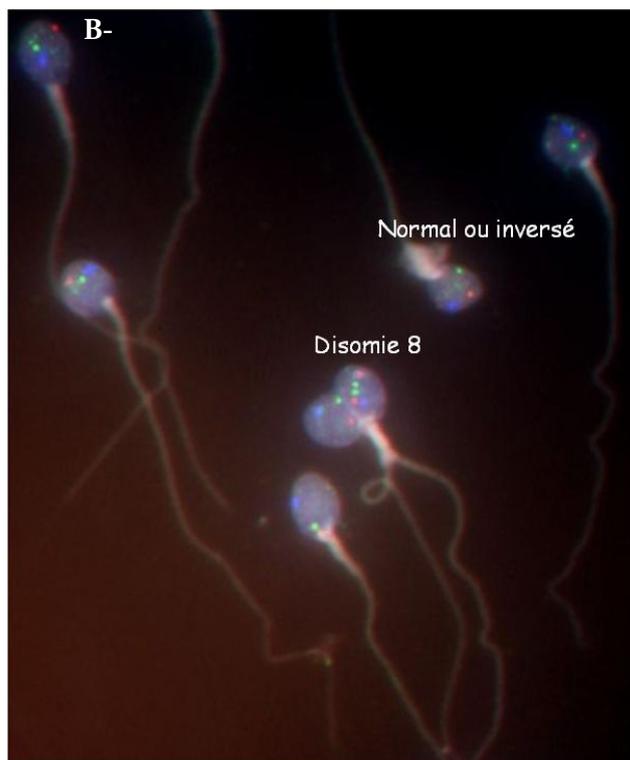
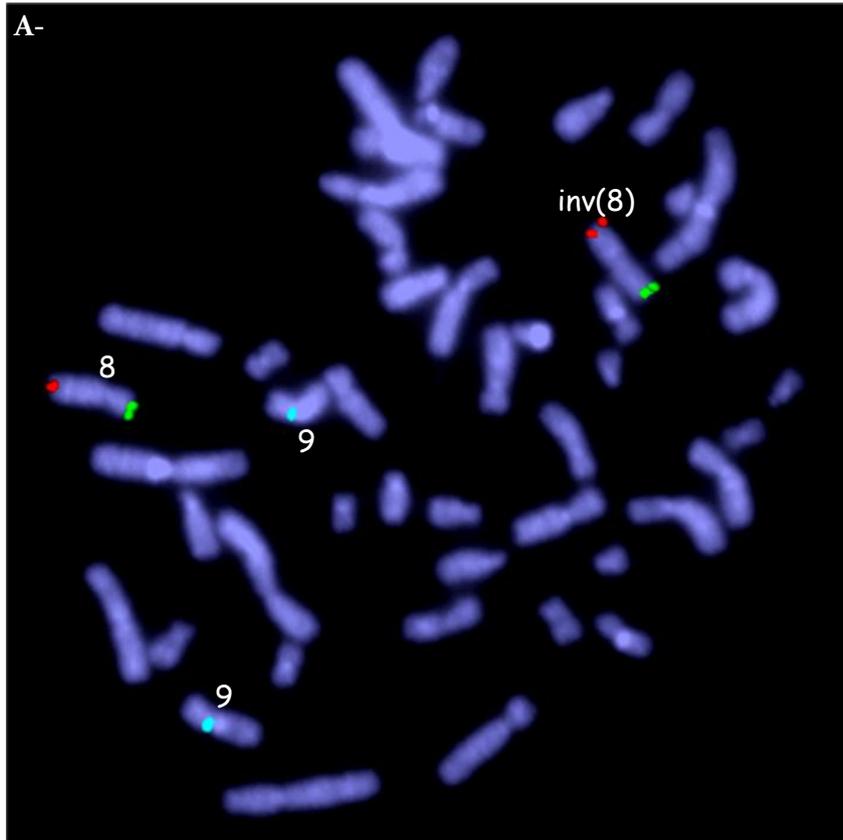


Photo 26 : Métaphase (A-) et spermatozoïdes (B-) après hybridation avec une 8pter (spectrum vert), 8qter (spectrum orange) et une CEP 9 (spectrum aqua).

## Annexe 2 : Solutions

### Spermogramme et spermocytogramme :

#### **Carnoy :**

3 volumes de méthanol + 1 volume d'acide acétique

#### **Sérum physiologique et Gutaraldéhyde à 25% en solution aqueuse :**

200  $\mu\text{L}$  de sérum physiologique + 25  $\mu\text{L}$  de sperme + 25  $\mu\text{L}$  de glutaraldéhyde

#### **May-Grünwald :**

Bleu de méthylène -éosine RAL solutions dans méthanol 125 mL : prêt à l'emploi

#### **Giemsa :**

Dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau d'Evian

### Cytogénétique conventionnelle sur sang :

#### **Solution pour le choc hypotonique :**

14,25 mL H<sub>2</sub>O distillée + 2,5 mL de sérum de veau fœtal décomplémenté

#### **MEM supplémenté en L-glutamine, pénicilline, streptomycine et héparine :**

100 mL de milieu MEM + 1 mL de L-glutamine 200 nM + 1 Ml de pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL-10 000  $\mu\text{g}$ /mL) + 10 gouttes d'héparine Chay® 25 000 UI/5mL

#### **Colchicine 8 mg/L :**

2 mL de colchicine 20 mg/L + 3 mL de milieu de culture MEM supplémenté en L-glutamine, pénicilline, streptomycine et héparine

**Earle :**

100 mL de solution saline équilibrée de Earle + qsp (quantité suffisante pour) 1 L H<sub>2</sub>O distillée

**Sérum de veau fœtal décomplémenté :**

Incubation de 100 mL de sérum de veau fœtal à 56°C pendant 1h

**RPMI 1640 supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté, L-glutamine, pénicilline et streptomycine :**

500 mL de milieu RPMI 1640 + 100 mL de sérum de veau fœtal décomplémenté + 5 mL de L-glutamine 200 nM + 5 mL de pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL-10 000 µg/mL)

**FudR 10<sup>-3</sup> M :**

10 mg de FudR + 40 mL de milieu RPMI

**FudR 10<sup>-5</sup> M :**

500 µL de FudR 10<sup>-3</sup> M + 49,5 mL de RPMI

**Tampon phosphate :**

7,39g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1L H<sub>2</sub>O distillée. Ajustement du pH à 6,7

**Giemsa à 2% :**

184 mL H<sub>2</sub>O distillée + 8 mL de tampon phosphate + 8 mL de colorant Giemsa R

**Uridine 10<sup>-3</sup> M :**

10 mg d'uridine + 40 mL de milieu RPMI

**Uridine 10<sup>-4</sup> M :**

1 mL d'uridine 10<sup>-3</sup> M + 9 mL de milieu RPMI

Cytogénétique moléculaire :

**Milieu Luria Bertini (LB)/chloramphenicol :**

8g de LB + 400 mL H<sub>2</sub>O distillée + 800 µL de chloramphénicol à 10 mg/mL

**Milieu LB/Agar 1%/chloramphenicol :**

5g de LB, 2,5g d'Agar et 250 mL H<sub>2</sub>O distillée + 500 µL de chloramphénicol à 10 mg/mL

**GTE 10X :**

45,05 g de glucose + 125 mL de Tris-HCl 250 M pH=8 + 100 mL d'EDTA 100 mM pH=8 + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 500 mL)

**GTE 1X :**

4 mL de GTE 10X + une pincée de lysozyme + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 40 mL)

SDS 1%/NaOH 0,2 N : 1 mL de SDS 10% + 200 µL de NaOH 10N + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 10 mL)

**Acétate de potassium 5M :**

122,68 g d'acétate de K + 250 mL d'acide acétique

**Acétate de potassium 3M/Acide acétique :**

15 mL d'acétate de K 5M + 2,88 mL d'acide acétique glacial + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 25 mL)

**EDTA 0,5 M :**

93,05 g d'EDTA + 400 mL H<sub>2</sub>O distillée + ajustement du pH à 8 + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 500 mL)

**Tris-HCl 1M :**

78,8 g de Tris-HCl + 500 mL H<sub>2</sub>O distillée

**TE 10X :**

10 mL de Tris-HCl 1M pH=7,5 + 2 mL d'EDTA 0,5M pH=8 + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 100 mL)

**TE 1X :**

5 mL de TE 10X + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 50 mL)

**Chlorure de lithium (LiCl) 5M :**

26,49g de LiCl + 6,25 mL de Tris-HCl 1M pH=7,5 + H<sub>2</sub>O distillée (qsp 125 mL)

**Acétate d'ammonium 7,5M :**

144,53 g d'acétate d'ammonium + 250 mL H<sub>2</sub>O distillée

**Alcool 70° :**

300 mL d'alcool 100° + 144 mL H<sub>2</sub>O distillée

**Alcool 90° :**

400 mL d'alcool 100° + 144 mL H<sub>2</sub>O distillée

**2X SSC :**

100 mL de 20X SSC + 900 H<sub>2</sub>O distillée

**4X SSC :**

200 mL de 20X SSC + 800 H<sub>2</sub>O distillée

**2X SSC/0,4% NP40 :**

400 µL de NP40 + 99,6 mL de 2X SSC

**2X SSC/0,1% NP40 :**

100 µL de NP40 + 99,9 mL de 2X SSC

**0,4X SSC/0,3% NP40 :**

300  $\mu$ L de NP40 + 99,7 mL de 4X SSC

**PBS 1X :**

100 mL de PBS 10X + 900 mL H<sub>2</sub>O distillée

**NaOH 10 N :**

200 g de NaOH + 500 mL H<sub>2</sub>O distillée

**NaOH 1N :**

10 mL NaOH 10 M + 90 mL H<sub>2</sub>O distillée

Technique TUNEL :

**Mélange 1 :**

31,5  $\mu$ L de tampon de réaction + 13,5  $\mu$ L d'enzyme TdT

**Tampon de lavage :**

1,5 mL de tampon de lavage et de 48,5 mL d'eau distillée



# BIBLIOGRAPHIE



- Achard, V., O. Paulmyer-Lacroix, G. Mercier, G. Porcu, J. Saias-Magnan, C. Metzler-Guillemain and M. R. Guichaoua (2007). "Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa." *J Androl* **28**(4): 600-6.
- Aitken, R. J., G. N. De Iuliis and R. I. McLachlan (2009). "Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line." *Int J Androl* **32**(1): 46-56.
- Amiel, A., B. Bartoov, D. Pevsner, F. Sardos-Albertini and M. D. Fejgin (2002). "No intraindividual variation of disomy rate in sperm samples." *J Hum Genet* **47**(10): 539-42.
- Anahory, T., S. Hamamah, B. Andreo, B. Hedon, M. Claustres, P. Sarda and F. Pellestor (2005). "Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting." *Hum Reprod* **20**(7): 1850-4.
- Andrabi, S. M. (2007). "Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation." *J Assist Reprod Genet* **24**(12): 561-9.
- Antinori, M., E. Licata, G. Dani, F. Cerusico, C. Versaci, D. d'Angelo and S. Antinori (2008). "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial." *Reprod Biomed Online* **16**(6): 835-41.
- Anton, E., F. Vidal and J. Blanco (2007). "Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers." *Hum Reprod* **22**(8): 2088-2092.
- Aoki, V. W., B. R. Emery, L. Liu and D. T. Carrell (2006). "Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity." *J Androl* **27**(6): 890-8.
- Arruda, J. T., B. M. Bordin, P. R. Santos, W. E. Mesquita, R. C. Silva, M. C. Maia, M. S. Approbato, R. S. Florencio, W. N. Amaral, M. A. Rocha Filho and K. K. Moura (2007). "Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients." *Genet Mol Res* **6**(2): 461-9.
- Bandyopadhyay, R., A. Heller, C. Knox-DuBois, C. McCaskill, S. A. Berend, S. L. Page and L. G. Shaffer (2002). "Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation." *Am J Hum Genet* **71**(6): 1456-62.
- Barlow, P. and C. G. Vosa (1970). "The Y chromosome in human spermatozoa." *Nature* **226**(5249): 961-2.
- Bartoov, B., A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosovsky, A. Yagoda, H. Lederman, S. Artzi, M. Gross and Y. Barak (2003). "Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection." *Fertil Steril* **80**(6): 1413-9.
- Bartoov, B., A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosowski, Y. Menezes and Y. Barak (2002). "Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome." *J Androl* **23**(1): 1-8.
- Basinko, A., A. Perrin, H. A. Nguyen, F. Morel, M. J. Le Bris, A. H. Saliou, M. Collet, P. Parent, C. Benech, S. Quemener, C. Férec, N. Douet-Guilbert and M. De Braekeleer (2009). "Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18." *Am J Med Genet*.
- Bejarano, I., G. M. Lozano, A. Ortiz, J. F. Garcia, S. D. Paredes, A. B. Rodriguez and J. A. Pariente (2008). "Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone." *Fertil Steril* **90**(4 Suppl): 1340-7.
- Benchaib, M., J. Lornage, C. Mazoyer, H. Lejeune, B. Salle and J. Francois Guerin (2007). "Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome." *Fertil Steril* **87**(1): 93-100.
- Bernard, M., P. Sanseau, C. Henry, A. Couturier and C. Prigent (1998). "Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter." *Genomics* **53**(3): 406-9.

- Biennu, T., C. Patrat and P. Jouannet (2003). "Molecular detection of Y chromosome microdeletions: a new approach based on the denaturing gradient gel electrophoresis." Gynecol Obstet Fertil **31**: 639-46.
- Boe-Hansen, G. B., J. Fedder, A. K. Ersboll and P. Christensen (2006). "The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic." Hum Reprod **21**(6): 1576-82.
- Boue, J. and A. Boue (1973). "Chromosomal errors in relation to reproductive failure." Dans : Boue, A., Thibault, C. Edition : Inserm: 29-52.
- Bourrouillou, G., N. Dastugue and P. Colombies (1985). "Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml." Hum Genet **71**(4): 366-7.
- Bozec, A., S. Amara, B. Guarmit, J. Selva, M. Albert, J. Rollet, M. El Sirkasi, F. Vialard, M. Bailly, M. Benahmed and C. Mauduit (2008). "Status of the executioner step of apoptosis in human with normal spermatogenesis and azoospermia." Fertil Steril **90**(5): 1723-31.
- Brandell, R. A., A. Mielnik, D. Liotta, Z. Ye, L. L. Veeck, G. D. Palermo and P. N. Schlegel (1998). "AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test." Hum Reprod **13**(10): 2812-5.
- Braun, R. E. (2001). "Packaging paternal chromosomes with protamine." Nat Genet **28**(1): 10-2.
- Brugnon, F., L. Janny, C. Artonne, B. Sion, J. L. Pouly and G. Grizard (2008). "Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome." Fertil Steril. 2008 Sep 5. [Epub ahead of print]
- Brugnon, F., E. Van Assche, G. Verheyen, B. Sion, D. Boucher, J. L. Pouly, L. Janny, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2006). "Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients." Hum Reprod **21**(3): 685-93.
- Calogero, A. E., A. De Palma, C. Grazioso, N. Barone, R. Romeo, G. Rappazzo and R. D'Agata (2001). "Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters." Hum Reprod **16**(6): 1172-9.
- Carr, D. H. (1963). "Chromosome Studies in Abortuses and Stillborn Infants." Lancet **2**(7308): 603-6.
- Carrara, R. C. V., R. Yamasaki, L. F. Mazucatto, M. A. L. Veludo, E. L. Sartorato and J. M. Pina-Neto (2004). "Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men." Genet. Mol. Biol. **27**(4): 477-82.
- Carrell, D. T. and L. Liu (2001). "Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis." J Androl **22**(4): 604-10.
- Caspersson, T., S. Farber, G. E. Foley, J. Kudynowski, E. J. Modest, E. Simonsson, U. Wagh and L. Zech (1968). "Chemical differentiation along metaphase chromosomes." Exp Cell Res **49**(1): 219-22.
- Chandley, A., J. Fletcher and J. Robinson (1976). "Normal meiosis in two 47,XXY men." Hum Genet **33**: 231-40.
- Chantot-Bastaraud, S., C. Ravel, I. Berthaut, K. McElreavey, P. Bouchard, J. Mandelbaum and J. P. Siffroi (2007). "Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility." Mol Hum Reprod **13**(1): 55-9.
- Chen, Y., J. Huang, P. Liu and J. Qiao (2007). "Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations." J Assist Reprod Genet **29**(9): 406-11.
- Chernykh, V. B., A. L. Chukhrova, T. S. Beskorovainia, E. M. Grishina, T. M. Sorokina, L. V. Shileiko, P. A. Gogolevskii, A. S. Kalugina, G. V. Morina, A. S. Togobetskii, V. E. Tanevskii, V. M. Zdanovskii, I. K. Gogolevskaia, D. A. Kramerov, A. V. Poliakov and L. F. Kurilo (2006).

- "[Types of Y chromosome deletions and their frequency in infertile men]." Genetika **42(8)**: 1130-6.
- Chohan, K. R., J. T. Griffin, M. Lafromboise, C. J. De Jonge and D. T. Carrell (2006). "Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm." J Androl **27(1)**: 53-9.
- Clément, P., L. Lohmann and M. Minz (2008). "Screening for Y chromosome microdeletions in Assisted Reproductive Techniques." Gynecol Obstet Fertil **36**: 318-324.
- Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale (2004). "Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques." Dans : Génétique médicale formelle, chromosomique, moléculaire, clinique. Jeanpierre, M., Jonveaux, P., Lacombe, D., Leporrier, N., Lyonnet, S. Moraine, C. Masson: 71-83.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." Mol Biotechnol **26(3)**: 249-61.
- Cooper, D. C. and R. A. Brink (1931). "Cytological Evidence for Segmental Interchange between Non-Homologous Chromosomes in Maize." Proc Natl Acad Sci U S A **17(6)**: 334-8.
- Cotter, P. D., M. Caggana, J. P. Willner, A. Babu and R. J. Desnick (1996). "Prenatal diagnosis of a fetus with two balanced de novo chromosome rearrangements." Am J Med Genet **66(2)**: 197-9.
- Craft, I., V. Bennett and N. Nicholson (1993). "Fertilising ability of testicular spermatozoa." Lancet **342(8875)**: 864.
- Cram, D. S., K. Ma, S. Bhasin, J. Arias, M. Pandjaitan, B. Chu, M. S. Audrins, D. Saunders, F. Quinn, D. deKretser and R. McLachlan (2000). "Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions." Fertil Steril **74(5)**: 909-15.
- Cram, D. S., E. Osborne and R. I. McLachlan (2006). "Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception." Med J Aust **185(8)**: 433-4.
- Cremer, T. and C. Cremer (1988). "Centennial of Wilhelm Waldeyer's introduction of the term "chromosome" in 1888." Cytogenet Cell Genet **48(2)**: 65-7.
- Dam, A. H., I. Kosciński, J. A. Kremer, C. Moutou, A. S. Jaeger, A. R. Oudakker, H. Tournaye, N. Charlet, C. Lagier-Tourenne, H. van Bokhoven and S. Viville (2007). "Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia." Am J Hum Genet **81(4)**: 813-20.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, T. Sharpless and M. R. Melamed (1975). "Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry." Exp Cell Res **90(2)**: 411-28.
- David, G. (1975). "Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **4(Suppl 1)**: 7-36.
- Davis, R. O., D. E. Bain, R. J. Siemers, D. M. Thal, J. B. Andrew and C. G. Gravance (1992). "Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument." Fertil Steril **58(4)**: 763-9.
- Dawson, A., G. Griesinger and K. Diedrich (2006). "Screening oocytes by polar body biopsy." Reprod Biomed Online **13(1)**: 104-9.
- De Braekeleer, M. and T. N. Dao (1991). "Cytogenetic studies in male infertility: a review." Hum Reprod **6(2)**: 245-50.
- De Braekeleer, M., A. Perrin and F. Morel (2006). "Chromosomal abnormalities in male infertility." Dans : Cytogenetics and Infertility. Dir : De Braekeleer, M. Transworld Research Network, Trivandrum (India): 27-52.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (1993). "A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa." Int J Androl **16(1)**: 21-5.

- de Lamirande, E. and C. O'Flaherty (2008). "Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 106-15.
- Dewan, S., E. E. Puscheck, C. B. Coulam, A. J. Wilcox and R. S. Jeyendran (2006). "Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss." Fertil Steril **85**(2): 441-5.
- Dieterich, K., R. Soto Rifo, A. K. Faure, S. Hennebicq, B. Ben Amar, M. Zahi, J. Perrin, D. Martinez, B. Sele, P. S. Jouk, T. Ohlmann, S. Rousseaux, J. Lunardi and P. F. Ray (2007). "Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility." Nat Genet **39**(5): 661-5.
- Dieterich, K., R. Zouari, R. Harbuz, F. Vialard, D. Martinez, H. Bellayou, N. Prisant, A. Zoghmar, M. R. Guichaoua, I. Koscinski, M. Kharouf, M. Noruzinia, S. Nadifi, A. Sefiani, J. Lornage, M. Zahi, S. Viville, B. Sele, P. S. Jouk, M. C. Jacob, D. Escalier, Y. Nikas, S. Hennebicq, J. Lunardi and P. F. Ray (2009). "The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population." Hum Mol Genet **18**(7): 1301-9.
- Dorigo, B., T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R. R. Schroeder and T. J. Richmond (2004). "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber." Science **306**(5701): 1571-3.
- Dozortsev, D., R. Neme, M. P. Diamond, S. Abdelmassih, V. Abdelmassih, F. Oliveira and R. Abdelmassih (2006). "Embryos generated using testicular spermatozoa have higher developmental potential than those obtained using epididymal spermatozoa in men with obstructive azoospermia." Fertil Steril **86**(3): 606-11.
- Dunkel, L., V. Hirvonen and K. Erkkila (1997). "Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis." Cell Death Differ **4**(3): 171-9.
- Dutrillaux, B. and J. Lejeune (1971). "[A new technic of analysis of the human karyotype]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **272**(20): 2638-40.
- Duzcan, F., Z. Aybek, E. Tepeli, V. Caner, G. O. Cetin, H. Aybek and H. Bagci (2006). "Sex chromosome aneuploidy rates in the somatic cells of infertile men." J Reprod Med **51**(6): 489-92.
- Escudero, T., I. Abdelhadi, M. Sandalinas and S. Munne (2003). "Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations." Fertil Steril **79 Suppl 3**: 1528-34.
- ESHRE (2008). "Bonnes pratiques cliniques dans le domaine de la procréation médicalement assistée. Une prise de position de l'ESHRE. Traduction française : P. Boyer et JF. Guérin."
- Evans, H. J., K. E. Buckton and A. T. Sumner (1971). "Cytological mapping of human chromosomes: results obtained with quinacrine fluorescence and the acetic-saline-Giemsa techniques." Chromosoma **35**(3): 310-25.
- Evenson, D. P., Z. Darzynkiewicz and M. R. Melamed (1980). "Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility." Science **210**(4474): 1131-3.
- Evenson, D. P., P. J. Higgins, D. Grueneberg and B. E. Ballachey (1985). "Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea." Cytometry **6**(3): 238-53.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, R. K. Baer, T. W. Turner and S. M. Schrader (1991). "Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay." Reprod Toxicol **5**(2): 115-25.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, D. Marshall, M. J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis and O. P. Claussen (1999). "Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic." Hum Reprod **14**(4): 1039-49.
- Fellmann, F. (2006). "Délétion de l'Y." <http://www.orpha.net>.

- Ferguson-Smith, M. A., B. Lennox, W. S. Mack and J. S. Stewart (1957). "Klinefelter's syndrome; frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex." Lancet **273**(6987): 167-9.
- Ferlin, A., B. Arredi, E. Speltra, C. Cazzadore, R. Selice, A. Garolla, A. Lenzi and C. Foresta (2007). "Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 762-70.
- Ferlin, A., E. Moro, A. Rossi, B. Dallapiccola and C. Foresta (2003). "The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men." J Med Genet **40**(1): 18-24.
- Ferlin, A., A. Tessari, F. Ganz, E. Marchina, S. Barlati, A. Garolla, B. Engl and C. Foresta (2005). "Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility." J Med Genet **42**(3): 209-13.
- Fernandez, J. L., L. Muriel, M. T. Rivero, V. Goyanes, R. Vazquez and J. G. Alvarez (2003). "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." J Androl **24**(1): 59-66.
- Fishel, S., S. Green, M. Bishop, S. Thornton, A. Hunter, S. Fleming and S. al-Hassan (1995). "Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid." Lancet **345**(8965): 1641-2.
- Fishel, S., S. Green, A. Hunter, F. Lisi, L. Rinaldi, R. Lisi and H. McDermott (1997). "Human fertilization with round and elongated spermatids." Hum Reprod **12**(2): 336-40.
- Foresta, C., A. Ferlin and E. Moro (2000). "Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility." Hum Mol Genet **9**(8): 1161-9.
- Foresta, C., A. Garolla, L. Bartoloni, A. Bettella and A. Ferlin (2005). "Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection." J Clin Endocrinol Metab **90**(1): 152-6.
- Foresta, C., E. Moro and A. Ferlin (2001). "Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis." Endocr Rev **22**(2): 226-39.
- Frydman, N., N. Prisant, L. Hesters, R. Frydman, G. Tachdjian, P. Cohen-Bacrie and R. Fanchin (2008). "Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation." Fertil Steril **89**(1): 92-7.
- Frydman, R. and F. Olivennes (1992). "[Sterility and medically assisted fertilization]." Rev Prat **42**(7): 872-6.
- Fryns, J. P. and H. Van den Berghe (1980). "Paracentric Inversion in man: personal experience and review of the literature." Hum Genet **54**(3): 413-6.
- Garrido, N., J. A. Martinez-Conejero, J. Jauregui, J. A. Horcajadas, C. Simon, J. Remohi and M. Meseguer (2009). "Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome." Fertil Steril **91**(4 Suppl): 1307-10.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Geneix, A., B. Schubert, A. Force, K. Rodet, G. Briancon and D. Boucher (2002). "Sperm analysis by FISH in a case of t(17; 22) (q11; q12) balanced translocation: case report." Hum Reprod **17**(2): 325-31.
- Giachini, C., I. Laface, E. Guarducci, G. Balercia, G. Forti and C. Krausz (2008). "Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population." Hum Genet **124**(4): 399-410.
- Giltay, J. C., P. M. Kastrop, C. H. Tiemessen, W. G. van Inzen, J. M. Scheres and P. L. Pearson (1999). "Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH." Cytogenet Cell Genet **84**(1-2): 67-72.

- Girardi, S. K., A. Mielnik and P. N. Schlegel (1997). "Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men." *Hum Reprod* **12**: 1635-41.
- Glover, D. M., M. H. Leibowitz, D. A. McLean and H. Parry (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." *Cell* **81**(1): 95-105.
- Göhde, W. (1968). "Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion. Patent DE1815352."
- Gorczyca, W., J. Gong and Z. Darzynkiewicz (1993). "Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays." *Cancer Res* **53**(8): 1945-51.
- Gorczyca, W., F. Traganos, H. Jesionowska and Z. Darzynkiewicz (1993). "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells." *Exp Cell Res* **207**(1): 202-5.
- Gorski, J. L., M. L. Kistenmacher, H. H. Punnett, E. H. Zackai and B. S. Emanuel (1988). "Reproductive risks for carriers of complex chromosome rearrangements: analysis of 25 families." *Am J Med Genet* **29**(2): 247-61.
- Goumy, C., M. Mihaescu, A. Tchirkov, M. Giollant, C. Benier, C. Francannet, J. Y. Jaffray, A. Geneix and P. Vago (2006). "De novo balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosome 8, 11 and 16 in a boy with mild developmental delay and psychotic disorder." *Genet Couns* **17**(3): 371-9.
- Greco, E., M. Iacobelli, L. Rienzi, G. F. Fabris, N. Tesorio and J. Tesarik (2008). "Birth of a healthy boy after fertilization of cryopreserved oocytes with cryopreserved testicular spermatozoa from a man with nonmosaic Klinefelter syndrome." *Fertil Steril* **89**(4): 991 e5-7.
- Greco, E., S. Romano, M. Iacobelli, S. Ferrero, E. Baroni, M. G. Minasi, F. Ubaldi, L. Rienzi and J. Tesarik (2005). "ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment." *Hum Reprod* **20**(9): 2590-4.
- Guichaoua, M. R., D. Delafontaine, B. Noel and J. M. Luciani (1993). "[Male infertility of chromosomal origin]." *Contracept Fertil Sex* **21**(2): 113-21.
- Guthauser, B., F. Vialard, M. Dakouane, V. Izard, M. Albert and J. Selva (2006). "Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome." *Fertil Steril* **85**(3): 750 e5-750 e7.
- Guttenbach, M., W. Engel and M. Schmid (1997). "Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations." *Hum Genet* **100**(1): 1-21.
- Guttenbach, M. and M. Schmid (1990). "Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization." *Am J Hum Genet* **46**(3):553-8.
- Hammoud, S. S., D. A. Nix, H. Zhang, J. Purwar, D. T. Carrell and B. R. Cairns (2009). "Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development." *Nature*. 2009 Jun 14. [Epub ahead of print]
- Harbuz, R., R. Zouari, K. Dieterich, Y. Nikas, J. Lunardi, S. Hennebicq and P. F. Ray (2009). "[Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction.]." *Gynecol Obstet Fertil* **37**(6): 546-551.
- Harper, M. E. and G. F. Sauders (1981). "Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization." *Chromosoma* **P3**: 431-39.
- HAS (2006). "Évaluation de la fécondation in vitro avec micromanipulation (Intracytoplasmic sperm injection [ICSI]) Indications, coût-efficacité et risques pour la descendance." Service évaluation des actes professionnels. Service évaluation médico-économique et santé publique: 1-177.

- Hauschka, T. S., J. E. Hasson, M. N. Goldstein, G. F. Koepf and A. A. Sandberg (1962). "An XYY man with progeny indicating familial tendency to non-disjunction." Am J Hum Genet **14**: 22-30.
- Hellani, A., S. Al-Hassan, M. A. Iqbal and S. Coskun (2006). "Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia." J Exp Clin Assist Reprod **3**: 1.
- Herrero, M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon (2003). "Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa." Curr Pharm Des **9**(5): 419-25.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley and S. Jasper (1977). "Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy." Appl Environ Microbiol **33**(5): 1225-8.
- Honda, H., N. Miharuru, Y. Ohashi, N. Honda, T. Hara and K. Ohama (1999). "Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization." Hum Genet **105**(5): 428-36.
- Hook, E. B., D. M. Schreinemachers, A. M. Willey and P. K. Cross (1984). "Inherited structural cytogenetic abnormalities detected incidentally in fetuses diagnosed prenatally: frequency, parental-age associations, sex-ratio trends, and comparisons with rates of mutants." Am J Hum Genet **36**(2): 422-43.
- Hsu, L. Y., P. A. Benn, H. L. Tannenbaum, T. E. Perlis and A. D. Carlson (1987). "Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study." Am J Med Genet **26**(1): 95-101.
- Hsu, T. C. (1952). "Tissue culture studies on human skin. III. Some cytological fractures of the outgrowth of epithelial cells." Tex Rep Biol Med **10**(2): 336-52.
- Huang, C. C., D. P. Lin, H. M. Tsao, T. C. Cheng, C. H. Liu and M. S. Lee (2005). "Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates." Fertil Steril **84**(1): 130-40.
- Huckins, C. (1971). "The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation." Anat Rec **169**(3): 533-57.
- Humeau, C. and F. Arnal (2007). "La spermatogénèse Dans : Reproduction et Développement." sauramps médical.
- Hungerford, D. A. (1978). "Some early studies of human chromosomes, 1879--1955." Cytogenet Cell Genet **20**(1-6): 1-11.
- Hysert, M., H. Bruyere, G. B. Cote, A. J. Dawson, J. A. Dolling, R. Fetni, M. Hrynychak, J. Lavoie, J. McGowan-Jordan, F. Tihy and A. M. Duncan (2006). "Prenatal cytogenetic assessment and inv(2)(p11.2q13)." Prenat Diagn **26**(9): 810-3.
- ISCN (2005). "ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature. In: Schaffer, LG., Tommerup, N. editors. Basel: S. Karger."
- Jaarola, M., R. H. Martin and T. Ashley (1998). "Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique." Am J Hum Genet **63**(1): 218-24.
- Jacobs, P. A., M. Melville, S. Ratcliffe, A. J. Keay and J. Syme (1974). "A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants." Ann Hum Genet **37**(4): 359-76.
- Jacobs, P. A. and J. A. Strong (1959). "A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism." Nature **183**(4657): 302-3.
- Jalbert, P. (2004). "Exploration génétique du couple infertile." Dans : Hamamah S, Saliba E, Benhamed M, Gold F. Médecine et biologie de la reproduction. Masson, Paris: 55-66.
- Jalbert, P., B. Sele and H. Jalbert (1980). "Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing." Hum Genet **55**(2): 209-22.
- Jalbert, P., M. Servoz-Gavin, F. Amblard, H. Pison, S. Augusseau, H. Jalbert and B. Sele (1989). "[Role of karyotype in studying male infertility]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **18**(6): 724-8.

- Janny, L. and Y. J. Menezo (1994). "Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation." Mol Reprod Dev **38**(1): 36-42.
- Kaiser, P. (1984). "Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics." Hum Genet **68**(1): 1-47.
- Karadeniz, N., K. Mrasek and A. Weise (2008). "Further delineation of complex chromosomal rearrangements in fertile male using multicolor banding." Mol Cytogenet **1**(1): 17.
- Karaer, A., K. Karaer, G. Ozaksit, S. Ceylaner and E. F. Percin (2008). "Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss." Am J Obstet Gynecol **199**(6): 662 e1-5.
- Katagiri, Y., Q. V. Neri, T. Takeuchi, P. N. Schlegel, W. A. Megid, M. Kent-First, Z. Rosenwaks and G. D. Palermo (2004). "Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children." Reprod Biomed Online **8**(3): 307-18.
- Kekesi, A., E. Erdei, M. Torok, S. Dravucz and A. Toth (2007). "Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers." Fertil Steril **88**(1): 212 e5-11.
- Kent-First, M., A. Muallem, J. Shultz, J. Pryor, K. Roberts, W. Nolten, L. Meisner, A. Chandley, G. Gouchy, L. Jorgensen, T. Havighurst and J. Grosch (1999). "Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection." Mol Reprod Dev **53**(1): 27-41.
- Kent-First, M. G., S. Kol, A. Muallem, R. Ofir, D. Manor, S. Blazer, N. First and J. Itskovitz-Eldor (1996). "The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers." Mol Hum Reprod **2**(12): 943-50.
- Kihaile, P. E., A. Yasui and Y. Shuto (2005). "Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin." J Exp Clin Assist Reprod **2**: 9.
- Kimura, M., S. Kotani, T. Hattori, N. Sumi, T. Yoshioka, K. Todokoro and Y. Okano (1997). "Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1." J Biol Chem **272**(21): 13766-71.
- Kimura, M., Y. Matsuda, T. Yoshioka and Y. Okano (1999). "Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3." J Biol Chem **274**(11): 7334-40.
- Kimura, M., Y. Matsuda, T. Yoshioka, N. Sumi and Y. Okano (1998). "Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of Drosophila and yeast IPL1." Cytogenet Cell Genet **82**(3-4): 147-52.
- Kjessler, B. (1966). "Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic." Monogr Hum Genet **2**: 1-93.
- Kramer, J. A. and S. A. Krawetz (1997). "RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome." Mol Hum Reprod **3**(6): 473-8.
- Krausz, C. and K. McElreavey (2001). "Y chromosome microdeletions in 'fertile' males." Hum Reprod **16**(6): 1306-7.
- Krausz, C., L. Quintana-Murci and K. McElreavey (2000). "Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis?" Hum Reprod **15**: 1431-34.
- Kruger, T. F., T. C. du Toit, D. R. Franken, R. Menkveld and C. J. Lombard (1995). "Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS." Fertil Steril **63**(1): 134-41.
- Larson, K. L., C. J. DeJonge, A. M. Barnes, L. K. Jost and D. P. Evenson (2000). "Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques." Hum Reprod **15**(8): 1717-22.

- Lee, J. D., Y. Kamiguchi and R. Yanagimachi (1996). "Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes." *Hum Reprod* **11**(9): 1942-6.
- Lee, S. H., S. Y. Ahn, K. W. Lee, K. Kwack, H. S. Jun and K. Y. Cha (2006). "Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses." *Fertil Steril* **85**(5): 1512-5.
- Lefort, G., P. Blanchet, N. Belgrade, F. Rivier, A. M. Chaze, P. Sarda, J. Demaille and F. Pellestor (2003). "Stable dicentric duplication-deficiency chromosome 14 resulting from crossing-over within a maternal paracentric inversion." *Am J Med Genet A* **118A**(2): 333-8.
- Lejeune, J., M. Gautier and R. Turpin (1959). "[Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]" *CR Hebd Seances Acad Sci* **248**(11): 1721-2.
- Leridon, H. (1982). "Stérilité, hypofertilité et infécondité en France." *Population* **37**(4-5): 807.
- Levy, R. and I. Seifer-Aknin (2001). "[Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization]." *Ann Biol Clin (Paris)* **59**(5): 531-45.
- Lewis, S. E., M. O'Connell, M. Stevenson, L. Thompson-Cree and N. McClure (2004). "An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction." *Hum Reprod* **19**(6): 1385-94.
- Li, T. C., M. Makris, M. Tomsu, E. Tuckerman and S. Laird (2002). "Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis." *Hum Reprod Update* **8**(5): 463-81.
- Li, Z., C. J. Haines and Y. Han (2008). "'Micro-deletions' of the human Y chromosome and their relationship with male infertility." *J Genet Genomics* **35**(4): 193-9.
- Loginova Iu, A., Nagornaia, II, S. A. Shlykova, L. I. Petrova, M. V. Rybakova, T. V. Kuznetsova and V. S. Baranov (2003). "[Molecular genetic analysis of Y-chromosome micro deletions in men with severe spermatogenic defects]." *Mol Biol (Mosk)* **37**(1): 74-80.
- Lopes, S., A. Jurisicova, J. G. Sun and R. F. Casper (1998). "Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa." *Hum Reprod* **13**(4): 896-900.
- Lopez-Tejion, M., M. Elbaile and J. G. Alvarez (2008). "Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain." *Andrologia* **40**(5): 318-28.
- Lu, L., M. Lin, M. Xu, Z. M. Zhou and J. H. Sha (2006). "Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells." *Asian J Androl* **8**(1): 53-9.
- Luciani, J. M., M. R. Guichaoua, A. Mattei and M. R. Morazzani (1984). "Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle." *Cytogenet Cell Genet* **38**(1): 14-22.
- Ma, K., J. D. Inglis and A. Sharkley (1993). "A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis." *Cell* **75**: 1287-95.
- Machev, N., P. Gosset and S. Viville (2005). "Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia." *Cytogenet Genome Res* **111**(3-4): 352-7.
- Madan, K., A. W. Nieuwint and Y. van Bever (1997). "Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations." *Hum Genet* **99**(6): 806-15.
- Manicardi, G. C., A. Tombacco, D. Bizzaro, U. Bianchi, P. G. Bianchi and D. Sakkas (1998). "DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays." *Histochem J* **30**(1): 33-9.
- Manvelyan, M., F. Hunstig, S. Bhatt, K. Mrasek, F. Pellestor, A. Weise, I. Simonyan, R. Aroutiounian and T. Liehr (2008). "Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study." *Mol Cytogenet* **1**: 25.

- Marchetti, C. and P. Marchetti (2005). "[Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology]." Gynecol Obstet Fertil **33**(9): 669-77.
- Martin, R., E. Ko and K. Chan (1993). "Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH)." Cytogenet Cell Genet **64**: 23-6.
- Martin, R. H. (2008). "Cytogenetic determinants of male fertility." Hum Reprod Update **14**(4): 379-90.
- Martins, C. F., M. N. Dode, S. N. Bao and R. Rumpf (2007). "The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA." Genet Mol Res **6**(1): 94-104.
- McClintock, B. (1930). "A Cytological Demonstration of the Location of an Interchange between Two Non-Homologous Chromosomes of Zea Mays." Proc Natl Acad Sci U S A **16**(12): 791-6.
- McElreavey, K., C. Krausz, C. Patrat and M. Fellous (2002). "[Male infertility and microdeletions of the Y chromosome]." Gynecol Obstet Fertil **30**(5): 405-12.
- McPherson, S. and F. J. Longo (1993). "Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids." Eur J Histochem **37**(2): 109-28.
- Menezo, Y. J., A. Hazout, G. Panteix, F. Robert, J. Rollet, P. Cohen-Bacrie, F. Chapuis, P. Clement and M. Benkhalifa (2007). "Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect." Reprod Biomed Online **14**(4): 418-21.
- Mennicke, K., P. Diercks, H. Schlieker, M. Bals-Pratsch, S. al Hasani, K. Diedrich and E. Schwinger (1997). "Molecular cytogenetic diagnostics in sperm." Int J Androl **20 Suppl 3**: 11-9.
- Mercier, S. (1996). "Génétique et reproduction humaines. Etude des anomalies chromosomiques des gamètes et du conceptus : apport de l'hybridation in situ en fluorescence. 313 p. Thèse : Science : Besançon ; 96-08."
- Mercier, S. and J. L. Bresson (1997). "Analysis of chromosomal equipment in spermatozoa of a 46,XY/47,XY/+8 male by means of multicolour fluorescent in situ hybridization: confirmation of a mosaicism and evaluation of risk for offspring." Hum Genet **99**(1): 42-6.
- Meseguer, M., J. A. Martinez-Conejero, J. E. O'Connor, A. Pellicer, J. Remohi and N. Garrido (2008). "The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor." Fertil Steril **89**(5): 1191-9.
- Meseguer, M., R. Santiso, N. Garrido, M. Gil-Salom, J. Remohi and J. L. Fernandez (2008). "Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test." Fertil Steril. 2008 Nov 10. [Epub ahead of print]
- Miharu, N. (2005). "Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): 347-51.
- Miller, J. F., E. Williamson, J. Glue, Y. B. Gordon, J. G. Grudzinskas and A. Sykes (1980). "Fetal loss after implantation. A prospective study." Lancet **2**(8194): 554-6.
- Molina Gomes, D., I. Hammoud, M. Bailly, M. Bergere, R. Wainer, J. Selva and F. Vialard (2009). "Preconceptional diagnosis for Robertsonian translocation as an alternative to preimplantation genetic diagnosis in two situations: a pilot study." J Assist Reprod Genet **26**(2-3): 113-7.
- Montag, M., K. van der Ven, B. Rosing and H. van der Ven (2009). "Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening." Reprod Biomed Online **18 Suppl 1**: 6-11.
- Moradkhani, K., J. Puechberty, S. Bhatt, J. Lespinasse, P. Vago, G. Lefort, P. Sarda, S. Hamamah and F. Pellestor (2006). "Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm

- FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report." Hum Reprod **21**(12): 3193-8.
- Moradkhani, K., J. Puechberty, S. Bhatt, P. Vago, L. Janny, G. Lefort, S. Hamamah, P. Sarda and F. Pellestor (2006). "Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases." Hum Reprod **21**(5): 1166-71.
- Morel, F., I. Bernicot, A. Herry, M. J. Le Bris, V. Amice and M. De Braekeleer (2003). "An increased incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome." Fertil Steril **79 Suppl 3**: 1644-6.
- Morel, F., N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, V. Amice, M. T. Le Martelot, S. Roche, A. Valeri, V. Derrien, J. Amice and M. De Braekeleer (2004a). "Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature." Int J Androl **27**(3): 178-82.
- Morel, F., N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, A. Herry, V. Amice, J. Amice and M. De Braekeleer (2004b). "Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis." Int J Androl **27**(4): 200-12.
- Morel, F., N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, A. Herry, C. Marchetti, V. Lefebvre, B. Delobel, V. Amice, J. Amice and M. De Braekeleer (2004c). "Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report." Hum Reprod **19**(10): 2227-30.
- Morel, F., F. Fellmann, C. Roux and J. L. Bresson (2001). "Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X),t(X:Y)(qter-->p22::q11-->qter) carrier." Cytogenet Cell Genet **92**(1-2): 63-8.
- Morel, F., B. Laudier, F. Guerif, M. L. Couet, D. Royere, C. Roux, J. L. Bresson, V. Amice, M. De Braekeleer and N. Douet-Guilbert (2007). "Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization." Hum Reprod **22**(1): 136-41.
- Morel, F., C. Roux and J. L. Bresson (1999). "Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47,XYY men." Arch Androl **43**(1): 27-36.
- Morris, I. D., S. Ilott, L. Dixon and D. R. Brison (2002). "The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development." Hum Reprod **17**(4): 990-8.
- Morris, J. K., E. Alberman, C. Scott and P. Jacobs (2008). "Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing?" Eur J Hum Genet **16**(2): 163-70.
- Moustafa, M. H., R. K. Sharma, J. Thornton, E. Mascha, M. A. Abdel-Hafez, A. J. Thomas, Jr. and A. Agarwal (2004). "Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility." Hum Reprod **19**(1): 129-38.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Muratori, M., P. Piomboni, E. Baldi, E. Filimberti, P. Pecchioli, E. Moretti, L. Gambera, B. Baccetti, R. Biagiotti, G. Forti and M. Maggi (2000). "Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm." J Androl **21**(6): 903-12.
- Naether, O. G., K. Rudolf, R. Fischer, V. Baukloh, C. Schmidt and K. Held (2008). "Pregnancy after vitrification of pronuclear stage oocytes biopsied for polar body aneuploidy screening." Reprod Biomed Online **16**(2): 268-70.
- Nagy, Z. P., J. Liu, H. Joris, G. Verheyen, H. Tournaye, M. Camus, M. C. Derde, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1995). "The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters." Hum Reprod **10**(5): 1123-9.

- Nasr-Esfahani, M. H., M. Salehi, S. Razavi, M. Anjomshoa, S. Rozbahani, F. Moulavi and M. Mardani (2005). "Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI." *Reprod Biomed Online* **11**(2): 198-205.
- Nielsen, J. and M. Wohler (1991). "Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark." *Hum Genet* **87**(1): 81-3.
- Nielsen, P. E., M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt (1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide." *Science* **254**(5037): 1497-500.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 21-32.
- Oates, R. D., S. Silber, L. G. Brown and D. C. Page (2002). "Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI." *Hum Reprod* **17**(11): 2813-24.
- O'Brien, J. and A. Zini (2005). "Sperm DNA integrity and male infertility." *Urology* **65**(1): 16-22.
- Olive, P. L., D. Wlodek and J. P. Banath (1991). "DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis." *Cancer Res* **51**(17): 4671-6.
- Ostermeier, G. C., D. J. Dix, D. Miller, P. Khatiri and S. A. Krawetz (2002). "Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men." *Lancet* **360**(9335): 772-7.
- Ozmen, B., N. Koutlaki, M. Youssry, K. Diedrich and S. Al-Hasani (2007). "DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety." *Reprod Biomed Online* **14**(3): 384-95.
- Page, S. L., J. C. Shin, J. Y. Han, K. H. Choo and L. G. Shaffer (1996). "Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation." *Hum Mol Genet* **5**(9): 1279-88.
- Painter, T. S. (1921). "The Y-Chromosome in Mammals." *Science* **53**(1378): 503-504.
- Painter, T. S. (1923). "Further Observations on the Sex Chromosomes of Mammals." *Science* **58**(1500): 247-248.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." *Lancet* **340**(8810): 17-8.
- Patrat, C., T. Bienvu, L. Janny, A. K. Faure, P. Fauque, I. Aknin-Seifer, C. Davy, N. Thiounn, P. Jouannet and R. Levy (2008). "Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men." *Fertil Steril*. 2008 Dec 3. [Epub ahead of print]
- Patsalis, P. C. (2007). "Complex chromosomal rearrangements." *Genet Couns* **18**(1): 57-69.
- Pearson, P. L. and M. Bobrow (1970). "Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male." *J Reprod Fertil* **22**(1): 177-9.
- Pearson, P. L., M. Bobrow and C. G. Vosa (1970). "Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei." *Nature* **226**(5240): 78-80.
- Pellestor, F., B. Andreo, K. Taneja and B. Williams (2003). "PNA on human sperm: a new approach for in situ aneuploidy estimation." *Eur J Hum Genet* **11**(4): 337-41.
- Pellestor, F., A. Girardet, G. Lefort, B. Andreo and J. P. Charlieu (1995a). "PRINS as a method for rapid chromosomal labeling on human spermatozoa." *Mol Reprod Dev* **40**(3): 333-7.
- Pellestor, F., A. Girardet, G. Lefort, B. Andreo and J. P. Charlieu (1995b). "Use of the primed in situ labelling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21, X and Y." *Hum Genet* **95**(1): 12-7.
- Perrin, A., E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel (2008). "DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality." *Fertil Steril*. 2008 Aug 13. [Epub ahead of print]

- Perticarari, S., G. Ricci, R. Boscolo, M. De Santis, G. Pagnini, M. Martinelli and G. Presani (2008). "Fas receptor is not present on ejaculated human sperm." Hum Reprod **23**(6): 1271-9.
- Pettenati, M. J., P. N. Rao, M. C. Phelan, F. Grass, K. W. Rao, P. Cosper, A. J. Carroll, F. Elder, J. L. Smith, M. D. Higgins and et al. (1995). "Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases." Am J Med Genet **55**(2): 171-87.
- Pinkel, D., T. Straume and J. W. Gray (1986). "Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization." Proc Natl Acad. Sci USA **83**: 2934-38.
- Plymate, S. R., W. J. Bremner and C. A. Paulsen (1976). "The association of D-group chromosomal translocations and defective spermatogenesis." Fertil Steril **27**(2): 139-44.
- Pons-Rejraji, H., B. Sion, F. Saez, F. Brugnon, L. Janny and G. Grizard (2009). "[Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility.]" Gynecol Obstet Fertil **37**(6): 529-35.
- Poynter, F. (1968). "History of artificial insemination." In L. G. Stevenson, & R. P. Multhau (Eds.), Medicine, science, and culture: Historical essays in honor of Oswei Temkin. Baltimore: The Johns Hopkins Press.: 97-113.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008). "Evaluation of the azoospermic male." Fertil Steril **90**(5 Suppl): S74-7.
- Prigent, C., R. Gill, M. Trower and P. Sanseau (1999). "In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to Drosophila Aurora using the new tool: EST Blast." In Silico Biol **1**(2): 123-8.
- Quenesson, I., A. Girardet, L. Coignet, B. Andreo, G. Lefort, J. P. Charlieu and F. Pellestor (1995). "[Direct analysis of the frequency of disomy in human sperm using the PRINS technique]." Ann Genet **38**(2): 85-9.
- Ravel, C., S. Chantot-Bastaraud, K. McElreavey and J. P. Siffroi (2006). "[Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility]." Gynecol Obstet Fertil **34**(10): 885-93.
- Ravel, C. and J. P. Siffroi (2009). "[Y chromosome structural abnormalities and Turner's syndrome.]" Gynecol Obstet Fertil **37**(6): 511-8.
- Reijo, R., R. Alagappan, O. Patrizio and D. C. Page (1996). "Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome." Lancet **347**: 1290-93.
- Reijo, R., T. Y. Lee, P. Salo, R. Alagappan, L. G. Brown, M. Rosenberg, S. Rozen, T. Jaffe, D. Straus, O. Hovatta and et al. (1995). "Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene." Nat Genet **10**(4): 383-93.
- Rhoades, M. M. (1933). "A Cytogenetical Study of a Reciprocal Translocation in Zea." Proc Natl Acad Sci U S A **19**(12): 1022-31.
- Robbins, W., R. Segraves, D. Pinkel and A. Wyrobek (1993). "Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y." Am J Hum Genet **52**: 799-807.
- Robertson, W. R. B. (1916). "Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of tettigidae and acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in acrididae, locustidae, and gryllidae: chromosomes and variation." J Morph **27**(2): 179-331.
- Rolf, C., J. Gromoll, M. Simoni and E. Nieschlag (2002). "Natural transmission of a partial AZFb deletion of the Y chromosome over three generations: case report." Hum Reprod **17**(9): 2267-71.
- Ron-el, R., H. Nachum, A. Herman, A. Golan, E. Caspi and Y. Soffer (1991). "Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality." Fertil Steril **55**(2): 338-44.

- Roux, C., C. Tripogney, C. Joanne and J. L. Bresson (2004). "[Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins)]." Gynecol Obstet Fertil **32**(9): 792-8.
- Roux, C., C. Tripogney, F. Morel, C. Joanne, F. Fellmann, M. C. Clavequin and J. L. Bresson (2005). "Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): 291-6.
- Roze, V., J. L. Bresson and F. Fellmann (2007). "Quantitative PCR technique for the identification of microrearrangements of the AZFc region." J Assist Reprod Genet **24**(6): 241-8.
- Sailer, B. L., L. K. Jost and D. P. Evenson (1995). "Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay." J Androl **16**(1): 80-7.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P. G. Bianchi and U. Bianchi (1999a). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." Rev Reprod **4**(1): 31-7.
- Sakkas, D., O. Moffatt, G. C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi and D. Bizzaro (2002). "Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis." Biol Reprod **66**(4): 1061-7.
- Sandberg, A. A., G. F. Koepf, T. Ishihara and T. S. Hauschka (1961). "An XYY human male." Lancet **2**(7200): 488-9.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santolo, J., V. Catala and J. Badenas (1987). "Chromosomal abnormalities and IVF." J. Egozcue (Ed.), Cellular aspects of in vitro fertilization. Springer, Leiola: 63-72.
- SaoPedro, S. L., R. Fraietta, D. Spaine, C. S. Porto, M. Srougi, A. P. Cedenho and M. C. Avellar (2003). "Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men." Braz J Med Biol Res **36**(6): 787-93.
- Saxena, R., J. W. de Vries, S. Repping, R. K. Alagappan, H. Skaletsky, L. G. Brown, P. Ma, E. Chen, J. M. Hoovers and D. C. Page (2000). "Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome." Genomics **67**(3): 256-67.
- Schoysman, R., P. Vanderzwalmen, M. Nijs, L. Segal, G. Segal-Bertin, L. Geerts, E. van Roosendaal and D. Schoysman (1993). "Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa." Lancet **342**(8881): 1237.
- Sen, S., H. Zhou and R. A. White (1997). "A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines." Oncogene **14**(18): 2195-200.
- Sergerie, M., G. Bleau, R. Teule, M. Daudin and L. Bujan (2005a). "[Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]." Gynecol Obstet Fertil **33**(3): 89-101.
- Sergerie, M., G. Laforest, L. Bujan, F. Bissonnette and G. Bleau (2005b). "Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility." Hum Reprod **20**(12): 3446-51.
- Sharlip, I. D., J. P. Jarow, A. M. Belker, L. I. Lipshultz, M. Sigman, A. J. Thomas, P. N. Schlegel, S. S. Howards, A. Nehra, M. D. Damewood, J. W. Overstreet and R. Sadovsky (2002). "Best practice policies for male infertility." Fertil Steril **77**(5): 873-82.
- Shi, Q. and R. H. Martin (2001). "Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men." Reproduction **121**(5): 655-66.
- Silber, S. J., Z. P. Nagy, J. Liu, H. Godoy, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1994). "Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration." Hum Reprod **9**(9): 1705-9.

- Simoni, M., E. Bakker and C. Krausz (2004). "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004." Int J Androl **27**(4): 240-9.
- Simoni, M., A. Kamischke and E. Nieschlag (1998). "Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control." Hum Reprod **13**(7): 1764-8.
- Singh, N. P., D. B. Danner, R. R. Tice, M. T. McCoy, G. D. Collins and E. L. Schneider (1989). "Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm." Exp Cell Res **184**(2): 461-70.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res **175**(1): 184-91.
- Skaletsky, H., T. Kuroda-Kawaguchi, P. J. Minx, H. S. Cordum, L. Hillier, L. G. Brown, S. Repping, T. Pyntikova, J. Ali, T. Bieri, A. Chinwalla, A. Delehaunty, K. Delehaunty, H. Du, G. Fewell, L. Fulton, R. Fulton, T. Graves, S. F. Hou, P. Latrielle, S. Leonard, E. Mardis, R. Maupin, J. McPherson, T. Miner, W. Nash, C. Nguyen, P. Ozersky, K. Pepin, S. Rock, T. Rohlfing, K. Scott, B. Schultz, C. Strong, A. Tin-Wollam, S. P. Yang, R. H. Waterston, R. K. Wilson, S. Rozen and D. C. Page (2003). "The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes." Nature **423**(6942): 825-37.
- Speit, G., M. Vasquez and A. Hartmann (2009). "The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity." Mutat Res **681**(1): 3-12.
- Steele, E. K., N. McClure, R. J. Maxwell and S. E. Lewis (1999). "A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia." Mol Hum Reprod **5**(9): 831-5.
- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." Lancet **2**(8085): 366.
- Stirrat, G. M. (1990). "Recurrent miscarriage." Lancet **336**(8716): 673-5.
- Stouffs, K., H. Tournaye, J. Van der Elst, P. Haentjens, I. Liebaers and W. Lissens (2008). "Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting?" Hum Reprod **23**(5): 1193-9.
- Sumner, A. T., H. J. Evans and R. A. Buckland (1971). "New technique for distinguishing between human chromosomes." Nat New Biol **232**(27): 31-2.
- Sun, C., H. Skaletsky, B. Birren, K. Devon, Z. Tang, S. Silber, R. Oates and D. C. Page (1999). "An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y." Nat Genet **23**(4): 429-32.
- Sun, F., E. Ko and R. H. Martin (2006). "Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?" Reprod Biol Endocrinol **4**: 1.
- Sundequist, U. and E. Hellstrom (1969). "Transmission of 47, XYY karyotype?" Lancet **2**(7634): 1367.
- Sutherland, G. R., D. F. Callen and R. J. Gardner (1995). "Paracentric inversions do not normally generate monocentric recombinant chromosomes." Am J Med Genet **59**(3): 390-2.
- Tachdjian, G., N. Frydman, N. Morichon-Delvallez, A. L. Du, R. Fanchin, M. Vekemans and R. Frydman (2003). "Reproductive genetic counselling in non-mosaic 47,XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis: Case report and review." Hum Reprod **18**(2): 271-5.
- Taneja, K. L., E. A. Chavez, J. Coull and P. M. Lansdorp (2001). "Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells." Genes Chromosomes Cancer **30**(1): 57-63.
- Tang, C. J., C. Y. Lin and T. K. Tang (2006). "Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis." Dev Biol **290**(2): 398-410.

- Tavalaee, M., S. Razavi and M. H. Nasr-Esfahani (2009). "Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome." Fertil Steril **91**(4): 1119-26.
- Tejada, R. I., J. C. Mitchell, A. Norman, J. J. Marik and S. Friedman (1984). "A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence." Fertil Steril **42**(1): 87-91.
- Templado, C., F. Vidal, J. Navarro, S. Marina and J. Egozcue (1984). "Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation." Hum Genet **67**(2): 162-5.
- Terzoli, G., F. Lalatta, A. Lobbiani, G. Simoni and G. Colucci (1992). "Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting." Fertil Steril **58**(4): 821-2.
- Tesarik, J., E. Greco and C. Mendoza (2004). "Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation." Hum Reprod **19**(3): 611-5.
- Tesarik, J., C. Mendoza and J. Testart (1995). "Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes." N Engl J Med **333**(8): 525.
- Testart, J. and R. Frydman (1982). "[Full-term delivery after intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **11**(7): 855-9.
- Therman, E., B. Susman and C. Denniston (1989). "The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations." Ann Hum Genet **53**(Pt 1): 49-65.
- Thomas, N. S., V. Bryant, V. Maloney, A. E. Cockwell and P. A. Jacobs (2008). "Investigation of the origins of human autosomal inversions." Hum Genet **123**(6): 607-16.
- Thonneau, P., J. Patureau, C. Moyse, S. Marchand, A. Tallec, M. L. Ferial, J. Lansac, P. Lopes, J. M. Tabaste and B. Ducot (1992). "[Infertility in France: results of a multicenter survey in three French departments (1988-1989)]." Contracept Fertil Sex (Paris) **20**(1): 27-32.
- Thundathil, J., E. de Lamirande and C. Gagnon (2003). "Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation." Biol Reprod **68**(4): 1291-8.
- Tiepolo, L. and O. Zuffardi (1976). "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm." Hum Genet **34**(2): 119-24.
- Tjio, H. J. and A. Levan (1956). "The chromosome numbers of man." Hereditas **42**: 1-6.
- Tomsu, M., V. Sharma and D. Miller (2002). "Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters." Hum Reprod **17**(7): 1856-62.
- Tournaye, H., M. Camus, M. Vandervorst, Z. Nagy, H. Joris, A. Van Steirteghem and P. Devroey (1997b). "Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection." Int J Androl **20 Suppl 3**: 69-73.
- Tournaye, H., G. Verheyen, P. Nagy, F. Ubaldi, A. Goossens, S. Silber, A. C. Van Steirteghem and P. Devroey (1997a). "Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients?" Hum Reprod **12**(1): 80-6.
- Tremellen, K. (2008). "Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective." Hum Reprod Update **14**(3): 243-58.
- Tseng, T. C., S. H. Chen, Y. P. Hsu and T. K. Tang (1998). "Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators." DNA Cell Biol **17**(10): 823-33.
- Van Assche, E., M. Bonduelle, H. Tournaye, H. Joris, G. Verheyen, P. Devroey, A. Van Steirteghem and I. Liebaers (1996). "Cytogenetics of infertile men." Hum Reprod **11 Suppl 4**: 1-24; discussion 25-6.

- Van Dyke, D. L., L. Weiss, J. R. Roberson and V. R. Babu (1983). "The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age." *Am J Hum Genet* **35**(2): 301-8.
- Van Steirteghem, A., I. Liebaers and M. Camus (1999). "[Genetic male infertility]." *Rev Prat* **49**(12): 1309-13.
- Van Steirteghem, A. C., J. Liu, H. Joris, Z. Nagy, C. Janssenswillen, H. Tournaye, M. P. Derde, E. Van Assche and P. Devroey (1993). "Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles." *Hum Reprod* **8**(7): 1055-60.
- Vanderzwalmen, P., H. Zech, A. Birkenfeld, M. Yemini, G. Bertin, B. Lejeune, M. Nijs, L. Segal, A. Stecher, B. Vandamme, E. van Roosendaal and R. Schoysman (1997). "Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation." *Hum Reprod* **12**(6): 1203-13.
- Vayena, E., P. J. Rowe and P. D. Griffin (2002). "Current practices and controversies in assisted reproduction. Geneva." *WHO*.
- Vegetti, W., E. Van Assche, A. Frias, G. Verheyen, M. M. Bianchi, M. Bonduelle, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2000). "Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men." *Hum Reprod* **15**(2): 351-65.
- Velez de la Calle, J. F., A. Muller, M. Walschaerts, J. L. Clavere, C. Jimenez, C. Wittemer and P. Thonneau (2008). "Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study." *Fertil Steril* **90**(5): 1792-9.
- Vendrelly, E., A. Kalfon, G. Arvis and P. Merviel (1998). "Exploration clinique et biologique d'une infertilité masculine." *Dans : Salat-Baroux J, Mandelbaum J, Merviel P, Antoine J-M. L'ICSI Le traitement moderne des stérilités masculines. Masson, Paris.*: 41-62.
- Vergnaud, G., D. C. Page, M. C. Simmler, L. Brown, F. Rouyer, B. Noel, D. Botstein, A. de la Chapelle and J. Weissenbach (1986). "A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization." *Am J Hum Genet* **38**(2): 109-24.
- Vialard, F., A. Delanete, P. Clement, B. Simon-Bouy, F. X. Aubriot and J. Selva (2007). "Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion." *Fertil Steril* **87**(2): 418 e1-5.
- Vialard, F., D. M. Gomes, I. Hammoud, M. Bergere, R. Wainer, M. Bailly, R. Lombroso and J. Selva (2008). "Stability of aneuploidy rate in polar bodies in two cohorts from the same patient." *Reprod Biomed Online* **17**(2): 213-9.
- Vialard, F., D. Molina Gomes, J. Roume, A. Podbiol, M. Bailly, I. Hammoud, J. M. Dupont, P. de Mazancourt and J. Selva (2009). "Case report: Meiotic segregation in spermatozoa of a 46,X,t(Y;10)(q11.2;p15.2) fertile translocation carrier." *Reprod Biomed Online* **18**(4): 549-54.
- Vialard, F. and F. Pellestor (2008). "[Benefit of human gamete cytogenetics: results and perspectives]." *Pathol Biol (Paris)* **56**(6): 388-99.
- Vidal, F., C. Templado, J. Navarro, S. Marina and J. Egozcue (1982). "Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier." *Int J Androl* **5**(1): 21-6.
- Viville, S., R. Mollard, M. L. Bach, C. Falquet, P. Gerlinger and S. Warter (2000). "Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report." *Hum Reprod* **15**(12): 2563-6.
- Vogt, P. H., A. Edelmann, P. Hirschmann and M. R. Kohler (1995). "The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis." *Reprod Fertil Dev* **7**(4): 685-93.

- Vogt, P. H., A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiesewetter, F. M. Kohn, W. B. Schill, S. Farah, C. Ramos, M. Hartmann, W. Hartschuh, D. Meschede, H. M. Behre, A. Castel, E. Nieschlag, W. Weidner, H. J. Grone, A. Jung, W. Engel and G. Haidl (1996). "Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11." *Hum Mol Genet* **5**(7): 933-43.
- Vollrath, D., S. Foote, A. Hilton, L. G. Brown, P. Beer-Romero, J. S. Bogan and D. C. Page (1992). "The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions." *Science* **258**(5079): 52-9.
- Vozdova, M., E. Oracova, V. Horinova and J. Rubes (2008). "Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18)." *Hum Reprod* **23**(3): 581-8.
- Walker, A. P. and M. Bocian (1987). "Partial duplication 8q12----q21.2 in two sibs with maternally derived insertional and reciprocal translocations: case reports and review of partial duplications of chromosome 8." *Am J Med Genet* **27**(1): 3-22.
- Wallerand, H., S. Bernardini, E. Chabannes and H. Bittard (2003). "[Genetic cause of male infertility and molecular biology]." *Prog Urol* **13**(4): 560-3.
- Warburton, D. (1991). "De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints." *Am J Hum Genet* **49**(5): 995-1013.
- White, W. M., E. D. Kim and J. D. Mobley III (2007). "Varicocele." [www.emedicine.com](http://www.emedicine.com).
- Wiland, E., C. J. Hobel, D. Hill and M. Kurpisz (2008). "Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report." *Prenat Diagn* **28**(1): 36-41.
- World Health Organization (1999). "WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction." *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Worsham, M. J., D. A. Miller, J. M. Devries, A. R. Mitchell, V. R. Babu, V. Surli, L. Weiss and D. L. Van Dyke (1989). "A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion: phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres." *Am J Hum Genet* **44**(1): 115-23.
- Wykes, S. M., D. W. Visscher and S. A. Krawetz (1997). "Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa." *Mol Hum Reprod* **3**(1): 15-9.
- Xu, M., J. Xiao, J. Chen, J. Li, L. Yin, H. Zhu, Z. Zhou and J. Sha (2003). "Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12." *Mol Hum Reprod* **9**(1): 9-17.
- Yan, X., L. Cao, Q. Li, Y. Wu, H. Zhang, H. Saiyin, X. Liu, X. Zhang, Q. Shi and L. Yu (2005). "Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis." *Genes Cells* **10**(6): 617-26.
- Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B.J. Rogers (1976). "The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa." *Biol Reprod* **15**(4):471-6.
- Yunis, J. J., L. Roldan, W. G. Yasmineh and J. C. Lee (1971). "Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes." *Nature* **231**(5304): 532-3.
- Zenteno, J. C., M. Lopez, C. Vera, J. P. Mendez and S. Kofman-Alfaro (1997). "Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity." *Hum Genet* **100**(5-6): 606-10.
- Zheng, Y., J. P. Bonde, E. Ernst, J. T. Mortensen and J. Egense (1997). "Is semen quality related to the year of birth among Danish infertility clients?" *Int J Epidemiol* **26**(6): 1289-97.
- Zini, A., J. M. Boman, E. Belzile and A. Ciampi (2008). "Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis." *Hum Reprod* **23**(12): 2663-8.