

# Apoptose et ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs de translocations

Anne LE DU<sup>1</sup>, Marc LELORC<sup>2</sup>, Nelly FRYDMAN<sup>1</sup>, Moncef BENKHALIFA<sup>3</sup>, Serge ROMANA<sup>2</sup>, Michel VEKEMANS<sup>2</sup>, René FRYDMAN<sup>4</sup>, Gérard TACHDJIAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service de Biologie et Génétique de la Reproduction, Hôpital Antoine Béchère, Clamart

<sup>2</sup>Département de Génétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris <sup>3</sup>ATL Recherche et Développement, Voisins le Bretonneux <sup>4</sup>Service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital Antoine Béchère, Clamart

## RESUME

Les hommes porteurs d'une translocation chromosomique produisent un pourcentage significatif de spermatozoïdes avec une combinaison déséquilibrée de la translocation chromosomique. Dans le but de déterminer une corrélation entre les anomalies chromosomiques et l'apoptose dans les spermatozoïdes humains, nous avons analysé la fragmentation de l'ADN spermatique et la ségrégation méiotique chez des hommes porteurs d'une translocation Robertsonienne (13;14). L'étude a été réalisée sur des échantillons de spermatozoïdes provenant de 12 hommes porteurs d'une translocation Robertsonienne (13;14) et de 9 hommes féconds ayant un caryotype normal. La ségrégation méiotique des chromosomes 13 et 14 a été analysée par hybridation *in situ* fluorescente double couleur avec des sondes d'ADN spécifiques des chromosomes 13 et 14. L'apoptose dans les spermatozoïdes a été analysée par la technique TUNEL *in situ*. L'étude de la ségrégation méiotique a montré une fréquence moyenne de 15,9% de spermatozoïdes déséquilibrés pour les chromosomes 13 et 14 chez les hommes porteurs de la translocation Robertsonienne (13;14) significativement différente de la fréquence moyenne de 1,3% observée dans la population contrôle ( $p=0,00016$ ). L'étude de l'apoptose a montré un pourcentage moyen de fragmentation de l'ADN spermatique significativement plus élevé chez les hommes porteurs de translocations (34,9 %) par rapport à la population contrôle (13,8 %) ( $p = 0,0036$ ). Cette augmentation de l'apoptose a été observée dans des spermatozoïdes où il existe une augmentation des déséquilibres chromosomiques pour les chromosomes 13 et 14 avec cependant une prédominance des formes équilibrées en comparaison au risque théorique de la ségrégation méiotique. Ces résultats suggèrent que l'apoptose pourrait intervenir comme mécanisme régulateur dans l'élimination des spermatozoïdes ayant un déséquilibre chromosomique chez les hommes porteurs d'une translocation chromosomique.

**Mots Clés :** apoptose, ségrégation méiotique, translocation, FISH, TUNEL

## I. INTRODUCTION

L'infertilité touche dans les pays industrialisés 15% des couples [5]. L'infertilité est d'origine strictement féminine dans 36% des cas, d'origine strictement masculine dans 21% des cas, d'origine mixte dans 25% des cas et inexplicée dans 18% des cas.

L'infertilité masculine est associée le plus souvent à des altérations des paramètres spermatiques. Les anomalies spermatiques peuvent être dues à des causes infectieuses, environnementales, traumatiques, malformatives et génétiques. Différentes étiologies génétiques de l'infertilité masculine ont été décrites telles que les mutations du gène CFTR, le syndrome de Klinefelter, les translocations chromosomiques et les microdélétions du chromosome Y. Chez les hommes infertiles, la fréquence des anomalies chromosomiques est augmentée [9]. Parmi ces anomalies chromosomiques, les translocations Robertsoniennes et les anomalies des gonosomes sont les plus fréquentes. Les hommes porteurs d'une translocation produisent un pourcentage significatif de spermatozoïdes avec une combinaison déséquilibrée de la translocation, à l'origine d'un risque plus ou moins important de déséquilibre pour leur descendance.

Correspondance :

Dr Anne LE DÛ - Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique à orientation Biologie et Génétique de la Reproduction, Hôpital Antoine Béchère, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart. France - Tel 33.1.45.37.46.79 - Fax 33.1.45.37.42.07 - Email [anne.ledu@abc.ap-hop-paris.fr](mailto:anne.ledu@abc.ap-hop-paris.fr)

L'étude cytogénétique des spermatozoïdes humains a été possible tout d'abord grâce à la méthode de fécondation hétérosécifique d'ovocytes de hamster par des spermatozoïdes humains [23]. Néanmoins, par fécondation hétérosécifique, le nombre de cellules analysées est généralement peu important. De plus, l'oligoasthénotéozoospermie (OAT) des patients souvent associée à la translocation chromosomique rend difficile la mise en œuvre de cette technique. Le développement des techniques d'hybridation *in situ* fluorescente avec des sondes chromosomiques permet d'analyser un nombre plus important de spermatozoïdes sans le biais de la fécondation [10]. L'étude cytogénétique des spermatozoïdes des hommes porteurs de translocation permet d'analyser les différents modes de ségrégation méiotique de la translocation et de déterminer les taux de spermatozoïdes équilibrés et déséquilibrés [7]. Ces études permettent une meilleure compréhension du processus méiotique et un conseil génétique plus précis pour les couples porteurs de translocation chromosomique désirant un enfant.

Actuellement, les mécanismes qui déterminent la qualité génétique des gamètes sont peu connus. Certains facteurs génétiques tels que l'apoptose peuvent être impliqués dans le processus méiotique dans les cellules germinales. Des études ont montré que l'apoptose constitue un des principaux mécanismes physiologiques de régulation durant la spermatogénèse chez les Mammifères [22, 25]. L'apoptose est déclenchée par différents stimuli et se traduit au niveau cellulaire par une activation d'une cascade enzymatique, la voie des caspases, endonucléases qui génèrent des fragments d'ADN double brin de 200 paires de bases, présentant des extrémités 3'-OH libres. L'apoptose dans le sperme humain peut ainsi être étudiée par la détection des fragments de l'ADN spermatique [26]. Chez la souris, des fragmentations de l'ADN sont physiologiquement présentes à certains stades de la spermatogénèse et ne sont plus observées lorsque la protamination est achevée [24]. La présence de coupures de l'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés serait le reflet d'une spermatogénèse anormale. Par la méthode TUNEL, une augmentation de spermatozoïdes avec ADN fragmenté est observée dans des populations d'homme infertiles [8, 11, 15, 26, 28].

L'étude de l'apoptose dans les testicules de verrats porteurs d'une translocation chromosomique (X;14) a montré une atteinte prépondérante des spermatocytes [14]. Etant donné que l'appariement des chromosomes transloqués apparaît normal, les auteurs suggèrent que l'atteinte du processus méiotique serait due à l'invalidation par la translocation d'un gène impliqué dans l'apoptose [14]. Dans un modèle souris porteurs de translocations Robertsoniennes, Eaker et al. [4] ont montré une corrélation entre l'apoptose et les anomalies chromosomiques dans les spermatocytes, suggérant un rôle de l'apoptose pour l'élimination des cellules germinales anormales. Récemment, Modi et al. [18] ont observé une augmentation de l'apoptose des cellules germinales par la technique TUNEL dans les gonades fœtales humaines avec aneuploidies des chromosomes sexuels. Les translocations chromosomiques chez l'Homme sont

responsables de la formation de gamètes déséquilibrés significativement plus importante que la population avec un caryotype normal. Ces translocations chromosomiques peuvent donc être utilisées comme un modèle d'étude de processus méiotiques pathologiques chez l'Homme.

Ainsi, dans le but de déterminer une corrélation entre les anomalies chromosomiques et l'apoptose dans les spermatozoïdes humains, nous avons analysé la fragmentation de l'ADN spermatique et la ségrégation méiotique chez des hommes porteurs d'une translocation Robertsonienne (13;14) et chez des hommes fertiles à caryotype normal.

## II. MATERIELS ET METHODES

### 1. Sujets

Douze hommes porteurs de translocation chromosomique Robertsonienne entre les chromosomes 13 et 14 ont été inclus dans cette étude. Leur caryotype était 45,XY,der(13;14)(q10;10). L'âge moyen de ces 12 hommes était de  $33,9 \pm 3,85$  ans (26 à 41 ans). Ces hommes ont consulté pour infertilité et diagnostic génétique pré-implantatoire dans notre centre de Médecine et Biologie de la Reproduction. Trois de ces hommes avaient été à l'origine de fausses-couches survenues après grossesses naturelles et les neuf autres hommes avaient bénéficié d'assistance médicale à la procréation (de 1 à 4 tentatives avec fécondation par ICSI), sans grossesse chez la conjointe. Aucun de ces couples n'avaient d'enfants vivants.

Neuf hommes féconds ayant un caryotype normal (46,XY) et des caractéristiques spermatiques normales selon l'OMS [27] ont été utilisés comme population contrôle. L'âge moyen de ces 9 hommes était de  $34,6 \pm 5,2$  ans (28 à 44 ans). Tous ces hommes ont été à l'origine d'une grossesse dans les deux années précédentes. Ces hommes étaient les conjoints de femmes conductrices de maladies génétiques pour lesquelles un diagnostic génétique pré-implantatoire a été réalisé.

### 2. Caractéristiques spermatiques

Après recueil de sperme par auto-masturbation dans un réceptacle stérile et liquéfaction à température ambiante, les paramètres spermatiques suivants ont été analysés, selon les recommandations de l'OMS [27] : volume et pH de l'éjaculat, concentration, mobilité progressive rapide, lente et non progressive et vitalité des spermatozoïdes. La morphologie des spermatozoïdes a été analysée selon la classification de David et al. [3] après coloration de Schorr.

### 3. Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation a été analysée dans les spermatozoïdes éjaculés par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling) en utilisant le kit Apoptosis *in situ* (Roche, Meylan, France).

L'éjaculat a été mis en suspension dans 5 ml d'une solution hypotonique de KCl, 5,65 g/l et a été placé à 37°C pendant

20 minutes. Après centrifugation (5 minutes, 300 g) le culot a été remis en suspension dans 5 ml de fixateur. Dix microlitres de la suspension de spermatozoïdes ont été étalés sur une lame de verre Superfrost (Mentzel, Braunschweig, Allemagne). Les lames ont été lavées trois fois dans un tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X, pH 7 et séchées à l'air. Les solutions contenant l'enzyme Terminal desoxyribonucleotid Transferase (TdT) (Roche, Meylan, France) et les nucléotides marqués ont été déposées sur les spermatozoïdes, puis les lames ont été recouvertes d'une lamelle et placées dans une chambre humide à 37° C et à l'obscurité pendant une heure. Les lames ont été ensuite lavées trois fois dans une solution de PBS 1X. Les noyaux des spermatozoïdes ont été contre-colorés avec une solution de 4',6-diamino-2-phényl indole (DAPI).

Pour chaque analyse, un contrôle positif et un contrôle négatif de la fragmentation de l'ADN ont été réalisés. Le contrôle positif était constitué d'une lame où les spermatozoïdes ont été incubés avec une solution enzymatique de DNase I 1mg/ml (DNase I, Roche, Meylan, France) pendant 30 minutes à température ambiante avant réalisation de la technique TUNEL. Le contrôle négatif était constitué d'une lame sur laquelle seuls les nucléotides fluorescents ont été déposés. La lecture de la fragmentation de l'ADN a été réalisée en microscopie à épifluorescence avec un filtre spécifique pour la fluorescéine. Seuls les noyaux présentant une fluorescence verte intense ont été comptabilisés comme positifs (Figure 1). Le pourcentage de fragmentation d'ADN a été défini comme le rapport du nombre de spermatozoïdes fragmentés sur le nombre total de spermatozoïdes analysés. Le pourcentage de spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté a été calculé à partir de l'analyse de 1000 spermatozoïdes quand les paramètres spermatiques le permettaient.

#### 4. Etude de la ségrégation méiotique

Dix microlitres de la suspension de spermatozoïdes ont été étalés sur une lame de verre Superfrost (Mentzel, Braunschweig, Allemagne). Les noyaux spermatiques ont été décondensés dans une solution de NaOH 1 N pendant deux minutes à température ambiante. Les lames ont été ensuite lavées deux fois dans une solution Standard Saline Citrate (SSC) 1X pendant 5 minutes à température ambiante puis déshydratées dans trois bains successifs d'éthanol de 70°, 85° et de 100°, pendant deux minutes chacun à température ambiante.

Une hybridation *in situ* fluorescente (FISH) double couleur a été réalisée en utilisant des sondes d'ADN spécifiques des chromosomes 13 et 14. Ces sondes ont été préparées à partir de clones de chromosomes artificiels de bactéries (BAC). Pour le chromosome 13, les séquences d'ADN étaient localisées en 13q34 (163C9, 98F14, 391H12, 230F18, 245B11). Pour le chromosome 14, les séquences d'ADN étaient localisées en 14q32 (982M15, 44N21, 417P24, 1087P8, 158A2). Le marquage des sondes a été réalisé par nick translation avec la fluorescéine 12 d-UTP (Roche) pour le chromosome 13 et avec la Rhodamine 6-dUTP (Roche) pour le chromosome 14. Dix microlitres de

sondes chromosomiques ont été déposés sur les préparations de spermatozoïdes. La dénaturation de l'ADN spermatique et des sondes chromosomiques a été réalisée simultanément à 73°C pendant 3 minutes.

Les lames ont été ensuite hybridées dans une chambre humide à l'obscurité à 37° C pendant 15 heures. Les lamelles ont été ensuite retirées et les lames ont été lavées dans une solution de 0,4 X SSC/0,3% IGEPAL pH 7 à 73°C pendant deux minutes et dans une solution de 2 X SSC/0,1% IGEPAL pH 7 à température ambiante pendant trente secondes. Les noyaux spermatiques ont été contre-colorés avec une solution de DAPI.

Les lames ont été analysées en microscopie à épifluorescence avec des filtres spécifiques pour la fluorescéine, la rhodamine et le DAPI. Pour chaque sonde chromosomique, 1000 noyaux spermatiques ont été analysés lorsque la concentration de spermatozoïdes le permettait. L'analyse des signaux fluorescents a été réalisée selon les critères de Martin et Rademaker [16]. Un spermatozoïde était considéré comme disomique s'il montrait deux signaux fluorescents de la même couleur, intensité et taille. L'absence d'un signal fluorescent pour un chromosome était interprété comme nullisomique seulement si l'autre sonde chromosomique donnait un signal fluorescent.

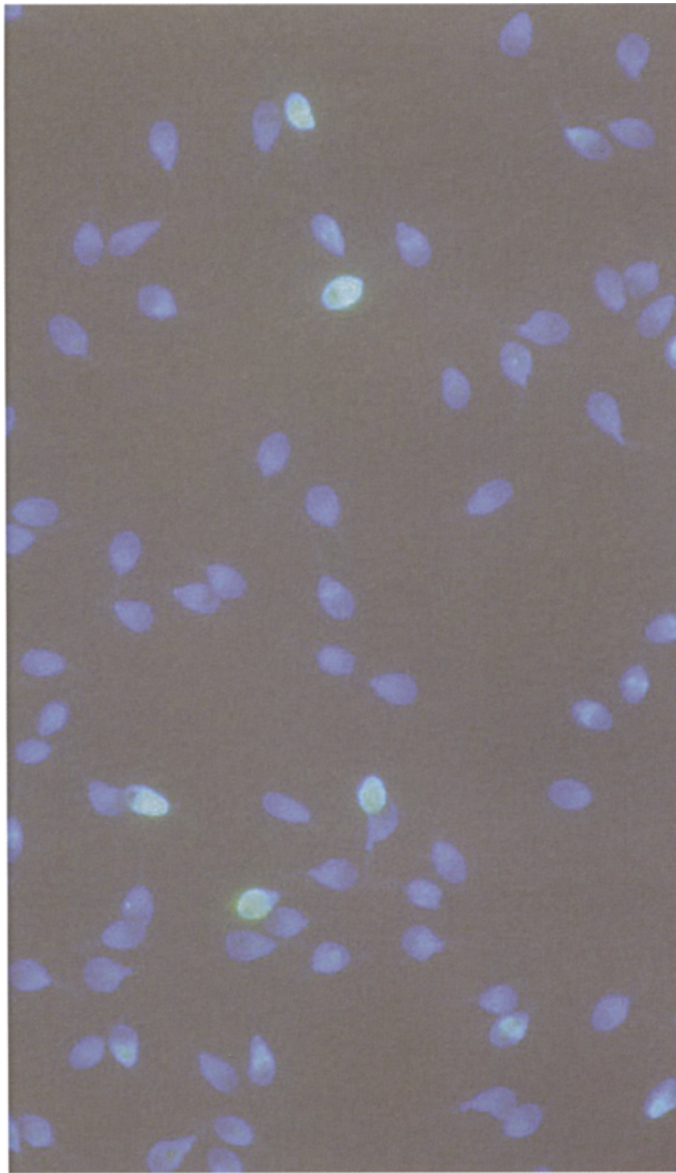
#### 5. Analyses statistiques

Compte-tenu du nombre d'individus dans chaque groupe (inférieur à 30), un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les moyennes des concentrations, mobilité, morphologie des spermatozoïdes, des pourcentages de fragmentation de l'ADN et des pourcentages de formes monosomiques 13 et 14 entre le groupe des hommes porteurs de translocations et le groupe des hommes contrôles. Les différences étaient considérées comme significatives quand la valeur de la probabilité était inférieure à 0,05.

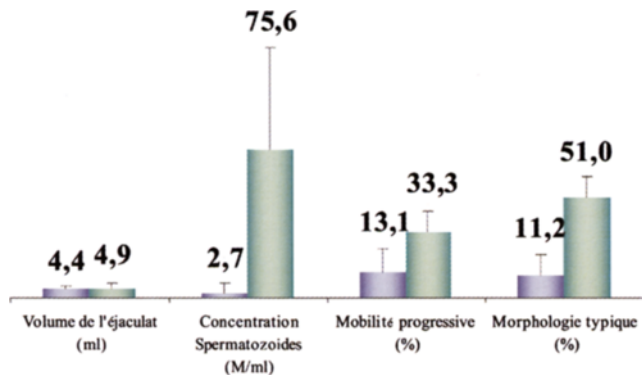
### III. RESULTATS

#### 1. Caractéristiques spermatiques

Le volume moyen de l'éjaculat n'est pas significativement différent entre les deux groupes (4,4 ml  $\pm$  3,8 *versus* 4,1 ml  $\pm$  2,5) mais la concentration, la mobilité et la morphologie typique des spermatozoïdes sont significativement plus basses chez les hommes porteurs de translocation (Figure 2). Selon les critères de l'OMS, dans le groupe des hommes porteurs de translocation, seul un patient ne présentait pas d'oligozoospermie. Trois hommes présentaient une oligozoospermie modérée (respectivement 5,0, 2,6 et 4 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml) et 8 hommes présentaient une oligozoospermie extrême (0,005 à 1,15 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml). Tous les hommes porteurs de translocations présentaient une asthénozoospermie. Dix hommes porteurs de translocation présentaient une tératozoospermie. Aucun des hommes porteurs de translocation ne présentait un sperme normal.



**Figure 1 : Analyse des spermatozoïdes par la technique TUNEL. Les spermatozoïdes ayant une fragmentation de l'ADN présentent une fluorescence verte**



**Figure 2 : Comparaison des caractéristiques spermatozoïdes des hommes porteurs de translocation (13 ;14) (colonne violette) et dans la population contrôlée (colonne verte).**

## 2. Fragmentation de l'ADN

Le pourcentage de fragmentation de l'ADN spermatique est significativement plus élevé chez les hommes porteurs de translocations ( $34,9 \pm 20,2$  versus  $13,8 \pm 7,7$  ;  $p = 0,0036$ ). Il existe une corrélation négative ( $r = -0,45$ ) entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN spermatique et la concentration de spermatozoïdes (Figure 3).

## 3. Ségrégation méiotique

Un spermatozoïde équilibré correspondait à un spermatozoïde avec une monosomie 13 et une monosomie 14 (Figure 4). Un spermatozoïde déséquilibré correspondait à un spermatozoïde avec une nullisomie ou une disomie pour l'un des chromosomes 13 et 14 (Figure 4). La proportion de spermatozoïdes déséquilibrés pour les chromosomes 13 et 14 est significativement plus importante chez les hommes porteurs de translocations (13 ; 14) par rapport à la population contrôlée ( $15,9 \pm 4,25\%$  versus  $1,3 \pm 0,6\%$   $p=0,00016$ ).

## IV. DISCUSSION

Dans cette étude, la ségrégation méiotique des chromosomes 13 et 14 et la fragmentation de l'ADN spermatique ont été analysées dans une série de 12 translocations Robertsoniennes (13;14). Une ségrégation méiotique fiable des chromosomes est essentielle pour une reproduction normale. Des erreurs dans la ségrégation des chromosomes au cours des deux divisions méiotiques peuvent conduire à la perte des gamètes, à une hypofertilité ou à des anomalies chromosomiques dans la descendance.

L'étude de la ségrégation méiotique a montré une fréquence moyenne de 15,9% de spermatozoïdes déséquilibrés pour les chromosomes 13 et 14 chez les hommes porteurs de translocation Robertsonienne (13;14). Cette fréquence est significativement plus importante que celle observée dans la population contrôlée. Cette augmentation des aneuploidies des chromosomes 13 et 14 est probablement majoritairement due à une malségrégation de la translocation (13;14). Pour l'étude des chromosomes 13 et 14 par FISH, nous avons utilisé des sondes générées à partir de plusieurs BAC contigus pour chaque chromosome. Ceci nous a permis d'obtenir des signaux d'hybridation intenses dans les noyaux spermatiques et une probabilité très faible de non hybridation (<5%). Concernant le protocole d'hybridation nous avons simplifié l'étape de dénaturation en réalisant une dénaturation simultanée des sondes chromosomiques sur les noyaux spermatiques.

Les résultats publiés pour 11 translocations Robertsoniennes (13;14) ont montré des taux de déséquilibre chromosomique variant de 6% à 26,4% [6, 7, 17, 19, 20, 21]. Trois translocations (13;14) ont été étudiées par fécondation *in vitro* hétérospécifique [17, 20, 21]. Le faible nombre de spermatozoïdes analysés au total pour ces trois études ( $n = 240$ ) et le biais de la sélection de spermatozoïdes fécondants pour la fécondation *in vitro* ne permettent pas de donner une observation exacte de la ségrégation méiotique. L'utilisation de l'hybridation *in situ* avec des sondes

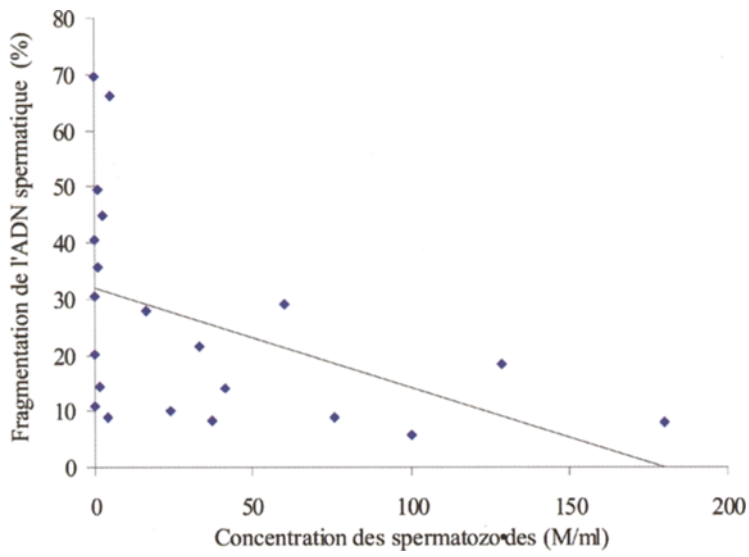


Figure 3 : Pourcentage de fragmentation de l'ADN spermatique en fonction de la concentration des spermatozoïdes.

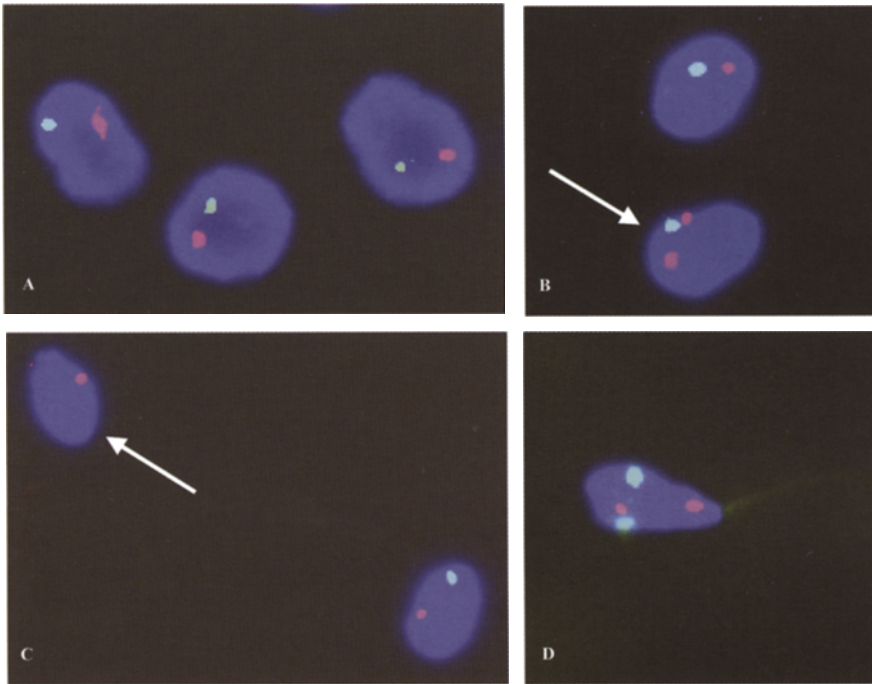


Figure 4 : Hybridation in situ fluorescente double couleur avec des sondes d'ADN spécifiques du chromosome 13 (vert) et du chromosome 14 (rouge) sur noyaux spermatozoïdes. A) spermatozoïdes équilibrés (monosomie 13, monosomie 14) ; B) la flèche indique un spermatozoïde déséquilibré avec une monosomie 13 et une disomie 14 ; C) la flèche indique un spermatozoïde déséquilibré avec une monosomie 14 et une nullisomie 13 ; D) spermatozoïde déséquilibré avec une disomie 13 et une disomie 14.

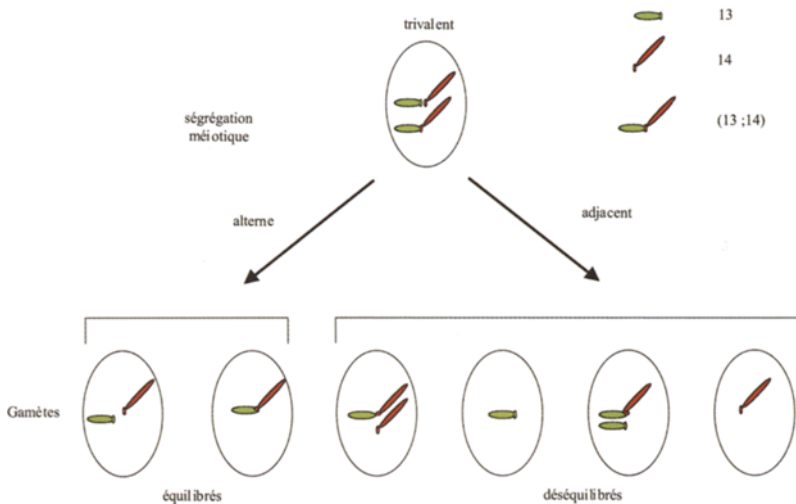


Figure 5 : Schéma théorique de la ségrégation méiotique de la translocation Robertsonienne (13;14).

spécifiques des chromosomes 13 et 14 autorise l'étude d'un grand nombre de spermatozoïdes permettant une évaluation plus précise des différents modes de ségrégation méiotique. Dans notre étude, il existe une certaine homogénéité des déséquilibres chromosomiques dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs de la translocation (13;14). Ces fréquences observées sont inférieures aux fréquences théoriques attendues (Figure 5) avec une prédominance de formes équilibrées suggérant une élimination des cellules germinales anormales.

Dans notre étude, nous avons observé une augmentation significative de l'apoptose dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs de translocations Robertsoniennes (13;14) par rapport à la population contrôle. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour évaluer l'apoptose au niveau cellulaire (COMET, TUNEL, Sperm Chromatin Structure Assay). Les techniques utilisant la cytométrie en flux n'étaient pas adaptées à la faible concentration de spermatozoïdes des hommes porteurs de translocations. Nous avons donc mis au point la technique TUNEL *in situ* sur spermatozoïdes qui permet d'évaluer la fragmentation de l'ADN au niveau d'une cellule unique. Dans notre mise au point, une des difficultés était de définir un spermatozoïde avec un ADN fragmenté. En effet, à côté des spermatozoïdes montrant une fluorescence verte intense, certains spermatozoïdes avaient une fluorescence verte très faible ou partielle. Dans notre étude nous avons comptabilisé comme positifs avec la technique TUNEL les spermatozoïdes montrant une fluorescence verte intense comme décrit par Barroso et al. [1].

Nos résultats montrent une activation du processus apoptotique dans les testicules d'hommes porteurs de translocations Robertsoniennes (13;14). Ceci pourrait suggérer un rôle de l'apoptose pour éliminer les cellules germinales déséquilibrées. Dans les souris mâles porteuses de translocations Robertsoniennes, Eaker et al. [4] suggèrent que la malségrégation de la translocation est responsable d'un mauvais alignement des chromosomes au niveau du fuseau métaphasique activant ainsi un mécanisme de contrôle déclenchant l'apoptose. Pendant la spermatogenèse, l'apoptose est un régulateur physiologique qui intervient à plusieurs stades. En phase pré-pubère, une vague massive d'apoptose survient chez les Mammifères [13]. Des anomalies de cette vague d'apoptose peuvent être à l'origine d'infertilité à l'âge adulte. Cette vague d'apoptose aurait pour but d'établir le ratio optimum entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. En pathologie humaine, Gandini et al. [8] ont montré que le pourcentage de cellules germinales en apoptose chez les sujets normaux est significativement plus bas que ceux observés chez les hommes atteints d'OAT. Benchaib et al. [2] ont montré récemment que la fragmentation de l'ADN par méthode TUNEL dans des spermatozoïdes préparés en vue d'une tentative de fécondation *in vitro* est augmentée lorsque les caractéristiques spermatisques sont anormales (concentration, mobilité, morphologie). Dans notre étude, il existe une corrélation négative entre la fragmentation de l'ADN spermatisque et la concentration des spermatozoïdes. Ceci est semblable aux

résultats obtenus chez les hommes infertiles présentant une OAT dont la fragmentation de l'ADN a été étudiée par la méthode TUNEL [8, 12].

Dans ce travail, nous avons montré qu'il existait une augmentation significative de l'apoptose dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs de translocations Robertsoniennes (13;14). Cette augmentation de l'apoptose est observée dans des spermatozoïdes où il existe une augmentation des déséquilibres chromosomiques pour les chromosomes 13 et 14 avec cependant une prédominance des formes équilibrées. Ces résultats pourraient suggérer que l'apoptose jouerait un rôle dans l'élimination des cellules germinales déséquilibrées.

D'autres types de translocations Robertsoniennes sont donc nécessaires à étudier. En effet, bien que les chromosomes soient différents, la ségrégation méiotique des chromosomes se fait de la même façon à partir d'un trivalent. Ainsi, les résultats obtenus pourraient permettre de relier l'apoptose à la figure méiotique ou aux chromosomes impliqués dans la translocation.

L'étude de l'apoptose dans les translocations réciproques générant des déséquilibres chromosomiques partiels dans les spermatozoïdes pourrait aussi nous permettre de mettre en évidence une éventuelle association avec certaines régions chromosomiques.

L'identification des mécanismes génétiques par lesquels les cellules germinales contenant des anomalies chromosomiques sont éliminées par le processus apoptotique pourrait aider à la prévention de la transmission d'anomalies chromosomiques à la descendance.

## REFERENCES

1. BARROSO G., MORSHEDI M., OEHNINGER S. : Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum. Reprod., 2000, 15 : 1338-1344.
2. BENCHAIB M., BRAUN V., LORNAGE J. et al. : Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum. Reprod., 2003, 18 : 1023-1028.
3. DAVID G., BISSON J.P., CZYGLIK F. et al. : Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification. J. Gynec. Obstet. Biol. Reprod., 1975, 4 : 17-43.
4. EAKER S., PYLE A., COBB J. et al. : Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. J. Cell Sci., 2001, 114 : 2953-2965.
5. FELLOUS M., SIFFROI J.P. : Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches. Andrologie, 2003, 13 : 148-157.
6. ESCUDERO T., LEE M., CARREL D. et al. : Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13 ;14)(q10 ;q10) carriers. Prenat. Diagn., 2000, 20 : 599-602.
7. FRYDMAN N., ROMANA S., LELORCH M. et al. : Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. Hum. Reprod., 2001, 16 : 2274-2277.
8. GANDINI L., LOMBARDO F., PAOLI D. et al. : Study of apop-

- totic DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod., 2001, 15 : 830-839.
9. GUICHAOUA M.R., DELAFONTAINE D., NOEL B. et al. : Male infertility of chromosomal origin. Contracept. Fertil. Steril., 1993, 21 : 113-121.
  10. HOLMES J.M., MARTIN R. : Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence *in situ* hybridization. Hum. Genet., 1993, 91 : 20-24.
  11. HOST E., LINDENBERG S., KAHN J. et al. : DNA strand breaks in human sperm cells : a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 1999, 78 : 336-339.
  12. IRVINE S., TWIGG J., GORDON E. et al. : DNA integrity in human spermatozoa : Relationships with semen quality. J. Androl., 2000, 21 : 33-44.
  13. KIM E., BARGAWI A., SEO J. et al. : Apoptosis : its importance in spermatogenic dysfunction. Urol. Clin. North Am., 2002, 29 : 755-765.
  14. KOYKUL W., BAGUMA-NIBASHEKA M., KIAG W.A. et al. : Meiosis and apoptosis in germ cells of Y-autosome translocation carriers boars. Mol. Reprod. Dev., 2000, 56 : 448-457.
  15. LOPES S., JURISSICOVA A., SUN J. et al. : Reactive oxygen species : potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod., 1998, 13 : 896-900.
  16. MARTIN R., RADEMAKER R. : Reliability of aneuploidy estimates in human sperms : result of fluorescence *in situ* hybridization studies using two different scoring criteria. Mol. Reprod. Dev., 1995, 45 : 89-93.
  17. MARTIN R. : Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. Hum. Genet., 1988, 80 : 357-361.
  18. MODI D., DANE S., BHARTIVA D. : Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. Mol. Hum. Reprod., 2003, 9 : 219-225.
  19. MOREL F., ROUX C., BRESSON J.L. : FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. Mol. Hum. Reprod., 2001, 7 : 483-488.
  20. OGAWA S., ARAKI S., ARAKI Y. et al. : Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. Prenat Diagn., 2000, 15 : 1136-1139.
  21. PELLESTOR F., SELE. B., JALBERT H. : Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. Hum. Genet., 1987, 76 : 116-120.
  22. PRINT C., LOVELAND K. : Germ cell suicide : new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays, 2000, 22 : 423-430.
  23. RUDAK E., JACOB P., YANAGIMACHI R. : Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. Nature, 1978, 274 : 911-913.
  24. SAKKAS D., MANICARDI G., BIANCHI P. et al. : Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol. Reprod., 1995, 52 : 1149-1155.
  25. SINHA-HIKIM A., WANG C., LUE Y. et al. : Spontaneous germ cell apoptosis in humans : evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells in programmed cell death. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998, 83 : 152-156.
  26. SUN J., JURISSICOVA A., CASPER R. : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : correlation with

fertilization *in vitro*. Biol. Reprod., 1997, 56 : 602-607.

27. WORLD HEALTH ORGANISATION. Laboratory manual for the examination of human semen and cervical mucus interaction. 4<sup>th</sup> edition. New York, Cambridge University Press, 1999.
28. ZINI A., BIELECKI R., PHANG D. et al. : Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil. Steril., 2001, 75 : 674-677.

Prix SALF du meilleur DEA 2003.

Manuscrit reçu : février 2004 ; accepté : février 2004.

## ABSTRACT

### Apoptosis and meiotic segregation in sperm from men with chromosomal translocations

Anne LE DU, Marc LELORC'H, Nelly FRYDMAN, Moncef BENKHALIFA, Serge ROMANA, Michel VEKEMANS, René FRYDMAN, Gérard TACHDJIAN

**Men with a chromosomal translocation produce a significant percentage of unbalanced spermatozoa. In order to determine a correlation between chromosomal anomalies and apoptosis in human sperm, we analysed DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm from men with a (13;14) Robertsonian translocation. We studied sperm from 12 (13;14) translocation carriers and 9 proven fertile men with a normal karyotype. Meiotic segregation of chromosomes 13 and 14 was analysed using dual-colour fluorescence *in situ* hybridization with locus-specific probes for chromosomes 13 and 14. Apoptosis in spermatozoa was measured by *in situ* TUNEL assay. The meiotic segregation study showed a significantly increased frequency of unbalanced spermatozoa for chromosomes 13 and 14 in (13;14) carriers (15.9%) compared to the control population (1.3 %) ( $p=0.00016$ ). The study of apoptosis showed an increase of DNA fragmentation in (13;14) carriers (34.9%) compared to the control population (13.8%) ( $p = 0.0036$ ). This increased apoptosis was observed in spermatozoa presenting an increase of unbalanced chromosomal anomalies concerning chromosomes 13 and 14, but with a predominance of balanced spermatozoa compared to the theoretical risk of meiotic segregation. These results suggest that apoptosis could be involved as a regulatory mechanism to eliminate unbalanced chromosomal spermatozoa in men with a (13;14) Robertsonian translocation.**

**Key words:** apoptosis, meiotic segregation, translocation, FISH, TUNEL