

Prescription et pratique de la recherche des microdélétions du chromosome Y en France : résultats de l'enquête nationale réalisée sous l'égide de la Société d'Andrologie de Langue Française

Isabelle Esther AKNIN-SEIFER ^{1,2}, Hervé LEJEUNE ³, Renaud Laurian TOURAINE ², Rachel LEVY¹

¹Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Nord et

²Laboratoire de Génétique Moléculaire, Faculté de médecine, SAINT ETIENNE

³Département de Médecine de la Reproduction, Hôpital Edouard Herriot, LYON

RESUME

La recherche des microdélétions du chromosome Y est conseillée en cas de troubles sévères de la spermatogenèse. Le développement des techniques de biologie moléculaire a rendu ce diagnostic plus accessible en analyse de routine dans le cadre du bilan d'exploration d'une infertilité masculine. Cependant, le diagnostic des microdélétions du chromosome Y n'est pas proposé par tous les centres d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).

Le but de notre enquête était de préciser quelles sont, en France, les conditions de prescription dans tous les centres d'AMP (indications, financement) et de réalisation dans les laboratoires correspondants (techniques employées, facturation), de cette analyse. Nous observons que l'activité de détection des microdélétions est en croissance forte et régulière. L'évolution vers un consensus sur les indications de ce dépistage et vers une technique standardisée, soumise à un contrôle de qualité national, paraît souhaitable. La prise en charge de cette analyse par les organismes d'Assurance Maladie apparaît comme une étape essentielle à sa généralisation en routine. Enfin, l'analyse des réponses à ce questionnaire a révélé une forte demande de diffusion d'information sur ce sujet, de la part des cliniciens et biologistes.

Mots clés : chromosome Y, enquête, France, infertilité masculine, microdélétions

I. INTRODUCTION

L'existence d'un facteur indispensable à la spermatogenèse appelé AZF (AZoospermia Factor) a été suspectée dès 1976 par Tiepolo et Zuffardi [37]. L'étude par PCR de marqueurs anonymes, appelés STS (Sequence Tagged Sites), répartis environ tous les 30 Kb [9, 41], a permis de détecter des délétions de petite taille dans la région AZF, non repérables avec les techniques cytogénétiques classiques, aboutissant à l'identification en Yq11 de 3 loci porteurs de gènes impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse, correspondant à 3 régions délétées non chevauchantes : AZFa, AZFb, et AZFc [28, 40].

La recherche des microdélétions de l'Y présente un intérêt étiologique, pronostique, et permet d'optimiser le conseil génétique : la prescription de la recherche des microdélétions du chromosome Y est donc conseillée en cas de troubles sévères de la spermatogenèse [19].

Le développement des techniques de biologie moléculaire a rendu ce diagnostic, théoriquement, plus accessible en analyse de routine dans le cadre du bilan d'exploration d'une infertilité masculine. Cependant, le diagnostic des microdélétions du chromosome Y n'est pas proposé par tous les centres d'AMP.

Correspondance :

Dr Rachel LEVY - Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Nord, 42055 Saint-Etienne. France -
Tel 04.77.82.83.07 - Email rachel.levy@chu-st-etienne.fr

Le but de notre enquête était de faire " l'état des lieux " sur la pratique en France de cette analyse tant au niveau de la « Prescription » de l'analyse qu'au niveau du « Diagnostic moléculaire ». Nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

En ce qui concerne la prescription : combien de praticiens et de centres d'AMP demandent la recherche des microdélétions du chromosome Y et quelles sont les spécialités de ces praticiens prescripteurs ? Quelles sont les indications retenues ? Comment est financé ce dépistage ?

En ce qui concerne le diagnostic moléculaire : combien de laboratoires recherchent les microdélétions ?

Quelle activité cette recherche représente-t-elle en nombre d'analyses ? Quelles sont les méthodes employées ? Comment est facturée cette analyse ?

Les objectifs sont de pouvoir 1) élaborer un consensus en ce qui concerne les indications du dépistage, 2) s'orienter vers les méthodes les plus adaptées selon le rapport coût - efficacité avec mise en place d'un contrôle de qualité national, 3) envisager une prise en charge par les organismes d'Assurance Maladie.

II. MATERIEL ET METHODES

Deux questionnaires ont été élaborés, l'un pour les prescripteurs (annexe 1) et l'autre pour les biologistes moléculaires (annexe 2). Ces questionnaires ont été envoyés en juin 2001 via les responsables (cliniciens et biologistes) des 88 centres agréés en AMP, en France (selon le répertoire FIVNAT). Une lettre accompagnant les questionnaires expliquait les objectifs de l'enquête. Il était demandé aux responsables des centres d'AMP (cliniciens et biologistes) de transmettre les questionnaires d'une part aux prescripteurs de leur centre et d'autre part aux biologistes moléculaires qui réalisent la recherche pour leur centre, s'ils ne disposaient pas des données pour répondre eux-mêmes ou s'il n'existait pas de consensus entre les différents prescripteurs. Un nouvel exemplaire du questionnaire a été envoyé par télécopie aux centres qui n'avaient pas répondu après un délai de 6 mois. Les responsables des centres n'ayant pas répondu ont été contactés par téléphone après un délai supplémentaire de 8 mois. Ont été définis comme structure « publique », les CHU, les CHG, les établissements et Instituts à but non lucratif soit 39 centres « publics » au total (44%). Les établissements à activité libérale ont été définis comme « privés » et ont représenté 47 centres (53%). Deux structures ont été classées en « mixte » car associant une activité publique (ex : Biologie) et une activité privée (ex : Gynécologie).

Statistiquement, les comparaisons ont été effectuées par le test du χ^2 pour les variables qualitatives.

III. RESULTATS

1. Taux de réponse

a) Prescripteurs

72 centres d'AMP sur 88 ont fourni une réponse « prescripteur », soit un taux de réponse de 82 % (par retour des questionnaires, ou lors d'un entretien téléphonique).

Au total, en France, 60% des centres (42 sur 72) prescrivent la recherche des microdélétions du chromosome Y (25 centres publics - 16 centres privés - 1 mixte). Trente centres sur 72 (42%) ne prescrivent pas la recherche des microdélétions (9 centres publics - 20 centres privés - 1 mixte). Le taux de réponse n'est pas significativement différent ($p=0,21$) pour les centres publics (34 sur 39 soit 87%) ou les centres privés (36 sur 47 soit 77%). Par contre, les centres publics prescrivent plus fréquemment ($p=0,0135$) la recherche des microdélétions (25 centres sur 34 soit 74%) que les centres privés (16 sur 36 soit 44%).

b) Biologistes moléculaires

Les prélèvements sont adressés à 30 laboratoires qui effectuent cette analyse en Biologie Moléculaire. Vingt-neuf laboratoires sur 30 (97%) ont répondu à notre questionnaire.

2. Réponses négatives : non prescription

Pour les 30 centres d'AMP ne demandant pas cette analyse, les principales raisons invoquées (Figure 1) sont que cette analyse n'est pas disponible localement (60%), que le coût en est élevé (43%), que le résultat ne modifie pas la prise en charge du couple (36%) et que le conseil génétique est délicat (26%).

3. Centres prescripteurs

Comme on peut le voir sur la Figure 2, le nombre de centres prescrivant cette recherche est en hausse constante depuis 8 ans. Selon la description de la composition des équipes multidisciplinaires, les prescripteurs sont (Figure 3), à parts égales, gynécologues (33% du total des 78 prescripteurs comptabilisés sur l'ensemble des équipes), urologues (26%) et biologistes (27%). Le nombre de prescripteurs par centre est indiqué à la Figure 4. La majorité des centres (50%) ont entre 2 et 5 prescripteurs.

a) Indications de la recherche de microdélétions du chromosome Y

En ce qui concerne les indications de la prescription de cette recherche, 39 centres d'AMP sur les 42 centres qui prescrivent la recherche des microdélétions ont fourni une réponse « indications », soit un taux de réponse de 93%. On distingue deux situations : les azoospermies et les oligozoospermies. Pour les azoospermies, les principales indications retenues sont les azoospermies sécrétoires (54%) (21 centres sur 39 réponses analysables) (Figure 5). Les

QUESTIONNAIRE MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y - PRESCRIPTEURS

(plusieurs réponses possibles)

NOM – PRÉNOM :**ADRESSE - CODE POSTAL - VILLE :****Téléphone :****Fax :****E-Mail :**☐ **CHU**☐ **CHG**☐ **LABO PRIVE**☐ **Clinique privée**☐ **AUTRE**

- Demandez-vous la recherche des microdélétions du chromosome Y : OUI ☐ NON ☐
- Si OUI, à quel(s) laboratoire(s) les adressez-vous : / _____ /
/ _____ /

Si NON, précisez pour quelle(s) raisons :

- ☐ coût élevé pour le patient
- ☐ analyse non disponible localement
- ☐ ne change pas la prise en charge thérapeutique du couple
- ☐ difficulté du conseil génétique en cas de positivité
- ☐ nécessite une prise de sang
- ☐ autre

- Depuis **quand** demandez-vous la recherche des microdélétions :
- **Combien de patients** analysés depuis le début : / _____ / Au cours de l'année 2000 : / _____ /
- **Identification des prescripteurs** ☐ Gynécologue ☐ Urologue ☐ Avec agrément prélèvement testiculaire
☐ Généticien ☐ Endocrinologue ☐ Biologiste ☐ Autre, précisez / _____ /
- Combien de praticiens prescripteurs dans votre centre d'AMP : ☐ 1 ☐ 2 à 5 ☐ 5 à 20 ☐ plus de 20
☐ je ne sais pas

Sélection des patients – Indications :

- En cas d'azoospermie uniquement "sécrétoire" ou "non-obstructive" ☐ OUI ☐ NON
- Systématiquement en cas d'azoospermie, quelle qu'en soit l'origine ☐ OUI ☐ NON
- Systématiquement pour une oligozoospermie < 1 Million de spz/ml ☐ OUI ☐ NON
- Systématiquement pour une oligozoospermie < 5 Millions de spz/ml ☐ OUI ☐ NON
- Systématiquement en cas d'ICSI ☐ OUI ☐ NON
- Utilisez-vous d'autres critères, lesquels : / _____ /

Facturation : Comment cette analyse est-elle facturée :

- ☐ B Hors Nomenclature : ☐ B500 ou ☐ autre B / _____ / ☐ et à la charge du patient, quel montant / _____ / F
☐ ou pris en charge par l'hôpital
- ☐ au titre de la Recherche
- ☐ autrement : / _____ /
- ☐ je ne sais pas

QUESTIONNAIRE MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y – BIOLOGISTES MOLECULAIRES

(plusieurs réponses possibles)

NOM – PRÉNOM :**ADRESSE - CODE POSTAL - VILLE :****Téléphone :****Fax :****E-Mail :**☐ **CHU**☐ **CHG**☐ **LABO PRIVE**☐ **AUTRE**

• Pratiquez-vous la recherche des microdélétions du chromosome Y

OUI ☐NON ☐

Si NON, précisez pour quelle(s) raison(s) :

☐ coût - rentabilité☐ analyse non mise au point dans le laboratoire☐ peu de demandes☐ difficulté du conseil génétique en cas de positivité☐ absence de consensus sur la technique☐ autre / _____ /

Seriez-vous intéressé(e) par faire effectuer cette analyse dans un autre centre :

OUI ☐NON ☐

Si OUI :

• Depuis **quand** faites-vous la recherche des microdélétions / _____ /• **Combien de patients** analysés depuis le début / _____ / Au cours de l'année 2000 / _____ /• Combien de praticiens prescripteurs : ☐ 1 ☐ 2 à 5 ☐ 5 à 20 ☐ plus de 20• **Sélection** des patients :

Connaissez-vous les données cliniques

OUI ☐NON ☐

Connaissez-vous les données du spermogramme – spermocytogramme

OUI ☐NON ☐• Quelle **quantité de sang** est prélevée / _____ / ml• Sur quel **type de tube** / _____ /• Méthode d'extraction : ☐ "macro" méthode ☐ "micro" méthode ☐ autre / _____ /• **Qui exécute** l'analyse : ☐ Routine : Technicien(ne)☐ Recherche : ☐ Interne☐ Médecin☐ Etudiant☐ Autre / _____ /• Quelle **technique** est utilisée : ☐ "technique maison" ☐ kit commercialisé PROMEGA ou EXPESTEAM

• En cas de technique maison :

☐ SIMPLEX☐ DUPLEX☐ MULTIPLEX⇒ **Combien de marqueurs** sont testés au minimum en dépistage / _____ /⇒ ☐ AZF a Lesquels / _____ /☐ AZF b Lesquels / _____ /☐ AZF c Lesquels / _____ /

[illegible]

- **Facturation** : Comment cette analyse est-elle facturée :
 - ☐ B Hors Nomenclature : ☐ B500 ou ☐ autre B ☐ et à la charge du patient, quel montant / _____/
 - ☐ ou pris en charge par l'hôpital
 - ☐ au titre de la Recherche
 - ☐ autrement / _____/
 - ☐ ne sais pas
- A combien estimez-vous le prix de revient d'un test / _____/

- Seriez-vous intéressés par un contrôle de qualité ☐ national ☐ International
- Ou bien par système d'échange de positifs ☐ OUI ☐ NON
- Etes-vous satisfaits par votre technique ☐ OUI ☐ NON

Prévoyez-vous de la faire évoluer, comment / _____

- **Quels sont vos résultats en terme de fréquence de microdélétions parmi les échantillons analysés :**

Nombre de positifs / patients testés = / _____ /

Commentaires :

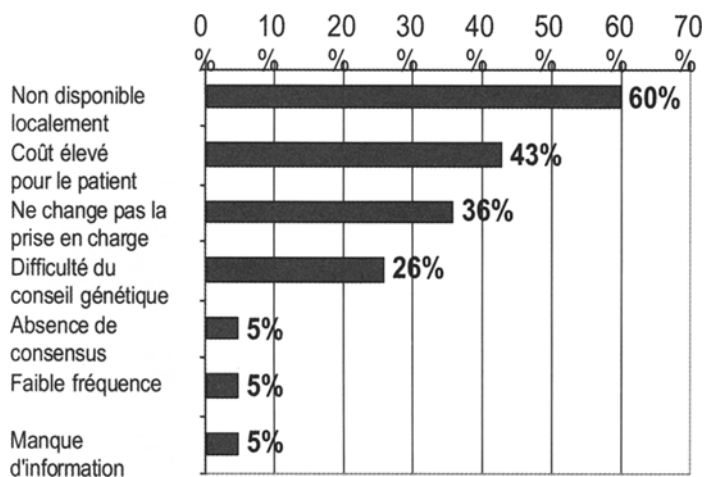


Figure 1 : Raisons de non prescription de la recherche des microdélétions du chromosome Y dans les centres ne pratiquant pas ce dépistage.

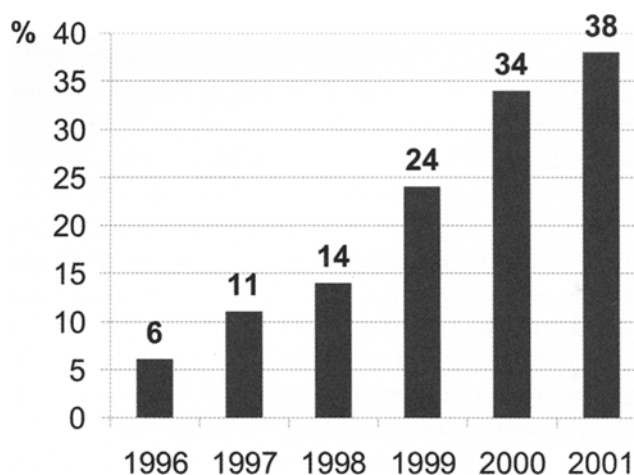


Figure 2 : Evolution du nombre de centres prescrivant la recherche de microdélétions du chromosome Y depuis 1996.

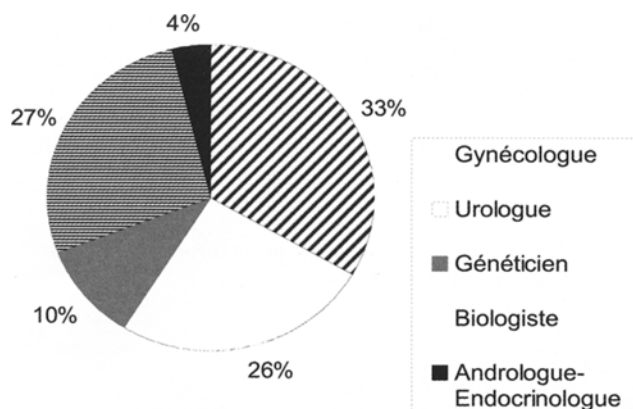


Figure 3 : Répartition des spécialités des prescripteurs de la recherche de microdélétions du chromosome Y dans les centres d'AMP français.

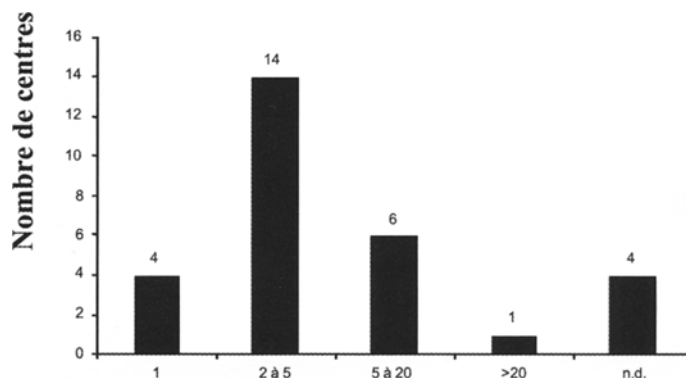


Figure 4 : Nombre de prescripteurs de la recherche des microdélétions du chromosome Y par centre d'AMP.

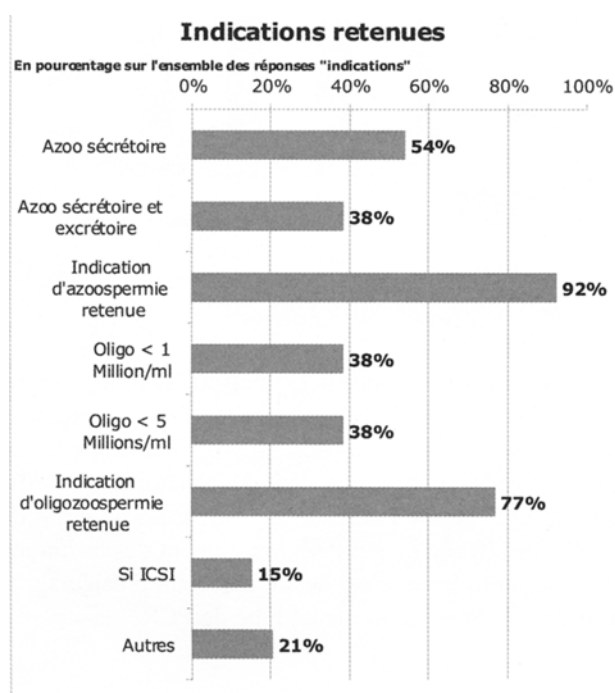


Figure 5 : Indications retenues en pourcentage sur l'ensemble des réponses des prescripteurs.

azoospermies de toutes origines représentent les 38% restant (15 centres), hormis 3 centres, qui ne prescrivent pas cette analyse en cas d'azoospermie (8%). Pour les oligozoospermies (Figure 5), 39% des prescripteurs (15 sur les 38 réponses analysables) retiennent comme seuil le chiffre de 5 millions de spermatozoïdes/ml ; ce seuil descend à 1 million par ml pour 39% des prescripteurs. Huit centres (21%) ne retiennent pas les oligozoospermies comme indication. Sur les 39 centres ayant répondu à cet item, 8 centres ont des critères d'indication supplémentaires comme la notion de stérilité familiale pour 5 d'entre eux ; 3 centres notamment ne retiennent ni l'azoospermie ni l'oligozoospermie, et n'effectuent cette recherche qu'en cas de notion d'infertilité familiale. Un centre n'effectue cette recherche qu'en absence de toute autre étiologie. Deux centres s'appuient entre autres sur des signes d'appel en cytogénétique. Trois centres n'ont pas précisé leurs indications.

b) Modes de financement de la recherche de microdélétions du chromosome Y

Le financement a été précisé par 33 des 42 centres prescripteurs (taux de réponse de 79%). Dans les 21% restants, le prescripteur reconnaissait ne pas connaître le mode de financement. Le financement est assuré (Figure 6) pour 31% par les protocoles de recherche (n=13), ou reste soit à la charge du patient (n=10 ; 24%), soit de l'Hôpital (n=10 ; 24%).

4. Diagnostic moléculaire

Parallèlement aux centres prescripteurs, le nombre de laboratoires effectuant cette analyse est en hausse constante (Figure 7). Un total de 10399 analyses a été conduit depuis le début de leur pratique dans les 29 laboratoires ayant répondu à l'enquête, avec une augmentation des examens au cours des années (2617 détections au cours de l'année 2000) (Tableau 1). Les activités globales et annuelles de chaque laboratoire depuis la mise en place de cette analyse sont représentées sur les Figures 8 et 9. Les laboratoires ont connaissance des données cliniques pour 76 % des centres (22 sur 29) et des données du spermogramme pour 79 % des centres (23 sur 29).

a) Techniques utilisées

L'analyse des résultats concernant la réalisation de la détection des microdélétions met en évidence une extrême diversité des pratiques. L'étude se fait par PCR de marqueurs anonymes, appelés STS (Sequence Tagged Sites), répartis environ tous les 30 Kb sur l'ensemble du chromosome Y. La majorité (66%) des centres (19 sur 29) utilise une technique dite « maison », c'est-à-dire mise au point par le laboratoire lui-même, en particulier en ce qui concerne le nombre et le choix des marqueurs étudiés. Deux centres (7%) préfèrent un Kit commercial (Promega®

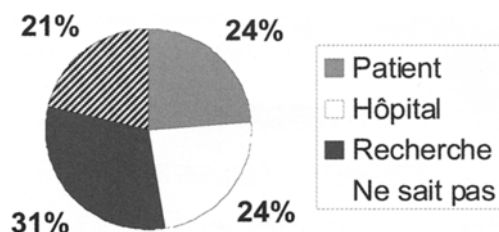


Figure 6 : Facturation d'après les prescripteurs interrogés.

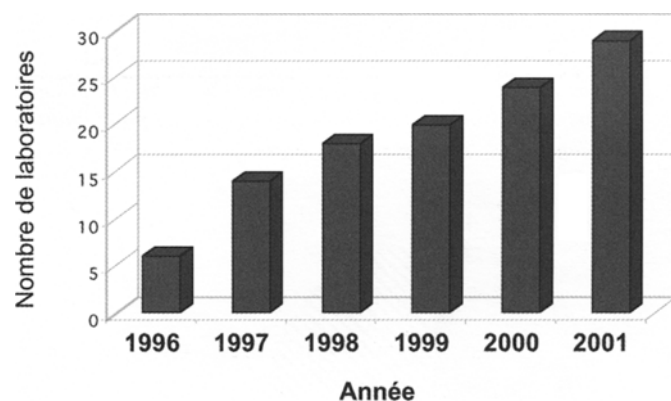


Figure 7 : Evolution du nombre de laboratoires réalisant la recherche de microdélétions du chromosome Y.

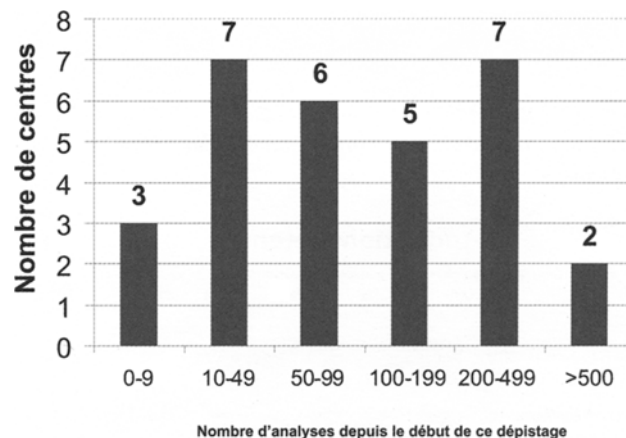


Figure 8 : Nombre d'analyses de microdélétions du chromosome Y réalisées depuis le début de cette activité.

« Y Chromosome Deletion Detection System, version 1.1 », et 8 centres (28%) suivent les recommandations européennes de l'European Academy of Andrology (EAA) et la Société Française de Génétique Humaine (www.sfgh.net/public/infertilite.asp) [33]. La majorité des laboratoires (20 sur 27 réponses) pratiquent des techniques dites en « multiplex », c'est-à-dire associant plusieurs marqueurs amplifiés dans un même tube de PCR, mais parfois

Tableau 1 : Activité des laboratoires

	Nombre de détections depuis le début (29 centres)	Nombre de détections en 2000 (24 centres)	Nombre de marqueurs (29 centres)
nombre total	10399	2617	
moyenne par centre	359	90	9
écartype	570	144	5
minimum	3	3	2
maximum	3000	750	22

Tableau 2 : Facturation et coût estimé de la recherche de microdélétions du chromosome Y dans les 17 centres.

	Facturation appliquée	Prix de revient estimé	
	(BHN)	(Euros)	(F)
moyenne	600	79	517
écart-type	469	87	574
médiane	500	45,7	300
minimum	200	6,1	40
maximum	2350	305	2000
nombre de centres	17	11	11

parallèlement avec des techniques « simplex » ou « duplex ». Trois laboratoires n'analysent leurs marqueurs qu'en technique simplex.

b) Méthodologie d'analyse

Certains laboratoires font une première recherche avec un nombre limité de marqueurs, puis après détection d'une microdélétion, dans un second temps, affinent les bornes et l'étendue de cette délétion avec une série de marqueurs supplémentaires. Le nombre de marqueurs utilisés pour le dépistage en première intention, et en deuxième intention pour déterminer l'étendue de la délétion, est très variable d'un centre à l'autre (Figure 10). Les gènes « contrôle » utilisés sont variables d'un centre à l'autre (29 réponses) : le gène SRY est utilisé par 22 centres et le gène ZFY par 7 centres. Un centre utilise un gène autosomique (non précisé) et un autre utilise DAZLA. Deux centres se servent d'un gène du chromosome X. Les sujets « contrôle » utilisés sont également très variables d'un laboratoire à l'autre (Figure 11) : l'utilisation comme témoin de réactivité de la réaction de l'ADN d'un homme normal n'est pas systématique. Deux laboratoires n'utilisent pas de témoin négatif

(tube sans ADN). Également, le recours à des témoins de spécificité de la réaction (ADN de femme, ADN d'homme avec microdélétion) varie beaucoup selon les laboratoires.

c) Résultats obtenus

En ce qui concerne les résultats de cette recherche, en termes de nombre de positifs sur le nombre de patients testés, le pourcentage de microdélétions détectées varie de 1 à 22 %, soit 8 % en moyenne (n = 25 réponses), ce qui est conforme aux données de la littérature [25]. Ces chiffres sont à interpréter en fonction du nombre d'analyses effectuées depuis le début de leur activité par chaque laboratoire : à la date de l'enquête, ce nombre d'analyses effectuées allait de 2 à plus de 500 (Figures 8 et 9).

d) Appréciation des laboratoires

Dans l'ensemble, la plupart des laboratoires sont satisfaits de leur technique (23/27). Certains souhaiteraient modifier les marqueurs utilisés : augmentation du nombre de marqueurs (11/18), développement de Multiplex (5/17), marqueurs plus informatifs ou mieux sélectionnés (2/17). La majorité des laboratoires serait favorable à un échange d'é-

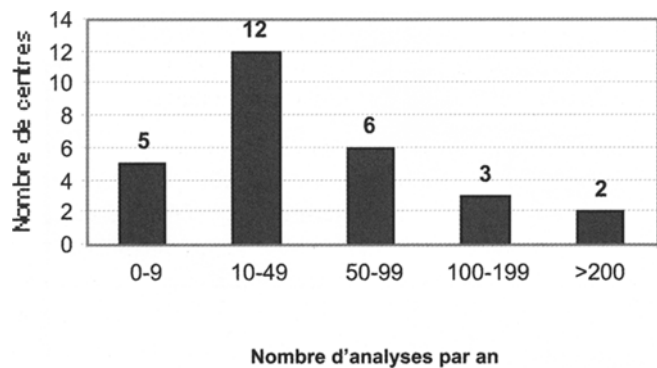


Figure 9 : Nombre total estimé d'analyses de recherche de microdélétions du chromosome Y au cours de l'année précédente.

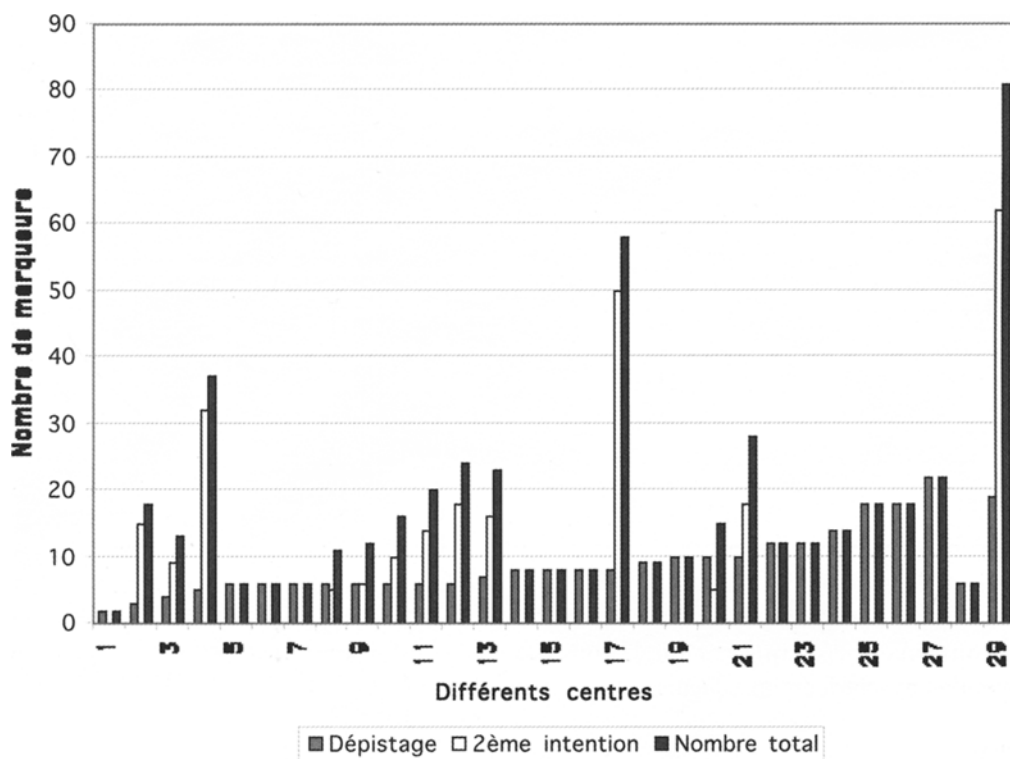


Figure 10 : Nombre de marqueurs utilisés pour la recherche de microdélétions du chromosome Y.

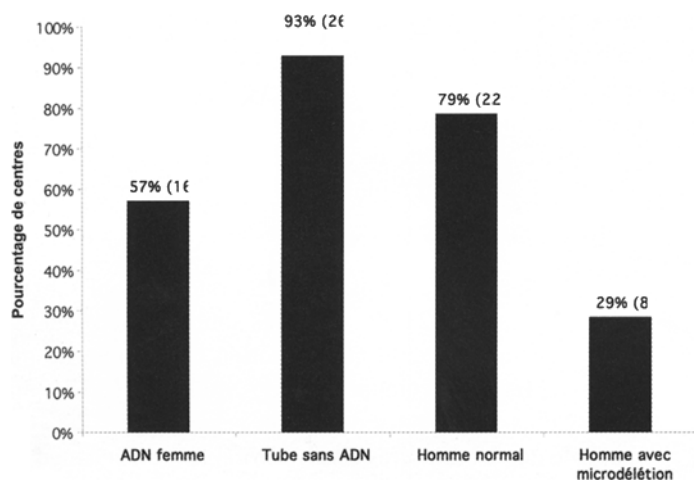


Figure 11 : Pourcentage de centres utilisant au moins un des 4 types de « contrôles » (28 réponses).

chantillons positifs (15/20). Parallèlement, d'une manière générale, l'idée d'un contrôle de qualité national ou international est accueillie favorablement : les laboratoires accepteraient de participer à un contrôle de qualité international (17/29) ou à un contrôle de qualité national (16/29), avec 4 centres sans opinion ; seulement 8 laboratoires accepteraient de participer aux deux types de contrôle de qualité (national et international).

Pour ce qui est de la facturation, 17 réponses ont été obtenues sur les 29 laboratoires pratiquant ce diagnostic moléculaire (soit un taux de réponse de 59%). Cette analyse (Tableau 2) est facturée en moyenne 606 BHN (de 200 à 2350 BHN).

IV. DISCUSSION

La détection des microdélétions du chromosome Y est conseillée en cas de troubles sévères de la spermatogenèse, en particulier dans le bilan préalable à l'ICSI. Le nombre de centres prescripteurs est en augmentation constante et forte depuis 1996. Cette analyse a suscité l'intérêt d'une majorité de cliniciens et de biologistes de la reproduction, puisque, concernant 15% des azoospermies et 10% des oligozoospermies « sécrétoires idiopathiques », la microdélétion du chromosome Y est la plus fréquente des anomalies géniques dans le domaine de l'infertilité masculine [18, 23, 27]. De manière générale, les prescripteurs sont cliniciens (gynécologues ou urologues) et biologistes. La majorité des centres fonctionnent avec 2 à 5 prescripteurs. L'analyse de la littérature souligne que les microdélétions sont retrouvées presque exclusivement chez les patients présentant moins d'un million de spermatozoïdes par ml et extrêmement rarement au-dessus du seuil de 5 millions de spermatozoïdes par ml (approximativement 0,7%) [20, 35]. En accord avec les recommandations européennes de l'EAA, les azoospermies de cause sécrétoire représentent ainsi 54% des demandes. En revanche, si les recommandations européennes ont fixé à moins de 5 millions/ml le seuil en dessous duquel la recherche des microdélétions est pertinente, 39% des prescripteurs ne prescrivent qu'en deçà de 1 million de spermatozoïdes par millilitre et 21% ne retiennent en aucune façon l'indication d'oligozoospermie. Alors que les microdélétions apparaissent *de novo* dans la très grande majorité des cas, plusieurs centres considèrent, de façon paradoxale, la notion d'infertilité familiale comme indication principale de cette recherche.

Parallèlement aux centres prescripteurs, le nombre de laboratoires effectuant cette analyse, ainsi que leur activité, sont en hausse forte et constante. Depuis la clôture de cette enquête, 4 centres ne disposant pas de cette analyse localement ont mis en place et débuté ce diagnostic moléculaire. Plus de 10000 analyses ont ainsi été effectuées depuis 1996 dans les 29 laboratoires ayant répondu à l'enquête,

dont plus de 2500 tests au cours de la seule année 2000 (Tableau 1). On peut noter que la plupart des laboratoires ont la possibilité d'interpréter leurs résultats en fonction des paramètres clinico-biologiques du patient.

Parallèlement à l'expansion de cette analyse, près de la moitié des prescripteurs en AMP (42%), en majorité dans le secteur privé, ne proposent pas la recherche des microdélétions du chromosome Y. Les questions liées à la technique ou à l'absence de consensus sur le choix des marqueurs analysés sur le chromosome Y sont rarement incriminées. La raison la plus souvent invoquée est l'absence de laboratoire de biologie moléculaire de proximité effectuant cet examen (60% des cas). Or, il est fréquent d'expédier les prélèvements pour analyses génétiques vers des laboratoires spécialisés dits « centres référents » de niveau 1, voire 2 (ex : mucoviscidose). Cette première raison de non-prescription peut donc sembler discutable. Le coût élevé de ce test (43% des réponses), en l'absence de cotation par la Sécurité Sociale, est le second motif de non prescription. La grande variabilité de la cotation de cette analyse d'un centre à l'autre est le reflet du problème global de carence de la Nomenclature dans les actes de Biologie Moléculaire. En théorie, la cotation en B ne peut se faire que pour des analyses qui ouvrent à un diagnostic prénatal (mucoviscidose, myopathie, X-fragile, ...). Dans le cas des microdélétions du chromosome Y, il s'agit d'une « maladie » génétique transmissible, même si le coût social est bien inférieur à celui de la mucoviscidose. De ce fait, chaque centre adopte sa propre politique. Le financement est souvent assuré par la recherche dans le domaine public, ce qui explique que le « Public » soit plus prescripteur que le « Privé ». En dehors de protocoles de recherche, de durée le plus souvent limitée, cette analyse est à la charge du patient (structure privée) ou de l'hôpital (secteur public).

L'utilité de ce test est mise en doute par les non-prescripteurs qui soulignent l'absence de conséquence d'un diagnostic positif de microdélétion du chromosome Y sur la prise en charge du couple (36%). Il est bon de rappeler que le diagnostic d'une microdélétion du chromosome Y modifie la prise en charge du patient, car une congélation de sperme à titre préventif peut être recommandée sur la base des publications ayant rapporté une décroissance de la numération spermatique chez les patients porteurs de délétions en AZFc [12, 30, 34]. De plus, un diagnostic positif de microdélétion aura un intérêt pronostique quant à la pertinence d'une biopsie testiculaire selon le type de délétion trouvée [3, 6, 10, 17, 21] ou bien quant à l'utilité d'une intervention chirurgicale sur un varicocèle [4]. Dans près d'un quart des réponses, les non-prescripteurs relèvent la difficulté du conseil génétique après mise en évidence d'une microdélétion du chromosome Y. En fait, le conseil génétique sera mieux adapté [7] : même si l'on ne peut pas

prédire le phénotype du fils conçu par ICSI, la délétion est obligatoirement transmise [5, 11, 15, 16, 24] et une surveillance dès la puberté pourrait préconiser une congélation de sperme à titre préventif [39].

Il faut mentionner également la mise en évidence de gamètes nullosomiques pour les chromosomes sexuels chez des patients porteurs de microdélétions [14, 32], pouvant aboutir à la conception d'embryons présentant un syndrome de Turner ou des ambiguïtés sexuelles. L'inverse a également été récemment mis en évidence : une microdélétion du chromosome Y en AZFc a été mise en évidence chez 33% des sujets présentant un phénotype de type Turner avec ambiguïtés sexuelles et un caryotype 45,X/46,XY [26]. Enfin, les microdélétions du chromosome Y pourraient figurer parmi les nouvelles indications théoriques de Diagnostic Pré-Implantatoire [19].

Sur le plan technique, notre enquête souligne l'absence de consensus dans la réalisation de cette analyse, plus de la moitié des centres effectuant une technique « maison » validée uniquement par le laboratoire qui l'a mise au point. On peut supposer que ce sont des laboratoires qui ont l'habitude de développer des techniques. La majorité des laboratoires pratiquent des techniques en multiplex ce qui permet un gain de temps, et même si des difficultés techniques ont été largement décrites [2, 13, 36]. Seulement un quart des centres suit les recommandations européennes qui permettent pourtant de détecter plus de 95% des délétions symptomatiques, car il n'existe aucun Kit commercialisé prêt à l'emploi, conforme à ces recommandations [33]. Le seul Kit commercialisé est peu fiable, très cher et n'explore pas correctement la région AZFa [1]. Quatorze laboratoires sur 29 pratiquent la recherche des microdélétions en 2 temps (mais représentent 62% du volume global d'analyses), alors que 17 laboratoires font le diagnostic sans préciser l'étendue de la microdélétion détectée. Cette observation permet d'envisager une cotation « double » de cet acte : « Détection – Mesure de l'étendue des microdélétions du chromosome Y ». Tout en étant satisfaits de leur technique, les laboratoires sont globalement ouverts à une évolution vers une augmentation du nombre de marqueurs. Ceci est dû au fait que 1) la connaissance de cette portion non-recombinante du chromosome Y (95 %) s'enrichit de jour en jour au niveau des séquences répétitives et des palindromes très abondants et que 2) de nouveaux marqueurs sont élaborés pour affiner de façon plus précise les sous-régions présentes [8, 22, 29, 31, 38]. En ce qui concerne la fréquence des microdélétions, de nombreuses revues de la littérature s'accordent sur les moyennes admises 10 à 15 % dans les azoospermies, 5 à 10 % dans les oligozoospermies [18, 23, 27].

V. CONCLUSION

La recherche des microdélétions du chromosome Y, conseillée en cas de troubles sévères de la spermatogénèse par de nombreuses sociétés savantes nationales – Société Française de Génétique Humaine - et internationales – European Society of Human Reproduction and Embryology, European Andrology Academy, American Urological Association [13] –, connaît un essor récent. L'activité de détection des microdélétions est en croissance régulière et ce, malgré le problème de financement de ce test. Cependant, cette analyse suscite encore de nombreuses questions. L'évolution vers un consensus sur les indications et vers une technique standardisée, soumise à un contrôle de qualité national, serait souhaitable [1]. La reconnaissance et la cotation de cette analyse par les organismes d'Assurance Maladie apparaissent comme une étape essentielle à sa généralisation en routine. Enfin, l'analyse des réponses à ce questionnaire a révélé une forte demande de diffusion d'information sur ce sujet, tant de la part des praticiens (qu'ils soient prescripteurs ou non) que des laboratoires, en ce qui concerne les indications, les méthodes, les facturations, les centres disponibles.

Remerciements :

Nous remercions tous les praticiens qui ont participé à la collection des données et qui ont pris de leur temps précieux pour répondre à ces questionnaires : Mesdames et Messieurs ALLART, ALPHANDARI, AMAR, AMICE, AMOUROUX, ANTOINE, ASSOUN, AUDEBERT, AYOUBI, BALLOT, BARBARINO-MONNIER, BARBEAULT, BATIST, BAZIN, BELAISCH-ALLART, BELAS, BENTOLBA, BERGERE, BERNARD, BIED-DAMON, BIENVENU, BIGNON, BITTARD, BLACHE, BLAYAU, BONCAIN, BOUCHER, BOUCHET, BOUCHOT, BOULANGER, BOURDREL, BOURRINET, BOUTRAND, BUJAN, BULWA, BUVAT, CAMIER, CARBASSE, CARLE, CARREPIGEON, CASSUTO, CHABAUD, CHABERT, CHANSIGAUD, CHAUVEL, CHELLOUG, CHIESA, CHINCHOLLE, CHOURAQUI, CHOUTEAU, CHRETIEN, CLEMENT, COLLET, COLLEU, CORNILLET-LEFEBVRE, COSTA, COUS, COUSIN, CRISTOFARI, DANIEL, DAVID, de MAZANCOURT, DECLERCQ, DEFOSSEZ, DEGOY, DEMAEGHT, DENIS, DEROUBAIX, DESHAYES, DESHORGUE, DIEUSAERT, DONZEAUPUONS, DOSSOT, DREYFUS, DUJARDIN, DUMAS, DUMONT, ELMOUTASSIM, EMARD, EMPERAIRE, FANCHIN, FELLMANN, FELLONI, FLORET, FRYDMAN, GABRIEL, GIACOMINI, GILLIOZ, GRALL, GRANET, GRELAT, GRILLO, GRILLOT, GRIVEAU, GUEDJ, GUNEDAL, GUIBERT, GUICHAOUA, GUILLET-MAY,

GUITTARD, HAERTIG, HEDON, HELLERINGER, HEN-NEBICQ, HERBAUT-BUVAT, HOCKE, HOROVITZ, HUBERT, HUMEAU, IZARD, JIMENEZ, KABLA, KEPPI, KITZIS, KRICESK, LA MARCA-ROTH, LAFFY, LAFONT, LANSAC, LARUE, LE LANNOU, LEFAURE, LELAIDIER, LEMONON, LEULIER, LEVY, LIQUIER, LOMBROSO, MAINARDI, MALINGE, MARIE, MARPEAU, MARTEL-PETIT, MARTOLIN, McELREAVEY, MISRAHI, MOIZARD, MOLIA, MONTAIGNE, MORIZOT, MOUSSU, NAVARRO, NISAND, PAPAXANTHOS, PAQUIS, PATRAT, PAULHAC, PETIT, PFEFFER, PIERROT, PISON-ROUSSEAU, PLACHOT, PLESSIS, POIROT, POULY, QUANTIN, RAGAGE, REGNIER, RENTO, RIGOT, RIVES, ROCABOY, ROSE, ROUX, ROYERE, SAGE, SARROT, SAUDIN, SCHWEITZER, SELVA, SIBERT, SIFFROI, SIMON-BOUY, STORA DE NOVION, SZERMAN, SZYMANOWICZ, TERRIOU, TEYSSIER, THEPOT, TRIBALAT, TRONG PHONG, UTHURRIAGUE, VALLEE, VELEZ DE LA CALLE, VERJUT, VIALARD, VIGOUROUX, VILLEZ, ZITOUN, ZORN.

REFERENCES

- AKNIN-SEIFER I.E., TOURAINE R.L., LEJEUNE H. et al. : A simple, low cost and non-invasive method for screening Y-chromosome microdeletions in infertile men. *Hum. Reprod.*, 2003, 18 : 257-261.
- BOR P., HINDKJAER J., INGERSLEV H.J., KOLVRAA S. : Multiplex PCR for screening of microdeletions on the Y chromosome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2001, 18 : 291-298.
- BRANDELL R.A., MIELNIK A., LIOTTA D. et al. : AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction : preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 2812-2815.
- CAYAN S., LEE D., BLACK L.D., REIJO PERA R.A., TUREK P.J. : Response to varicocelelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology*, 2001, 57 : 530-535.
- CRAM D.S., MA K., BHASIN S. et al. : 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.*, 2000, 74 : 909-915.
- DE VRIES J.W., REPPING S., VAN DAALEN S.K. et al. : Clinical relevance of partial AZFc deletions. *Fertil. Steril.*, 2002, 78 : 1209-1214.
- DOHLE G.R., HALLEY D.J., VAN HEMEL J.O. et al. : Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 13-16.
- FERLIN A., MORO E., ROSSI A., DALLAPICCOLA B., FORESTA, C. : The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region : sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J. Med. Genet.*, 2003, 40 : 18-24.
- FOOTE S., VOLLRATH D., HILTON A., PAGE D.C. : The human Y chromosome : overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science*, 1992, 258 : 60-66.
- FORESTA C., MORO E., FERLIN A. : Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1543-1547.
- GATTA V., STUPPIA L., CALABRESE G. et al. : A new case of Yq microdeletion transmitted from a normal father to two infertile sons. *J. Med. Genet.*, 2002, 39 : E27.
- GIRARDI S.K., MIELNIK A., SCHLEGEL P.N. : Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 1635-1641.
- HENEGARIU O., HEEREMA N.A., DLOUHY S.R., VANCE G.H., VOGT P.H. : Multiplex PCR : critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 1997, 23 : 504-511.
- JARUZELSKA J., KORCZ A., WOJDA A. et al. : Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. *J. Med. Genet.*, 2001, 38 : 798-802.
- KAMISCHKE A., GROMOLL J., SIMONI M., BEHRE H.M., NIESCHLAG E. : Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection : case report. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 2320-2322.
- KENT-FIRST M.G., KOL S., MUALLEM A. et al. : The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2 : 943-950.
- KLEIMAN S.E., MAYMON B.B., YOGEV L., PAZ G., YAVETZ H. : The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 399-402.
- KOSTINER D.R., TUREK P.J., REIJO R.A. : Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 3032-3038.
- KRAUSZ C., FORTI G., MCELREAVEY K. : The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int. J. Androl.*, 2003, 26 : 70-75.
- KRAUSZ C., MCELREAVEY K. : Y chromosome and male infertility. *Front. Biosci.*, 1999, 4 : E1-8.
- KRAUSZ C., QUINTANA-MURCI L., MCELREAVEY K. : Prognostic value of Y deletion analysis : what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis ? *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1431-1434.
- KURODA-KAWAGUCHI T., SKALETSKY H., BROWN L.G. et al. : The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.*, 2001, 29 : 279-286.
- MARTINEZ M.C., BERNABE M.J., GOMEZ E. et al. : Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J. Androl.*, 2000, 21 : 651-655.
- OATES R.D., SILBER S., BROWN L.G., PAGE D.C. : Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2813-2824.
- PATRAT C., BIENVENU T., JOUANNET P. : Microdélétions du chromosome Y et infertilité masculine. *Ref. Gynecol. Obstet.*, 2001, 8 : 13-20.

26. PATSALIS P.C., SISMANI C., QUINTANA-MURCI L. et al. : Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet*, 2002, 360 : 1222-1224.
27. PETERLIN B., KUNEJ T., SINKOVEC J., GLIGORIEVSKA N., ZORN B. : Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 17-24.
28. REIJO R., LEE T.Y., SALO P. et al. : Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.*, 1995, 10 : 383-393.
29. REPPING S., SKALETISKY H., LANGE J. et al. : Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 71 : 906-922.
30. SAUT N., TERRIOU P., NAVARRO A., LEVY N., MITCHELL, M.J. : The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6 : 789-793.
31. SAXENA R., DE VRIES J.W., REPPING S. et al. : Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics*, 2000, 67 : 256-267.
32. SIFFROI J.P., LE BOURHIS C., KRAUSZ C. et al. : Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2559-2562.
33. 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.
34. SIMONI M., GROMOLL J., DWORNICZAK B. et al. : Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, 1997, 67 : 542-547.
35. SIMONI M., KAMISCHKE A., NIESCHLAG E. : Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 1764-1768.
36. THORNHILL A.R., GUENTHER A.J., BARBAROTTO G.M. et al. : False-positive Y-microdeletion result for a fertile male caused by an alteration under a PCR primer. *Int. J. Androl.*, 2002, 25: 352-357.
37. TIEPOLO L., ZUFFARDI O. : Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, 1976, 34 : 119-124.
38. TILFORD C.A., KURODA-KAWAGUCHI T., SKALETISK H. et al. : A physical map of the human Y chromosome. *Nature*, 2001, 409 : 943-945.
39. TOTH A., TARDY E.P., GOMBOS S. et al. : AZFc deletion detected in a newborn with prenatally diagnosed Yq deletion. *Prenat. Diagn.*, 2001, 21 : 253-255.
40. VOGT P.H., EDELMANN A., KIRSCH S. et al. : Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5 : 933-943.
41. VOLLRATH D., FOOTE S., HILTON A. et al. : The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 1992, 258 : 52-59.

Screening for Y chromosome microdeletions in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres sponsored by the SALF (Société d'Andrologie de Langue Française)

**Isabelle Esther AKNIN-SEIFER, Hervé LEJEUNE,
Renaud Laurian TOURAINE,
Rachel LEVY**

Screening for Y chromosome microdeletions is recommended in cases of severe impaired spermatogenesis. Improvement of molecular biology techniques has made this diagnosis more accessible in routine practice when evaluation of male infertility is necessary. However, the diagnosis of Y chromosome microdeletions is not proposed by all IVF centres. The aim of the present study was to specify the prescribing conditions (indication, financing) and practical conduct (methods, billing) for this analysis in France. We observed that microdeletion screening is a rapidly expanding activity. The development of a consensus on the indications for this screening and a standardised technique, with a national quality control, appears to be necessary. The funding of this analysis by French Social Security appears to be an essential step to ensure widespread use in routine practice. Lastly, the answers to our questionnaire revealed a strong demand for information concerning this analysis.

Key-Words: *Y chromosome, survey, France, male infertility, microdeletions*

Manuscrit reçu : mai 2003 ; accepté septembre 2003.