

# Syndrome de Klinefelter et AMP à l'aube de l'an 2000

S. HENNEBICQ<sup>1-2</sup>, S. ROUSSEAU<sup>2</sup>, R. PELLETIER<sup>2</sup>, B. SELE<sup>1-2</sup>

1. CECOS-CHU de Grenoble, Hôpital Civil, 38700 LA TRONCHE

2. Unité INSERM 309, Institut A Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 LA TRONCHE Cedex

## RÉSUMÉ

Parmi les anomalies cytogénétiques, le syndrome de Klinefelter est la plus fréquente des anomalies chromosomiques associées à une infertilité masculine. Il concerne environ un nouveau-né mâle sur 600. Sa fréquence est de 3% dans la population des hommes infertiles et près de 12% des sujets azoospermiques présentent un syndrome de Klinefelter. Il y a quelques années, la seule possibilité de procréation pour ces couples était de recourir au don de sperme.

Depuis l'avènement des techniques de fécondation *in vitro* avec microinjection, il est possible d'obtenir *in vitro* une fécondation oocytaire dans des cas d'oligozoospermie extrême. Par ailleurs, la possibilité de recueillir des spermatozoïdes chirurgicalement au niveau épидидymaire ou testiculaire élargit les indications des infertilités pouvant bénéficier d'une AMP intraconjugale. Ainsi, il est actuellement possible de proposer une AMP intraconjugale à certains couples, dont le conjoint est porteur d'un syndrome de Klinefelter, dès lors que quelques spermatozoïdes mobiles peuvent être obtenus, soit dans l'éjaculat, soit au niveau testiculaire. Cependant, le recours à ces techniques dans le cas d'une aneuploïdie des cellules germinales pose le problème de la transmission de cette aneuploïdie à la descendance et du risque de stérilité de la descendance masculine. Ainsi, dans le cas du syndrome de Klinefelter, la transmission du chromosome X surnuméraire peut, en théorie, conduire à la naissance d'un garçon atteint de syndrome de Klinefelter ou d'une fille de caryotype 47XXX. Ce risque est directement lié au pourcentage

de spermatozoïdes aneuploïdes 24XY ou 24XX. Ce pourcentage peut être évalué actuellement par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (Fluorescent In Situ Hybridization ou FISH) sur spermatozoïdes et des résultats peu nombreux et très variables sont recensés dans la littérature.

Nous présentons dans ce travail, les résultats obtenus pour un patient porteur d'un syndrome de Klinefelter à caryotype homogène et les données de la littérature concernant la ségrégation des chromosomes sexuels chez les patients porteurs de syndrome de Klinefelter. Dans le cas de notre patient, le taux de cellules aneuploïdes 24XY est environ dix fois plus élevé que le taux retrouvé pour les sujets témoins. Par ailleurs, l'analyse des données bibliographiques, apporte des éléments de réponses à quelques questions pratiques qui se posent lorsqu'on envisage une FIV avec microinjection chez ces patients :

- existe-t-il des critères morphologiques de choix des spermatozoïdes à injecter rendant compte du risque d'aneuploïdie cellulaire?
- le risque d'aneuploïdie augmente-t-il si l'on utilise des spermatozoïdes testiculaires?

Par ailleurs, plusieurs naissances sont actuellement rapportées après FIV avec microinjection pour des patients porteurs de syndrome de Klinefelter. Enfin, dans le cadre du conseil génétique, la place du diagnostic prénatal et/ou préimplantatoire est à discuter.

**Mots clés :** aide médicale à la procréation, chromosomes sexuels, fécondation *in vitro*, hybridation *in situ* en fluorescence, micro-injection, ségrégation des chromosomes, syndrome de Klinefelter

## INTRODUCTION

Le développement actuel des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) permet de proposer des modalités de procréation assistée intraconjugale pour des infertilités de plus en plus sévères. Ainsi, la fécondation *in vitro* (FIV) avec micro-injection permet d'obtenir *in vitro* une fécondation ovocytaire dans des cas d'oligozoospermie extrême. Par ailleurs, la possibilité de recueillir des spermatozoïdes chirurgicalement au niveau épидидymaire ou testiculaire élargit considérablement les indications des infertilités pouvant bénéficier d'une AMP intraconjugale. Ces techniques de microinjection avec sperme chirurgical sont performantes pour les azoospermies excrétoires mais leur réussite est moins fréquente pour les azoospermies sécrétoires, du fait de l'absence totale de spermatozoïdes dans certains cas. Dans ces situations, il a déjà été envisagé de recourir à la micro-injection de cellules en cours de différenciation (spermatides par exemple). Les possibilités thérapeutiques dépendent alors de la gravité de l'atteinte de la spermatogénèse.

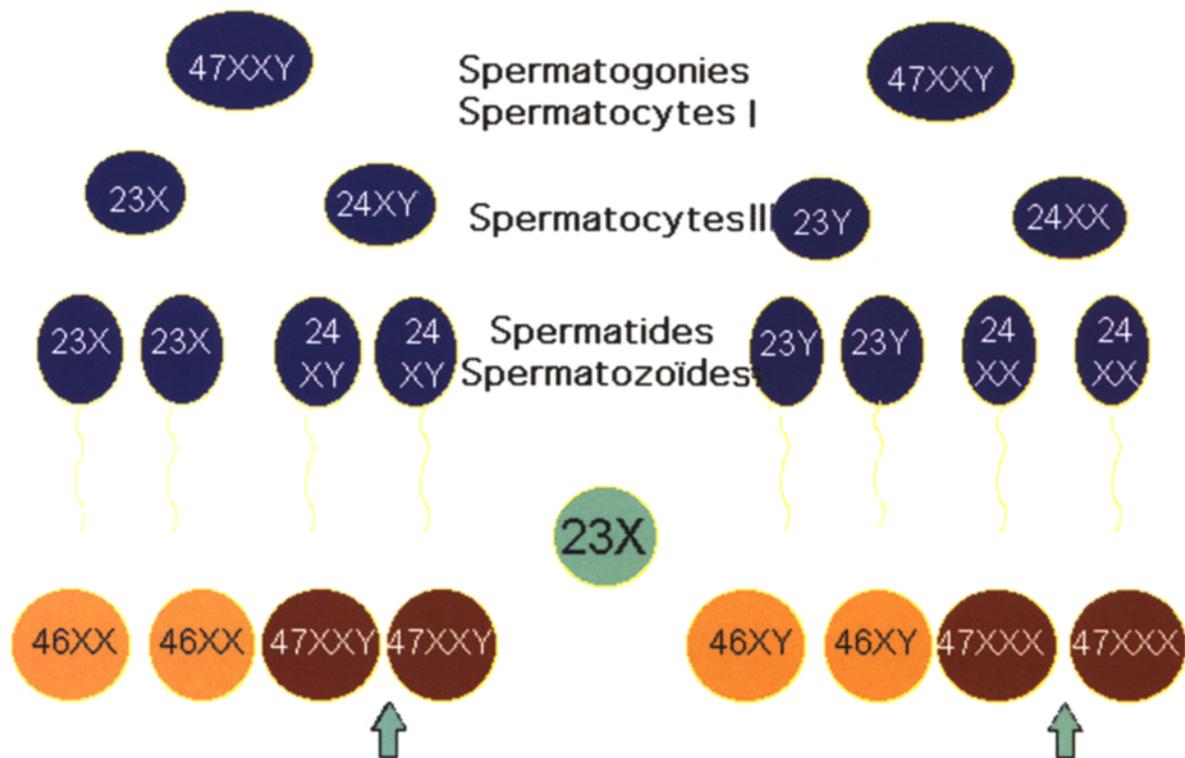
Le syndrome de Klinefelter est la plus fréquente des anomalies chromosomiques associées à une infertilité masculine. Il concerne environ un nouveau-né mâle sur 600. Sa fréquence est de 3% dans la population des hommes infertiles et près de 12% des sujets azoospermiques présentent un syndrome de Klinefelter [9; 28]. Le syndrome est caractérisé par l'existence d'un ou plusieurs chromosomes X surnuméraire(s), soit au niveau de toutes les cellules (atteinte homogène, caryotype somatique 47, XXY), soit au niveau d'une partie des cellules de l'individu uniquement (atteinte en mosaïque, caryotype somatique 46XY/47XXY le plus souvent). Environ 15% des sujets Klinefelter présentent un caryotype en mosaïque [16]. Au plan clinique on observe une grande variabilité du phénotype qui peut inclure une grande taille, un hypogonadisme avec testicules hypotrophiques et une atteinte plus ou moins sévère de la spermatogénèse. Cependant, la plupart des patients présentant un caryotype homogène sont azoospermiques.

Il y a quelques années, la seule possibilité de procréation pour ces couples était de recourir

au don de sperme. Depuis l'avènement des techniques de fécondation *in vitro* avec micro-injection, il est possible de proposer une AMP intra-conjugale à ces couples, dont le conjoint est porteur d'un syndrome de Klinefelter. En effet, les techniques de FIV avec micro-injection peuvent être proposées aux patients atteints de syndrome de Klinefelter, dès lors que quelques spermatozoïdes mobiles peuvent être obtenus, soit dans l'éjaculat, soit au niveau testiculaire. Cependant, le recours à ces techniques dans le cas d'une aneuploïdie des cellules germinales pose le problème de la transmission de cette aneuploïdie à la descendance. En effet, chez les sujets porteurs d'une mosaïque (46XY/47XXY) on a longtemps pensé que seules les cellules diploïdes 46XY pouvaient effectuer leur méiose [17, 27], mais les travaux de Cozzi *et al* [7] ou Chevret *et al* [6] ont montré que les cellules 47XXY pouvaient également achever leur méiose. Ainsi, dans le cas du syndrome de Klinefelter, la transmission du chromosome X surnuméraire peut, en théorie, conduire à la naissance d'un garçon atteint de syndrome de Klinefelter ou d'une fille de caryotype 47XXX (Figure 1). Ce risque est directement lié au pourcentage de spermatozoïdes aneuploïdes 24 XY ou 24 XX. Actuellement, ce pourcentage peut être évalué par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur spermatozoïdes.

Dans le cadre de notre activité de Biologie de la Reproduction, nous avons eu l'occasion de prendre en charge la demande d'assistance médicale à la procréation d'un sujet oligozoospermique, atteint d'un syndrome de Klinefelter homogène. Le couple était très demandeur de procréation intra-conjugale et une FIV avec micro-injection s'avérait techniquement réalisable compte tenu de la présence de quelques spermatozoïdes dans l'éjaculat. Nous avons donc tenté d'évaluer le risque de transmission d'une aneuploïdie à la descendance afin de conseiller au mieux ce couple quant à la concrétisation de leur désir parental (FIV-ICSI ou AMP avec tiers donneur). A cette fin, une étude de la ségrégation des chromosomes sexuels par FISH sur spermatozoïdes a été réalisée chez ce patient.

Nous présentons dans ce travail, les résultats



**Figure 1 : Représentation théorique de la ségrégation des chromosomes sexuels et du risque d'aneuploïdie après fécondation pour les cellules 47XXY**

obtenus pour ce patient et les données de la littérature concernant la ségrégation des chromosomes sexuels chez les patients porteurs d'un syndrome de Klinefelter. Ensuite, par une approche bibliographique, nous tenterons d'apporter des réponses à quelques questions pratiques qui se posent quant à l'indication et la réalisation d'une FIV avec micro-injection chez ces patients. Par ailleurs, plusieurs naissances ayant déjà été obtenues, nous nous intéresserons au caryotype des enfants nés et des embryons obtenus et poserons la question du recours au diagnostic génétique anténatal et/ou préimplantatoire.

## I. MATERIEL ET METHODES

### 1. Patient étudié et sujets témoins

Le patient atteint de syndrome de Klinefelter est un homme de 34 ans. Il présente une hypotrophie testiculaire bilatérale, avec volume testiculaire inférieur à 5 mL. Il n'y a pas de gynécomastie.

Les paramètres spermatiques sont les suivants  
**volume** = 2,5 mL

**numération des spermatozoïdes**  
 = < 0,1 million/mL

**mobilité** = 30% de spermatozoïdes à mobilité progressive diminuée (MPD)

la tératospermie n'a pas pu être évaluée, étant donnée la faible numération.

Sur le plan biologique, on note une FSH élevée à 12,1 mU/mL (technique immunoradiométrique) et une testostérone abaissée à 7 nmol/L pour la testostérone totale et 38,5 pmol/L pour la testostérone libre. La testostérone binding globulin est normale à 27,4 nmol/L.

Le caryotype somatique est homogène : 47, XXY, évalué sur 16 mitoses.

Etant donnée la présence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, il n'a pas été réalisé d'exploration testiculaire chirurgicale.

Deux témoins ont été analysés en même temps. Il s'agit de sujets fertiles de 21 et 23 ans, dont les paramètres spermatiques sont les suivants :

	TÉMOIN 1	TÉMOIN 2
<b>volume =</b>	3 mL	4,9 mL
<b>numération =</b>	70 millions/mL	60 millions/mL
<b>mobilité =</b>	40% de spermatozoïdes mobilité progressive diminuée	50% majorité de spermatozoïdes à à mobilité progressive normale
<b>tératospermie =</b>	46% de formes atypiques	44% de formes atypiques

## 2. Technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Il s'agit de la technique décrite par Chevret *et al* [5]. Cette technique d'hybridation *in situ* en fluorescence est réalisable aussi bien à partir de sperme frais, que sur sperme après congélation.

Trois sondes ont été utilisées, spécifiques des régions centromériques des chromosomes X, Y et 1. Il s'agit de sondes plasmidiques. L'utilisation d'une sonde spécifique d'un autosome permet de différencier les cellules disomiques (24XY, 24XX, 24YY) qui présentent un seul signal d'hybridation pour le chromosome 1, des cellules diploïdes (46XY, 46XX et 46YY) qui présentent deux signaux pour ce même chromosome.

Les sondes ont été marquées par translation de coupure, la sonde X par la digoxigénine, Y par la biotine et la sonde spécifique du chromosome 1 par un mélange digoxigénine+biotine. Le mode de révélation en fluorescence fait appel à un système avidine-FITC/anticorps anti-avidine-FITC et à un anticorps anti-digoxigénine marqué à la rhodamine. L'hybridation est réalisée sur frottis de spermatozoïdes décondensés. Cette étape de décondensation est cruciale, car elle conditionne la qualité de l'hybridation, tant au plan du rendement d'hybridation, que de la spécificité de détection. En effet, une décondensation insuffisante ne permet pas l'accès des sondes aux sites d'hybridation et en revanche, si la décondensation est trop importante, on observe un étalement des signaux d'hybridation qui rend la lecture des lames difficile, voire impossible.

## II. ETUDE DE LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES SEXUELS

L'analyse des spermatozoïdes par technique d'hybridation en fluorescence a été réalisée à

partir d'un recueil de sperme congelé. Des spermatozoïdes haploïdes (23X ou 23Y) et aneuploïdes (24XY) observés en FISH pour le patient porteur d'un syndrome de Klinefelter, sont présentés dans la figure 2. Les résultats chiffrés sont résumés dans le tableau I. Cinq cent deux spermatozoïdes ont été analysés pour le patient Klinefelter et environ 10 000 pour chaque témoin. Le taux de cellules aneuploïdes 24XY est environ 10 fois plus élevé dans les spermatozoïdes du patient, comparé aux témoins.

La proportion de spermatozoïdes 24XY chez ce patient, bien que dix fois supérieure à celle des sujets témoins, reste relativement faible par rapport au risque théorique présenté dans la figure 1 (3,6% vs 25%). Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. La première est l'existence d'une mosaïque au niveau germinale, avec présence de cellules germinales souches euploïdes (46XY), subissant la méiose et donnant naissance à des spermatozoïdes haploïdes 23X et 23Y, ce qui expliquerait la proportion relativement faible de spermatozoïdes aneuploïdes chez ce patient. La deuxième hypothèse envisageable est la perte du chromosome surnuméraire au cours de la méiose, dans une certaine proportion de cellules 47XXY, comme cela a été démontré pour les cellules germinales de patientes 47XXX ou de patients 47XYY [3, 18, 16].

Les taux d'hyperhaploïdie gamétique que nous avons observé sont du même ordre de grandeur que ceux publiés par d'autres (Tableau II). Cependant ces taux sont très variables selon les sujets. Ceci est à rapprocher de la variabilité phénotypique du syndrome de Klinefelter, qui pourrait s'accompagner d'une grande variabilité du contenu chromosomique. Ainsi, dans le cas de syndromes en mosaïque, les pourcentages respectifs de cellules 46XY et 47XXY au niveau somatique peuvent être très

spermatozoïde 23X      spermatozoïde 23Y      spermatozoïde 24XY

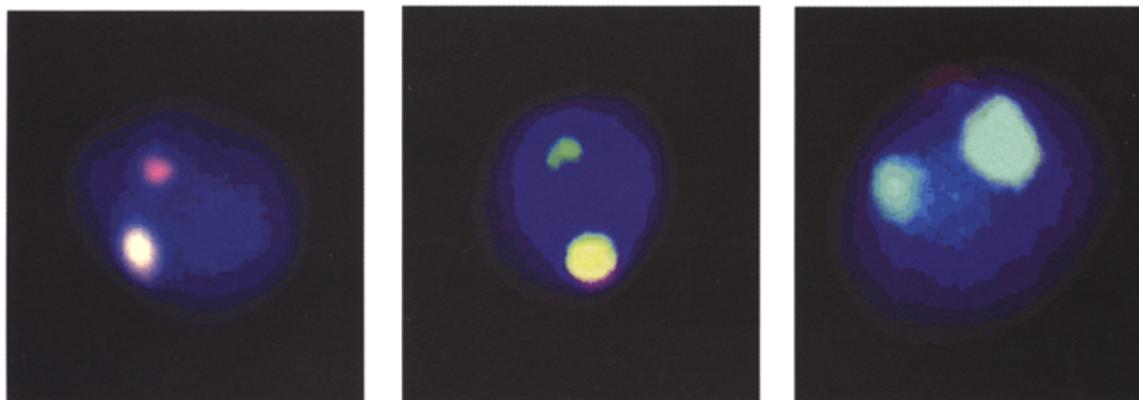


Figure 2 : Hybridation in situ en fluorescence de spermatozoïdes du patient Klinefelter 47XXY

Tableau 1 : Analyse par hybridation in situ en fluorescence, du contenu chromosomique (X, Y et 1) des spermatozoïdes, pour le patient Klinefelter et les sujets témoins

Caryotype somatique	Numération des spermatozoïdes	Nombre de cellules analysées	23X %	23Y %	sex ratio (X/Y)	24XY %	24XX %	24YY %	24X ou Y, + 1 %	46XY %
47, XXY	100 000/ml	502	50,2	44,6	1,12	3,6	1,0	0,2	0,2	0,2
46, XY	70x10 <sup>6</sup> /ml	12780	51,7	47,2	1,09	0,41	0,12	0,05	0,16	0,33
	40x10 <sup>6</sup> /ml	9623	51,0	48,5	1,05	0,07	0	0,02	0,21	0,16
Référence labo	50-70x10 <sup>6</sup> /ml	142050	50,1	48,2	1,04	0,36	0,04	0,01	0,27	0,09

**Tableau 2 : Etude comparative des résultats obtenus concernant la ségrégation des chromosomes sexuels pour des patients porteurs de syndrome de Klinefelter homogène ou en mosaïque**

Caryotype somatique	Numération	Térato-spermie	Mobilité	Nombre de spermatozoïdes analysés	24XY %	24XX %	23X %	23Y %	sex ratio	Technique	Référence
46XY/47XXY	100M/mL	/	60%	543	0,9	0	42	48,2	0,9	caryotype germinal	Cozzi et al 1994
46XY/47XXY	9,6M/mL	/	40%	27 97	2,09	0,1	52,8	43,9	1,2	FISH 3 couleurs	Chevret et al 1996
46XY/47XXY	11,8M/mL	/	1%	~ 300	1,3	0,5	46,7	43,5	1,07	FISH 2 couleurs	Martini et al 1996
46XY/47XXY /48XXXXY	oligoasthénotératospermie sévère			202	5	2	50,5	42,1	1,2	FISH 2 couleurs	Kruse et al 1998
46XY/47XXY	0,2M/mL	90%	0	623	0,96	1,12	43,2	47,5	0,9	FISH 3 couleurs	Okada et al 1999
46XY/47XXY	non connu	non connus		82	0	/	53,7	46,3	1,1	FISH	Araki et al 1999
47XXY	oligoasthénospermie sévère			24	25	/	20,8	29,2	0,7	FISH 3 couleurs	Estop et al 1998
47XXY	0,4 à 1,3M/mL	70-80	20-30	2206	1,36	1,22	43,4	48,8	0,9	FISH 3 couleurs	Guttenbach et al 1997
47XXY	1,9M/mL	72	15	10 000	14,58	6,92	51,87	24,6	2,1	FISH 3 couleurs	Foresta et al 1998
47XXY	2,3M/mL	80	20	10 000	10,03	3,34	56	28,63	1,9		
47XXY	1M/mL	80	0	597	1,34	1,01	42,2	46,4	0,9	FISH 3 couleurs	Okada et al 1999
47XXY	<0,1M/mL	/	30	502	3,6	1	50,2	44,6	1,1	FISH 3 couleurs	notre étude

différents d'un sujet à l'autre et dans le cas de syndromes homogènes, l'existence ou non d'une mosaïque uniquement germinale est une notion actuellement encore débattue. Par ailleurs, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la variabilité intra-individuelle des taux d'hyperhaploïdie spermatique chez ces sujets. Dans le cas de sujets témoins, l'étude de la variabilité inter-individuelle pour des analyses pratiquées au sein d'un même laboratoire montre des variations inférieures à 5% des pourcentages de cellules haploïdes (23X et 23Y), mais des variations parfois supérieures à 10% des pourcentages de cellules hyperhaploïdes (24XY, 24XX ou 24YY), [6, 12], car les résultats concernent de faibles nombres de cellules. Il est par ailleurs assez difficile de comparer des résultats obtenus dans des laboratoires différents, car les techniques ne sont pas strictement comparables.

### III. DISCUSSION BIBLIOGRAPHIQUE

Dans le cadre de cette discussion bibliographique, nous avons tenté d'extraire de la littérature des éléments de réflexion concernant quelques questions très pratiques qui se posent lors de la réalisation d'une FIV avec micro-injection pour un patient porteur d'un syndrome de Klinefelter.

#### 1. Existe-t-il des critères morphologiques et/ou fonctionnels de choix des spermatozoïdes à injecter, permettant d'estimer le risque d'aneuploïdie des chromosomes sexuels?

Les données actuelles d'étude de la ségrégation des chromosomes par hybridation *in situ* en fluorescence sur spermatozoïdes permettent uniquement d'évaluer un pourcentage de spermatozoïdes aneuploïdes au sein d'une population de spermatozoïdes correspondant à un éjaculat donné. En revanche, il n'est pas techniquement possible d'apprécier conjointement la morphologie de chaque spermatozoïde et son contenu chromosomique. Martini *et al* [18] et Bernadini *et al* [2] rendent compte d'analyses combinées de la morphologie des spermatozoïdes et de leur contenu chromosomique. Pour cela, ces auteurs utilisent une technique d'hybridation *in situ* non fluorescente, couplée à une technique de coloration. Cependant, les données morphologiques prises en compte ne sont que parcellaires puisque l'analyse morphologique est effectuée après décondensation des noyaux des spermatozoïdes. En effet, ces auteurs prennent essentiellement en compte des anomalies morphologiques telles que la présence de têtes ou de flagelles multiples et/ou une augmentation importante du volume

de la tête du spermatozoïde après décondensation. Ce type d'anomalie est particulier, et peut effectivement être associé à des anomalies du contenu génétique des spermatozoïdes telles qu'une diploïdie ou une polyplôidie, suite à des non-disjonctions cellulaires au cours de la méiose (résultats non publiés). Ces anomalies sont détectables lors de l'observation des spermatozoïdes en contraste de phase et ces cellules ne sont pas utilisées en micro-injection. En dehors de ce cas particulier, il n'apparaît donc pas techniquement possible de corrélérer l'aspect morphologique du spermatozoïde à injecter et son contenu génétique haploïde.

Une technique de tri cellulaire par cytométrie en flux a été décrite, permettant de séparer les spermatozoïdes porteurs d'un chromosome X ou Y [8]. Cette même technique pourrait donc théoriquement être appliquée à la séparation des spermatozoïdes aneuploïdes et euploïdes [4]. Cependant, l'utilisation de la cytométrie en flux nécessite une concentration importante de cellules dans le prélèvement, ce qui n'est pas le cas des prélèvements dont nous disposons pour les patients porteurs de syndrome de Klinefelter. Par ailleurs, cette séparation est fondée sur le contenu en ADN et celui-ci est peu différent pour les spermatozoïdes haploïdes contenant un ou deux chromosomes sexuels. Une séparation stricte des spermatozoïdes aneuploïdes du reste de la population de spermatozoïdes nous semble donc difficilement réalisable.

Ainsi, le seul élément utilisable pour l'évaluation du risque de transmission de l'aneuploïdie à la descendance dans le cas d'une FIV avec micro-injection pratiquée pour un patient porteur d'un syndrome de Klinefelter, demeure donc une évaluation préalable du taux de cellules aneuploïdes par FISH.

## **2. Le risque d'aneuploïdie augmente-t-il avec l'utilisation de spermatozoïdes testiculaires?**

Si cette étude par FISH sur spermatozoïdes est assez facilement réalisable sur du sperme éjaculé, le problème est très différent lorsqu'il s'agit de spermatozoïdes testiculaires. En effet, le biologiste est alors confronté d'une part à la difficulté technique de réalisation et d'analyse

des résultats d'hybridation en fluorescence sur un tel matériel, et d'autre part à déterminer la place de cette investigation dans le protocole de FIV. Il serait alors nécessaire de pratiquer une première intervention à visée exploratrice et, dans le cas où des spermatozoïdes seraient trouvés, de réserver tout ou partie de ces spermatozoïdes pour l'analyse de la ségrégation des chromosomes. En fonction des résultats obtenus, une FIV avec micro-injection pourrait être discutée. Par ailleurs, dans une optique purement technique, si l'on travaille sur des spermatozoïdes testiculaires préparés pour la micro-injection, le nombre de cellules analysables est souvent très faible, ne permettant pas la réalisation de la technique de FISH. En revanche, l'analyse du matériel testiculaire brut (mélange de cellules germinales à différents stades de différenciation et de cellules somatiques) pose des problèmes de reconnaissance des cellules observées, mais pourrait peut-être à l'avenir constituer un moyen d'apprécier l'existence d'une mosaïque germinale. Actuellement, aucune analyse de tissu ou de cellules testiculaire(s) par FISH n'a été publiée. Il n'y a donc pas actuellement de résultats permettant de penser que le risque augmente si l'on utilise des spermatozoïdes testiculaires, en revanche, la quantification préalable de ce risque est difficile.

## **3. Que sait-on actuellement sur le plan génétique, des enfants nés après FIV avec micro-injection dont le père est porteur d'un syndrome de Klinefelter?**

Plusieurs équipes font état actuellement de tentatives de FIV avec micro-injection à partir de spermatozoïdes éjaculés ou prélevés au niveau testiculaire, chez des patients porteurs de syndrome de Klinefelter homogène ou en mosaïque (Tableau III). L'étude des résultats obtenus s'avère relativement rassurante. Quinze patients ont pu bénéficier d'une ou plusieurs tentatives, ce qui réalise un total de 19 tentatives de micro-injection. Cinq ont été réalisées à partir de spermatozoïdes éjaculés, treize à partir des spermatozoïdes prélevés par ponction ou biopsie testiculaire et une à partir de spermatozoïdes ronds. Le taux de fécondation est globalement de 46% pour les FIV-ICSI à partir de sperme éjaculé et 52% pour les FIV-

Tableau 3 : Résumé des résultats obtenus en FIV-ICSI pour des patients porteurs de syndrome de Klinefelter

Caryotype somatique du patient	Recueil des spermatozoïdes	Nombre d'ovocytes injectés	Nombre d'embryons obtenus	Nombre d'embryons transférés	Evolution	Analyse génétique	Référence
46XY/47 XXY/48XXXY	éjaculat	4 4	1 3	1 2 (+1 congelé)	0 0	/ /	Harari et al 1995
47XXY	éjaculat	8	4	3	fausse couche	46XX <sup>a</sup>	Hinney et al 1997
47XXY	éjaculat (sperme congelé)	13	10 (9 congelés)	2 <sup>b</sup> 2 <sup>b</sup>	0 2 naissances	/ 46XY et 46XX <sup>c</sup>	Bourme et al 1997
47XXY	spermatozoïdes testiculaires	5 10 7	2 4 2	1 2 1	grossesse biochimique 0 0	46XX (DPI) 46XY et 46XX (DPI) 46XY (DPI)	Staessen et al 1996 Tournaye et al 1996
47XXY 47XXY	spermatozoïdes testiculaires	15 12 19	10 8 12	3 3 3	0 1 naissance 2 naissances	/ 46XY (DPN) 46XY et 46XX (DPN)	Palermo et al 1998
47XXY 47XXY 47XXY 47XXY 47XXY	spermatozoïdes testiculaires spermatides rondes	4 2 4 5 1 10	2 1 2 0 0 1 <sup>e</sup>	1 1 2 / / 0	1 naissance 0 0 / / /	46XY, 47XXY <sup>d,e</sup> (DPI) / / / /	Reubinoff et al 1998
47XXY	éjaculat spermatozoïdes testiculaires	10 15	0 9	/ 3	/ 1 naissance	/ 46XY <sup>c</sup>	Ron-El et al 1999
47XXY	spermatozoïdes testiculaires	15	7	3 (+4 congelés)	2 naissances	46XY et 46XY <sup>c</sup>	Nodar et al 1999

ICSI à partir de spermatozoïdes testiculaires. Les deux techniques semblent donc comparables en terme de fécondation. Dans le cas de spermatides rondes en revanche, la seule tentative publiée fait état d'un taux de fécondation de 10% [23]. Le taux moyen de grossesse évolutive par transfert est de 35%.

Sur 15 conceptus analysés, un seul avait une formule chromosomique anormale (47XXY). Neuf enfants sont issus de ces 19 tentatives et tous présentent une formule chromosomique normale. Un diagnostic pré-implantatoire a été réalisé pour 4 de ces tentatives [25, 23] et sur les 6 embryons testés, un seul comportait une formule chromosomique anormale 47XXY et n'a pas été transféré, quatre n'ont pas abouti à une grossesse évolutive après transfert et un a abouti à la naissance d'un garçon (46XY). L'analyse cytogénétique de toutes les cellules de l'embryon non transféré a montré qu'il s'agissait d'un embryon chaotique. Un diagnostic prénatal a été réalisé pour 3 des foetus obte-

nus [21] et un caryotype à la naissance pour 5 enfants. Dans un cas, le couple avait refusé tout diagnostic génétique avant la naissance, aussi bien prénatal que préimplantatoire [24], dans un autre cas, seul un diagnostic prénatal avait été proposé et refusé par le couple [4]. L'ensemble de ces résultats apparaît relativement rassurant et, outre leur formule chromosomique normale, ces enfants ont tous été trouvés en bonne santé à la naissance.

#### 4. Quelle est la place du diagnostic génétique?

Le recours à une FIV-ICSI des patients porteurs de syndrome de Klinefelter pose donc avec une particulière acuité le problème de la transmission iatrogène d'une anomalie chromosomique à la descendance. Il convient donc que le choix de la thérapeutique (intra-conjugale ou avec tiers donneur) ait été évaluée au mieux et que les patients aient pu prendre leur décision en connaissance de cause.

Le conseil génétique, en ce qu'il se situe en amont de la thérapeutique, a donc une importance capitale. Ce conseil peut notamment s'appuyer sur des données chiffrées si une quantification des taux d'hyperhaploïdies gamétiques a été effectuée. Dans ce conseil génétique, une place est également à réserver à la discussion du caractère invalidant ou non de l'anomalie chromosomique. Cette appréciation est hautement subjective pour le syndrome de Klinefelter qui comporte une infertilité, parfois des troubles intellectuels de gravité très variable (cet élément concerne surtout les formules comportant plusieurs chromosomes X surnuméraires) et des caractéristiques qui vont se manifester tard dans la vie de l'individu (risque de cancer du testicule, ostéoporose, impuissance) et dont certaines peuvent bénéficier d'un traitement hormonal substitutif. Sur ce plan de l'appréciation du caractère invalidant de la pathologie, le patient est certainement le mieux placé pour en avoir une évaluation précise puisqu'il parle en parfaite connaissance de cause. L'anomalie n'étant jusqu'à présent pas transmissible, on ne sait pas si le phénotype paternel est transmis dans son ensemble ou si par exemple, il peut exister une aggravation au fil des générations.

Le troisième volet à aborder dans le cadre du conseil génétique est le recours éventuel à un diagnostic génétique. Jusqu'à il y a quelques mois, seul le diagnostic prénatal était réalisable en France. Ceci pose pour ces patients un double problème : d'une part, l'interruption d'une grossesse fortement désirée et dont l'obtention a souvent été difficile et d'autre part, le fait même d'interrompre cette grossesse pour une pathologie dont le père lui-même est atteint. Ceci explique que certains patients aient refusé le diagnostic anténatal. C'est le cas par exemple du patient que nous suivons actuellement. Avec la possibilité de recourir au diagnostic préimplantatoire (DPI), le risque d'interruption de grossesse se limite alors aux seules erreurs du DPI. Le DPI peut effectivement être techniquement pris en défaut pour ces recherches d'anomalies chromosomiques car on ne peut pas prélever plus de deux blastomères au stade d'embryon à 8-10 cellules sans risquer de porter atteinte à la viabilité de l'embryon. On risque donc de méconnaître une

mosaïque [11, 22]. Les patients doivent être avertis de la sensibilité et la spécificité du DPI. Trois centres sont actuellement agréés en France, ce qui peut conduire les patients à tenir compte également du délai d'attente dans leur décision.

Enfin, il convient de rappeler les termes actuels de la loi concernant le DPI, qui s'applique aux couples susceptibles de transmettre à l'enfant une affection d'une particulière gravité. Le syndrome de Klinefelter entre-t-il dans ce cadre?

## CONCLUSION

Le syndrome de Klinefelter en AMP constitue actuellement un modèle de transmission verticale d'une anomalie chromosomique dont la principale conséquence est d'entraîner une infertilité pour l'enfant à naître, l'affection ne présentant pas de risque vital. Cette problématique est donc différente d'autres anomalies de nombre ou de certaines anomalies de structure des chromosomes. Les données actuelles sont globalement rassurantes puisque seuls des enfants de caryotype normal sont nés. Cependant, les cas pour lesquels une AMP intra-conjugale est possible demeurent rares et seules de petites séries de résultats sont analysables. Dans ces cas, un conseil génétique le plus précis possible doit être donné aux patients, et l'étude de la ségrégation des chromosomes lorsqu'elle est possible, y tient une place importante. Ce conseil devrait permettre aux patients de prendre leur propre décision en connaissance de cause. En effet, ils auront à décider de la réalisation de tentatives de procréation assistée, avec tiers donneur ou intra-conjugale et, dans ce dernier cas, ils pourront envisager le recours ou non à un diagnostic génétique préimplantatoire et/ou prénatal.

## REFERENCES

1. ARAKI Y, MOTOYAMA M, YOSHIDA A, KAMIYAMA H, ARAKI S. In-situ hybridization chromosome analysis of XYY and XXY males' spermatozoa. Hum. Reprod., 1997, 12 :1604
2. BERNARDINI L, BORINI A, PRETI S et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. Hum. Reprod., 1998, 13 : 3406-3413.

3. BERTHELSEN JG, SKAKKEBAECK NE, PERBOLL O, NIELSEN J. () In *Development and Function of Reproductive Organs.*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1981 : 328-337.
4. BOURNE H, STERN K, CLARKE G, PERTILE M, SPEIRS A, BAKER HWG. Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47,XXY Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 2447-2450.
5. CHEVRET E, ROUSSEAUX S, MONTEIL M, et al. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 71 : 126-130.
6. CHEVRET E, ROUSSEAUX S, MONTEIL M, USSON Y, COZZI J, PELLETIER R, SÈLE B. Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum. Genet.*, 1996, 97 : 171-175.
7. COZZI J, CHEVRET E, ROUSSEAUX S et al. Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum. Genet.*, 1994, 93 : 32-34.
8. CRAN DG, JOHNSON LA. HUM. The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Reprod. Update*, 1996, 2: 355-363.
9. DE BRAECKELEER M, DAO TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod.*, 1991, 6 : 245-250.
10. ESTOP A, MUNNÉ S, CIEPLY KM, VANDERMARK KK, LAMB AN, FISCH H. Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 124-127.
11. FASOULIOTIS SJ, SCHENKER JG. Preimplantation genetic diagnosis principles and ethics. *Hum. Reprod.*, 1998, 8 : 2238-2245.
12. FORESTA C, GALEAZZI C, BETTELLA A, STELLA M, Scandellari C. High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83 : 203-205.
13. GUTTENBACH M, MICHELMANN HW, HINNEY B, ENGEL W, SCHMID M. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Hum. Genet.*, 1997, 99 : 474-477.
14. HARARI O, BOURNE H, BAKER G, GRONOW M, JOHNSTON I. High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 1995, 63 : 182-184.
15. HINNEY B, GUTTENBACH M, SCHMID M, ENGEL W, MICHELMANN HW. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with sperm from a man with a 47,XXY Klinefelter's karyotype. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 718-720.
16. KRUSE R, GUTTENBACH M, SCHARTMANN B, et al. Genetic counseling in a patient with XXY/XXX/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1998, 69 : 482-485.
17. LUCIANI JM, MATTEI A, Devictor-Vuillet M, Rubin P, Stahl A, Vague J. Study of meiotic chromosomes in a case of Klinefelter's disease with spermatogenesis and 46,XY-47,XXY karyotype. *Ann. Génét.*, 1970, 13 : 249-253.
18. MARTINI E, GERAEDTS JPM, LIEBARS I, et al. Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1638-1643.
19. NODAR F, DE VINCENTIIS S, OLMEDO SB, PAPIER S, URRUTIA F, ACOSTA AA. Birth of twin males with normal karyotype after intracytoplasmic sperm injection with use of testicular spermatozoa from a nonmosaic patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 1999, 71 : 1149-1152.
20. OKADA H, FUJIOKA H, TATSUMI N, et al. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 946-852.
21. PALERMO GD, SCHLEGEL PN, SILLS ES, et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *N. Eng. J. Med.*, 1998, 338 : 588-590.
22. PLACHOT M. Le diagnostic génétique préimplantaire. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1998, 26 : 136-140.
23. REUBINOFF BE, ABELIOVICH D, WERNER M, SCHENKER JG, SAFRAN A, LEWIN A. A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 1887-1892.
24. RON-EL R, FRIEDLER S, STRASSBURGER D, KOMAROVSKY D, SCHACHTER M, RAZIEL A. Birth of a healthy neonate following the intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 368-370.
25. STAESSEN C, COONEN E, VAN ASSCHE E et al. Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three Klinefelter patients. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1650-1653.
26. TOURNAYE H, STAESSEN C, LIEBARS I, et al. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1644-1649.
27. VIDAL F, NAVARRO J, TEMPLADO C, BRUSADIN S, EGOZCUE J. Synaptonemal complex studies in a mosaic 46,XY/47,XXY male. *Hum. Genet.*, 1984, 66 : 306-308.
28. YOSHIDA A, MIURA K, NAGAO K, HARA H, ISHII N, Shirai M. Sexual function and clinical features of patients with Klinefelter's syndrome with the chief complaint of male infertility. *Int J Androl* 1997, 20 : 80-85.

## ABSTRACT

### Klinefelter syndrome and art in 2000

S. HENNEBICQ, S. ROUSSEAU,  
R. PELLETIER, B. SELE

With the recent advance in the techniques of assisted reproduction, it is now possible to overcome male infertility associated with severe oligozoospermia or azoospermia, with other alternatives than sperm donation. In fact, despite a deeply defective spermatogenesis, intracouple *in vitro* fertilization can be achieved nowadays with the help of intracytoplasmic sperm injection. Spermatozoa from ejaculate or testicular biopsy can be used. Klinefelter's syndrome defined by a somatic karyotype 47,XXY or 46, XY/47,XXY, is one of the most common sex chromosomal abnormalities in human, with an incidence of about 3% of infertile men. In most cases, a deeply defective spermatogenesis is associated with this chromosomal abnormality. Intracytoplasmic sperm injection can be proposed to these patients. However, one should then consider the risk of transmitting an aneuploidy involving sex chromosomes.

We report here the study of sex chromosome segregation for a patient carrying a non-mosaic Klinefelter's syndrome (47, XXY), with oligozoospermia and who asked for intracouple *in vitro* fertilization.

#### MATERIAL AND METHODS

The patient is a 33 year old male, with a 47, XXY karyotype (cytogenetical investigation of 16 metaphases). Semen analysis revealed a severe oligozoospermia (spermatozoa  $<1 \times 10^6/\text{mL}$ ) and asthenozoospermia (60% of decreased motility), for an ejaculate volume of 1.8mL.

Three-colour *In Situ* Hybridization was performed on spermatozoa recovered from his cryopreserved semen, in order to simultaneously detect the chromosome X, Y and one with specific appropriate probes. Semen from two 23 year old men were also analyzed as controls.

## RESULTS

502 spermatozoa were analyzed from the patient and about 10,000 from the controls. There was an increase of about ten times of the percentage of hyperhaploid (24XY) spermatozoa in the semen of the Klinefelter patient compared to the controls.

#### DISCUSSION AND CONCLUSION

In a general view of IVF-ICSI practice in Klinefelter patients, we also discuss here several practical points such as (i) is there any morphological criteria which may prevent from injecting an aneuploid spermatozoa, (ii) is the risk of aneuploidy higher when using testicular spermatozoa than when using ejaculated spermatozoa, (iii) what do we know about the offspring obtained by IVF-ICSI in Klinefelter patients and (iv) when should prenatal and/or preimplantary genetical diagnosis be proposed in this particular context.

*Key-words* : assisted reproductive technology, Fluorescent *In Situ* Hybridization, IVF-ICSI, Klinefelter syndrome, male infertility, sex chromosomes