

# Estimation du taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes épидидymaires prélevés en vue d'ICSI chez des hommes à caryotype normal

Christophe TRIPOGNEY<sup>3</sup>, Christophe ROUX<sup>1,3</sup>, Oxana BLAGOSKLONOVA<sup>3</sup>,  
Florence FELLMANN<sup>1,3</sup>, Hugues BITTARD<sup>2,3</sup>, Jean-Luc BRESSON<sup>1,3</sup>

1 Service de Génétique, Histologie, Biologie du Développement et de la Reproduction, CECOS.

2 Service d'Urologie, Andrologie. 3 EA n°3185 : Génétique et Reproduction, CHU Saint Jacques, Besançon

## RESUME

Depuis une dizaine d'années de nombreux travaux ont tenté d'estimer par FISH le taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes humains éjaculés. La majorité des études réalisées chez l'homme à caryotype normal montrent que le taux de disomies par paire chromosomique se situe entre 0,15 et 0,30 %. Le but de notre travail a été d'évaluer le taux d'aneuploïdies de spermatozoïdes épидидymaires prélevés chirurgicalement lors de techniques MESA (Microscopical Epididymal Sperm Aspiration) en vue d'AMP chez 5 patients présentant une azoospermie excrétoire et pour lesquels le bilan génétique habituel (caryotype, recherche de mutations du gène CFTR et de microdélétions du chromosome Y) n'a pas révélé de particularité.

La technique de triple FISH X, Y, 8 a été appliquée sur des étalements de spermatozoïdes à noyaux préalablement décondensés ; 18013 spermatozoïdes épидидymaires et 20000 spermatozoïdes issus de patients à spermogramme normal ont été analysés.

Les taux de disomies observés pour la population de spermatozoïdes épидидymaires ne diffèrent pas significativement de ceux du groupe témoin de spermatozoïdes éjaculés. Des différences ponctuelles peuvent être observées entre un patient et le groupe témoins, mais elles ne sont pas statistiquement significatives.

L'utilisation de spermatozoïdes épидидymaires en ICSI, chez des patients présentant une azoosper-

mie excrétoire sans cause génétique apparente, ne semble pas présenter un risque accru de transmission de déséquilibre chromosomique à l'enfant.

**Mots clés :** aneuploïdies, spermatozoïdes épидидymaires, FIV, ICSI, FISH

## I. INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'années, l'ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) a permis la prise en charge d'hommes atteints de troubles sévères de la fertilité. Des naissances ont été obtenues chez des couples où l'homme présentait une azoospermie, en utilisant des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement dans l'épididyme (MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration [24]) ou dans le testicule (TESE : Testicular Sperm Extraction [21]), les résultats, en terme de taux de fécondation et de grossesse, étant comparables à ceux obtenus avec des spermatozoïdes éjaculés d'hommes à sperme déficient [16].

Correspondance :

Dr Christophe Tripogney - Service de Génétique, Histologie, Biologie du Développement et de la Reproduction. Hôpital Saint Jacques, place Saint Jacques 25000 Besançon - Tel 03.81.21.86.98 - Fax 03.81.66.56.15 - Email christophe.tripogney@orange.fr

Une étude récente [3] a montré une augmentation significative des taux d'aneuploïdies des gonosomes et des autosomes en diagnostic prénatal après ICSI par rapport à l'ensemble des examens de DPN (Diagnostic Prénatal) chromosomique. Cette augmentation pourrait être due à l'utilisation de spermatozoïdes prélevés chirurgicalement chez des patients infertiles [3].

De nombreux travaux ont tenté d'estimer par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) le taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes humains éjaculés. La majorité des études réalisées chez des hommes à caryotype et spermogramme normaux montrent que le taux de disomies par paire chromosomique se situe entre 0,15 et 0,30% [5, 13].

D'autres études ont porté sur la recherche de corrélations entre le taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes et les anomalies du spermogramme (mobilité, morphologie, mortalité...). Si certains travaux ont conclu à une augmentation du taux d'aneuploïdies pour les chromosomes analysés chez des hommes à spermogramme anormal par rapport à des témoins avec spermogramme normal [1, 4, 8, 11, 18, 20, 22, 23, 25, 26], d'autres n'ont pas retrouvé de différences [7, 12, 15]. Ces discordances semblent dues à la variété des approches méthodologiques et à des interprétations différentes des valeurs de normalité des examens de spermes. Deux travaux [13, 14] réalisés chez des hommes consultant pour infertilité du couple, étudiant de façon indépendante les paramètres du spermogramme, concluent qu'il n'existe pas de relation entre la fréquence des disomies et la nécrospermie, la mobilité, la numération et la tératospermie ; en revanche, ils mettent en évidence une relation entre le taux de disomies et le degré de maturité nucléaire des spermatozoïdes apprécié par la coloration au bleu d'aniline.

L'ensemble de ces données semble indiquer que le risque de transmission d'une anomalie chromosomique à l'enfant à naître serait plus élevé chez les patients infertiles candidats à l'ICSI que dans la population générale.

Les résultats obtenus en FISH sur spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles justifient l'intérêt d'estimer les taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement chez des patients infertiles. Le but de ce travail a été d'évaluer le taux d'aneuploïdies de spermatozoïdes épидидymaires prélevés chez des patients atteints d'azoospermie obstructive, pour lesquels le diagnostic d'agénésie bilatérale des canaux déférents a été éliminé et pour lesquels le bilan cytogénétique (caryotype, recherche de microdélétions du chromosome Y) était sans particularité.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Patients

Les spermatozoïdes épидидymaires ont été obtenus par MESA chez 5 patients présentant une azoospermie de type excrétoire (Tableau 1) et pour lesquels le bilan génétique pré-AMP (caryotype constitutionnel (sur cellules lymphocytaires), recherche de mutations du gène CFTR par le kit CF-OLA (Perkin-Elmer : recherche des trente et une mutations principales) et de microdélétions du chromosome Y par PCR multiplex d'après Simoni *et al.* [22]) n'a révélé aucune particularité.

Les échantillons de spermatozoïdes épидидymaires ont été conditionnés pour l'ICSI et/ou cryoconservés. Une partie des échantillons non utilisés pour l'AMP a été conditionnée pour la FISH. Quatre hommes à spermogramme normal selon les critères de l'OMS [28] ont servi de témoins pour cette étude.

Tableau 1 : Caractéristiques des patients.

Patient	Age	Examen morphologique des organes génitaux externes	Cause probable de l'azoospermie excrétoire	Histologie testiculaire
1	39	Volume testiculaire augmenté	post traumatique	Spermatogenèse complète
2	37	Testicule unique, volume testiculaire augmenté	malformative	Spermatogenèse complète
3	33	Normal	secondaire post infectieuse	Non disponible
4	50	Normal	secondaire post infectieuse	Sclérohyalinisation des tubes séminifères ; présence de tubes avec spermatogenèse complète
5	32	Normal, opération d'une malformation de la verge	malformative	Début de sclérohyalinisation ; majorité des tubes avec spermatogenèse complète

## 2. Préparation des prélèvements de sperme pour la FISH

Les prélèvements ont été lavés par centrifugation à 800g dans du PBS puis étalés sur lame et fixés au liquide de Carnoy (3/4 méthanol ; 1/4 acide acétique) pendant une nuit. La décondensation des têtes des spermatozoïdes (papaine (1,25%), DTET (0,16%) et DMSO (0,5%) dans du TRIS HCl à pH=8.6) a été réalisée sous contrôle microscopique [13].

## 3. Technique de FISH

Pour la technique de FISH, des sondes pour les chromosomes X, Y et 8 (X : DXZ1, M. Morris, Genève ; Y : pHY2.1, J.H. Cooke, Edinburgh ; 8 : D8Z2, American type culture collection, Rockville, Maryland, USA) ont été préalablement marquées par Nick Translation (Kit Gibco BRL) à la biotine-7-déoxyadénosine triphosphate (sonde D8Z2), à la fluorescéine-12-déoxyuridine triphosphate (sonde pHY2.1), ou à la digoxygénine-11-déoxyuridine triphosphate (sonde DXZ1).

L'hybridation a été réalisée comme décrit précédemment [13] : dénaturation de l'ADN chromosomique à 75°C dans un bain de formamide à 70% neutralisé à pH 7,0 dans du SSC 2X pendant 3 minutes, rinçage des lames dans des bains d'éthanol à titre croissant (70%, 80%, 90% et 100%) à 4°C pendant 3 minutes par bain, dénaturation thermique des sondes à 75°C pendant 5 minutes, puis hybridation par dépôt des solutions de sondes entre lame et lamelle, pendant une nuit, à 37°C, en chambre humide. Le lendemain, rinçage des lames dans une solution de formamide 50% dans du SSC 2X à 42,5°C pendant 15 minutes, puis dans du SSC 0,1% à 60°C pendant 10 minutes.

L'immunodétection des sondes marquées à la digoxygénine et à la biotine a été réalisée en traitant les lames par l'anti-digoxygénine TRITC (DXZ1) ou par la séquence avidine AMCA, antiavidine biotinilée, avidine AMCA (D8Z2). Les lames ont enfin été contre-colorées avec une solution contenant du glycérol, un agent *antifading* (Vector Laboratories) et du iodure de propidium (Sigma).

## 4. Critères de comptage

Les lames ont été observées au microscope à fluorescence (Zeiss Axiophot) équipé des combinaisons de filtres adaptées aux fluorochromes utilisés. L'interprétation des spots est réalisée en tenant compte des critères suivants :

- les spermatozoïdes mal identifiés (perte totale du flagelle, altération morphologique...), les têtes de spermatozoïdes superposées, les spermatozoïdes non décondensés ou trop décondensés sont exclus du comptage ;
- un spermatozoïde est compté disomique lorsque sont observés deux signaux comparables en brillance et diamètre et séparés d'au moins un diamètre de spot ;

- les spermatozoïdes non marqués avec une ou plusieurs sondes sont comptabilisés mais ne peuvent faire l'objet d'une interprétation du fait de l'impossibilité de faire la distinction entre nullisomie ou défaut d'hybridation.

## 5. Analyse statistique

Les valeurs observées pour les patients et les populations témoins ont été comparées en utilisant le test du chi<sup>2</sup>.

## III. RESULTATS

Pour les 5 patients, un total de 18013 spermatozoïdes épидидymaires a été analysé : 4780 pour le patient 1, 3751 pour le patient 2, 4451 pour le patient 3, 2378 pour le patient 4 et 3153 pour le patient 5 ; 5000 spermatozoïdes ont été analysés pour chaque sujet témoin.

Les taux d'hybridation observés sont supérieurs à 95% dans tous les cas et ne diffèrent pas significativement entre la population témoin et les spermatozoïdes épидидymaires.

Les résultats sont rapportés dans le Tableau 2. Les taux de disomies pour les chromosomes analysés ne diffèrent pas significativement pour la population de spermatozoïdes épидидymaires et les témoins. Des augmentations ponctuelles des taux de disomies sont cependant observés mais elles ne sont pas significatives.

## IV. DISCUSSION

L'analyse réalisée par FISH chez les cinq patients atteints d'azoospermie excrétoire, non associée à une agénésie bilatérale des canaux déférents, montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les taux de disomies au sein de la population de spermatozoïdes épидидymaires prélevés par MESA par rapport à une population de spermatozoïdes éjaculés témoins d'hommes à spermogramme et caryotype normaux.

Deux autres études de la littérature ont analysé l'équipement chromosomique de spermatozoïdes épидидymaires humains [2, 17]. Leurs résultats sont divergents. Bernardini *et al.* [2] ont constaté une augmentation modérée du taux de disomies des gonosomes de spermatozoïdes épидидymaires de 6 patients atteints d'ABCD par rapport aux spermatozoïdes éjaculés témoins. Cette augmentation est inférieure à celle observée au niveau de spermatozoïdes éjaculés de 22 patients atteints d'oligo-asthénospermie ou de spermatozoïdes testiculaires de 3 patients à infertilité inexplicquée. Les taux de disomies des autosomes (estimées avec les chromosomes 1 et 17) des spermatozoïdes épидидymaires ne diffèrent pas significativement de ceux observés pour les spermatozoïdes éjaculés témoins. Palermo *et al.* [17] ne mettent pas en évidence de différence significative entre les taux de disomies (chromosomes 18, 21, X et Y) au

**Tableau 2 : Analyse par triple FISH (X ; Y et 8) des spermatozoïdes épидидymaires de 5 patients atteints d'azoospermie excrétoire et des spermatozoïdes éjaculés de 4 témoins.**

	Lecture	X,8	Y,8	Y,Y,8	X,X,8	X,Y,8	X ou Y,8,8	Diploïdie	Sex Ratio Y/X	n
Patients	1	47,58	51,61	0,09	0,07	0,33	0,20	0,13	1,08	4780
	2	49,16	50,26	0,10	0,06	0,19	0,23	0,00	1,02	3251
	3	49,80	49,57	0,07	0,07	0,16	0,21	0,12	1,00	4451
	4	50,42	49,01	0,00	0,09	0,18	0,26	0,04	0,97	2378
	5	48,22	51,01	0,10	0,07	0,27	0,30	0,03	1,06	3153
	Moyenne	<b>49,04</b>	<b>50,29</b>	<b>0,07</b>	<b>0,07</b>	<b>0,23</b>	<b>0,24</b>	<b>0,07</b>	<b>1,03</b>	<b>18013</b>
Témoins	1	51,04	48,46	0,08	0,06	0,17	0,15	0,04	0,95	5000
	2	49,57	49,67	0,04	0,11	0,25	0,29	0,06	1,00	5000
	3	50,65	48,72	0,06	0,04	0,21	0,21	0,10	0,96	5000
	4	50,24	49,19	0,02	0,04	0,19	0,23	0,08	0,98	5000
	Moyenne	<b>50,37</b>	<b>49,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,21</b>	<b>0,22</b>	<b>0,07</b>	<b>0,97</b>	<b>20000</b>

La ligne lecture présente les différentes combinaisons de spots observées lors de l'analyse des lames, par exemple : X,8 correspond à l'observation d'un spot pour le chromosome X et d'un spot pour le chromosome 8. Les données sont présentées en % de spermatozoïdes présentant un signal.

n correspond au nombre total de spermatozoïdes analysés pour un patient.

niveau de spermatozoïdes épидидymaires de 8 patients atteints d'ABCD par rapport à une population de spermatozoïdes éjaculés de patients à spermogramme normal. En revanche, cette même étude confirme un taux de disomies plus élevé pour les spermatozoïdes testiculaires chez des patients atteints d'azoospermie sécrétoire.

Bien que notre travail soit réalisé chez des patients non atteints d'ABCD, les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux présentés par Palermo *et al.* [17]. La discordance avec les résultats de Bernardini *et al.* [2] peut s'expliquer par une approche méthodologique différente liée à l'utilisation de la double FISH (X, Y) au lieu de la triple FISH (X, Y, autosome). En effet, la double FISH ne permet pas de faire la distinction entre spermatozoïde disomique et diploïde, aussi peut-il y avoir un risque de surestimation des taux de disomies gonosomiques [5].

Trois autres études ont été réalisées en FISH sur des spermatozoïdes testiculaires de patients atteints d'azoospermie obstructive (patients atteints d'ABCD [9, 27] et patients pour lesquels le diagnostic n'est pas précisé [10]). Les trois concluent à une augmentation modérée des taux d'aneuploïdies au niveau des spermatozoïdes testiculaires.

Il est difficile d'expliquer ces taux plus importants mis en évidence au niveau des spermatozoïdes testiculaires d'hommes chez lesquels la spermatogenèse est normale par rapport aux spermatozoïdes épидидymaires prélevés chez des patients atteints d'azoospermie obstructive d'une part, et aux spermatozoïdes éjaculés de patients à spermogramme normal d'autre part. Levron *et al.* [9] ont émis l'hypothèse que cette différence pourrait être le fait d'un mécanisme de ségrégation des spermatozoïdes aneuploïdes à la sortie des tubes séminifères ou lors du transit épидидymaire.

La qualité des spermatozoïdes prélevés dans l'épидидyme ou le testicule de patients atteints d'azoospermie obstructi-

ve a également été appréhendée en mesurant la fragmentation de l'ADN par effet TUNEL. Un travail récent [19] a montré une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires présentant un ADN fragmenté par rapport à une population de spermatozoïdes éjaculés témoins (18,9% vs 6,2%) ; toutefois, cette différence disparaît lorsque l'analyse ne porte que sur la fraction des spermatozoïdes mobiles (0,4% vs 0,6%) sélectionnés pour une éventuelle utilisation en ICSI.

L'analyse des données du registre national FIVNAT [6] sur la période 1994-1998 a montré que l'utilisation en ICSI de sperme d'origine épидидymaire n'accroît pas les risques de fausse couche spontanée, d'interruption médicale de grossesse ou de malformations chromosomiques chez l'enfant à naître alors que ces risques sont accrus lors de la micro-injection de spermatozoïde testiculaire.

## REFERENCES

1. BERNARDINI L., MARTINI E., GERAEDTS J.P. et al. : Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in situ hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997, 3 : 431-438.
2. BERNARDINI L., GIANAROLI L., FORTINI D. et al. : Frequency of hyper- hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2165-2172.
3. BONDUELLE M., VAN ASSCHE E., JORIS H. et al. : Prenatal testing in ICSI pregnancies : incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2600-2614.
4. CALOGERO A.E., DE PALMA A., GRAZIOSO C. et al. : Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1172-1179.
5. DOWNIE S.E., FLAHERTY S.P., SWANN N.J., MATTIHEWS C.D. : Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997, 3 : 815-819.

6. Données personnelles (Etude FIVNAT : [http:// perso.wanadoo.fr/fivnat.fr/es33-res.htm](http://perso.wanadoo.fr/fivnat.fr/es33-res.htm)).
7. GUTTENBACH M., MARTINEZ-EXPOSITO M.J., MICHELMANN H.W., ENGEL W., SCHMID M. : Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 468-473.
8. LAHDETIE J., SAARI N., AJOENPAA-SAARI M., MYKKANEN J. : Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Med. Genet.*, 1997, 71 : 115-121.
9. LEVRON J., AVIRAM-GOLDRING A., MADGAR I., RAVIV G., BARKAI G., DOR J. : Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2001, 76 : 479-484.
10. MATEIZEL G., VERHEYEN E., VAN ASSCHE H., TOURNAYE H. LIEBAERS, VAN STEIRTEGHEM A. : FISH analysis of chromosome X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2249-2257.
11. MCINNES B., RADEMAKER A., GREENE C.A., KO E., BARCLAY L., MARTIN R.H. : Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 2787-2790.
12. MIHARU N., BEST R.G., YOUNG S.R. : Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 1994, 93 : 502-506.
13. MOREL F., MERCIER S., ROUX C., CLAVEQUIN M.C., BRESSON J.L. : Estimation of aneuploidy levels for 8, 15, 18, X and Y chromosomes in 97 human sperm samples using fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.*, 1997, 67 : 1134-1139.
14. MOREL F., MERCIER S., ROUX C., ELMRINI T., CLAVEQUIN M.C., BRESSON J.L. : Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil. Steril.*, 1998, 69 : 1122-1127.
15. MOREL F., ROUX C., BRESSON J.L. : Disomy frequency estimated by multicolour fluorescence in situ hybridization, degree of nuclear maturity and teratozoospermia in human spermatozoa. *Reproduction*, 2001, 121 : 783-789.
16. PALERMO G.D., SCHLEGEL P.N., HARIPRASHAD J.J. et al. : Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 741-748.
17. PALERMO G.D., COLOMBERO L.T., HARIPRASHAD J.J., SCHLEGEL P.N., ROSENWAKS Z. : Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 570-575.
18. PANG M.G., HOEGERMAN S.F., CUTICCHIA A.J. et al. : 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.
19. RAMOS L., KLEINGELD P., MEULEMAN E. et al. : Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 2002, 77 : 233-237.
20. RIVES N., SAINT CLAIR A., MAZURIER S. et al. : Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum. Genet.*, 1999, 105 : 266-272.
21. SCHOYSMAN R., VANDERZWALMEN P., NIJS M. et al. : Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 1993, 342 : 1237.
22. SIMONI M., BAKKER E., EURLINGS M.C. et al. : Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int. J. Androl.*, 1999, 22 : 292-299.
23. STORENG R.T., PLACHOT M., THEOPHILE D., MANDELBAUM J., BELAISCH-ALLART J., VEKEMANS M. : Incidence of sex chromosome abnormalities in spermatozoa from patients entering an IVF or ICSI protocol. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1998, 77 : 191-197.
24. TOURNAYE H., DEVROEY P., LIU J., NAGY Z., LISSENS W., VAN STEIRTEGHEM A. : Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection : a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil. Steril.*, 1994, 61 : 1045-1051.
25. USHIJIMA C., KUMASAKO Y., KIHAILE P.E., HIROTSURU K., UTSUNOMIYA T. : Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in situ hybridization. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1107-1111.
26. VEGETTI W., VAN ASSCHE E., FRIAS A. et al. : Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 351-365.
27. VIVILLE S., WARTER S., MEYER J.M. et al. : Histological and genetic analysis and risk assessment for chromosomal aberration after ICSI for patients presenting with CBAVD. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1613-1618.
28. WORLD HEALTH ORGANISATION : Laboratory Manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1992.

## ABSTRACT

### **Estimation of the aneuploidy rate in epididymal spermatozoa retrieved for ICSI in men with a normal karyotype**

**Christophe TRIPOGNEY, Christophe ROUX,  
Oxana BLAGOSKLONOVA, Florence FELLMANN,  
Hugues BITTARD, Jean-Luc BRESSON**

**Over the last ten years, fluorescent in situ hybridization in decondensed sperm nuclei has been used to study the chromosomal constitution of human spermatozoa. Studies have estimated that the disomy rate per chromosomal pairs is between 0.15% and 0.3%. The aim of this study was to evaluate the aneuploidy rate of human epididymal spermatozoa extracted from five men with obstructive azoosper-**

mia undergoing IVF. Genetic studies (karyotypes, Y micodeletion syndrome and mutation of the CFTR gene) did not reveal any abnormality.

Disomy frequencies were determined by X-Y-8 multicolour fluorescence in situ hybridisation on 18,013 epididymal spermatozoa and 20,000 spermatozoa from healthy donors (control group).

No significant difference was found between epididymal and ejaculated samples. However, isolated non-significant differences were observed between one of the patients and the control group.

In conclusion, the present findings suggests that there is no increased risk for de novo chromosomal aberrations after IVF therapy with epididymal spermatozoa of men with obstructive azoospermia.

**Key-Words:** *aneuploidy, epididymal spermatozoa, IVF, ICSI, FISH*