

Naissance après ICSI réalisée avec sperme éjaculé, congelé, chez un jeune patient de 21 ans porteur d'un syndrome de Klinefelter homogène

Cécile FANGET¹, Isabelle AKNIN-SEIFER², Sylviane HENNEBICQ³, Fabienne PRIEUR⁴, Céline CHAULEUR¹, Emmanuelle DENIS-BELICARD¹, Guillaume MARTIN², Rachel LEVY⁵

1 Hôpital Nord, Service de Gynécologie Obstétrique, CHU de Saint-Etienne

2 Hôpital Nord, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU de Saint-Etienne

3 Laboratoire de Biologie de la Procréation-CECOS, Département de Génétique et Procréation, CHU de Grenoble

4 Hôpital Nord, Service de Génétique, CHU de Saint Etienne

5 Laboratoire d'Histologie Embryologie Cytogénétique Biologie de la Reproduction, CHU Jean Verdier, Bondy

RESUME

Le syndrome de Klinefelter est l'une des principales causes génétiques d'infertilité masculine. Il est en effet diagnostiqué chez 11% des patients présentant une azoospermie et 4% des hommes infertiles [23].

Notre étude rapporte une naissance après ICSI utilisant du sperme éjaculé chez un jeune homme de 21 ans, présentant un syndrome de Klinefelter pur, homogène, découvert lors d'un bilan d'infertilité pour oligozoospermie sévère.

Sur une période de 18 mois, trois ICSI ont été réalisées pour ce couple. Au cours des deux premières tentatives avec du sperme éjaculé frais, 10 embryons au total ont été transférés sans obtenir de grossesse. Lors de la 3^e ICSI, nous avons dû utiliser des spermatozoïdes éjaculés congelés, car le patient présentait une azoospermie avérée le jour de l'ICSI. Une grossesse a été obtenue après transfert de 3 embryons de grade A, avec naissance à terme dépassé d'une fille en bonne santé.

Nous soulignons l'intérêt d'une congélation préventive répétée lorsque des spermatozoïdes éjaculés sont disponibles dans tous les cas d'oligozoospermie sévère ou de cryptozoospermie.

De plus, nous avons évalué la qualité des spermatozoïdes congelés et utilisables en ICSI par une analyse de leur ADN et une analyse de leur ploïdie par FISH.

Il s'agit d'un jeune couple qui présente une infertilité primaire de 3 ans : Mr a 21 ans, Mme a 23 ans lors de la première consultation. La femme n'a pas d'antécédent particulier. Le patient a été opéré dans l'enfance d'un hématome testiculaire droit secondaire à un traumatisme. A l'interrogatoire, on note 2 cousins et 1 oncle inféconds (infécondités non explorées). Les pères respectifs de Mr et Mme sont consanguins, issus de germains.

L'examen clinique ne retrouve aucun élément phénotypique évocateur du syndrome de Klinefelter, hormis des testicules de petite taille, inférieurs à 10 ml. Le bilan hormonal est perturbé avec une FSH élevée à 22,6 UI/l, LH 14,4 UI/l, testostérone biodisponible 2,29 nmol/l (normale = 2-9), testostérone plasmatique 112 ng/100ml (normale = 65-308), inhibine B inférieure à 15 ng/l. Le premier spermogramme réalisé en 2004 dans le cadre du bilan d'infertilité met en évidence une oligoasthénozoospermie sévère (Tableau 1).

Le caryotype révèle un syndrome de Klinefelter (47,XXY) pur, homogène (plus de 60 mitoses analysées). La recherche de microdélétion du chromosome Y, réalisée de façon systématique pour toute azoospermie non obstructive, est négative.

Dans ce contexte, une congélation préventive répétée de spermatozoïdes éjaculés a été proposée avant de débiter la fécondation *in vitro* avec microinjection. La spermoculture effectuée ne révélait pas de germe. Neuf prélèvements de sperme consécutifs permettent d'obtenir un stock de 20 paillettes

Mots clés : syndrome de Klinefelter, oligozoospermie, cryoconservation préventive, spermatozoïdes éjaculés

I. OBSERVATION

Correspondance :

Pr Rachel LEVY - Laboratoire d'Histologie Embryologie Cytogénétique Biologie de la Reproduction, CHU Jean Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy -
Email rachel.levy@jvr.aphp.fr

(congélation en micro-gouttes [8]). Après centrifugation sur gradient de densité 1 couche (50%, Puresperm, Nidacon, Suède), le culot lavé est repris en Ferticult (Fertipro, Belgique) et mélangé au cryoprotecteur (Sperm-freezing, medium, MediCult, France) avant montage en paillettes (micro-pailles) haute sécurité (Cryobiosystem, France).

Une numération effectuée avant montage des paillettes retrouve entre 1 et 2 spermatozoïdes mobiles type b (cellule de Mackler) (Tableau 1). Les spermatozoïdes congelés font l'objet 1) d'une analyse de l'ADN par technique TUNEL, à l'aide d'un marquage par peroxydase et lecture sur lame [16], et 2) d'une analyse chromosomique par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) selon la technique décrite par Faure et al. [5]. Compte tenu du faible nombre de spermatozoïdes disponibles dans les paillettes, seule la ploïdie pour les chromosomes 13 et 21 a pu être analysée.

L'analyse de l'ADN effectuée sur 50 spermatozoïdes fixés déposés sur une lame ne révèle aucune fragmentation de l'ADN. Sur 20 spermatozoïdes analysés, l'analyse par FISH met en évidence 3 spermatozoïdes disomiques pour le chromosome 21 (15%) et 1 spermatozoïde disomique pour le chromosome 13 (5%), soit un total de 20% de spermatozoïdes aneuploïdes.

Le bilan féminin est strictement normal (examen clinique, dosages hormonaux, caryotype, hystérosalpingographie).

Le couple a bénéficié de trois FIV-ICSI de février 2005 à juillet 2006, suivant le même protocole de stimulation ovarienne : long analogue associant du Décapeptyl 3 mg (Triptoréline, Beaufour Ipsen Pharma, France), du Purégon 100 (Follitropine, Organon SA, France) et des Gonadotrophines Chorioniques HCG 10 000 UI pour le déclenchement. Deux premières FIV-ICSI sont effectuées avec sperme éjaculé (<1 million/ml), suivies de 3 transferts d'embryons décongelés, sans obtention d'une grossesse (Tableau 2).

Lors de la 3^e ICSI, le patient présente, le jour de la ponction folliculaire, une azoospermie vérifiée (après centrifugation de la totalité de l'éjaculat) et contrôlée sur deux recueils successifs. Une paillette de sperme congelé est alors utilisée. La ponction permet d'obtenir 32 ovocytes : 28 ovocytes matures sont micro-injectés, 16 embryons obtenus dont 3 transférés à J2 (3 embryons de grade A) et 10 congelés (grade A). Une grossesse simple est obtenue, de suivi échographique strictement normal (échographies à 12, 22 et 32 SA). Une amniocentèse est proposée au couple qui ne souhaite pas y donner suite. En avril 2007, la patiente donne naissance, par césarienne à 41 SA+4 jours, à une petite fille en bonne santé, d'un poids de 3910 g, avec un score d'Appgar de 10 à 1 min.

II. DISCUSSION

Plus de 90% des patients atteints de syndrome de Klinefelter pur, homogène, présentent une azoospermie lorsque le diagnostic est porté dans le cadre d'un bilan d'infertilité. Lanfranco et al. retrouvent en effet des spermatozoïdes dans l'éjaculat chez seulement 8,4% des patients (11/131 patients) [13].

L'analyse de la littérature ne retrouve que très peu de cas d'ICSI, réalisées avec sperme éjaculé, de patients porteurs d'un syndrome de Klinefelter homogène ayant abouti à la naissance d'un enfant [13] (Tableau 3). Plus nombreuses sont les grossesses obtenues en utilisant des spermatozoïdes d'origine testiculaire (TESE-ICSI) [7, 13, 19, 20] ; cependant, la TESE-ICSI constitue une technique beaucoup plus invasive nécessitant un geste chirurgical lourd.

Dans ce contexte, lorsque de très rares spermatozoïdes éjaculés sont observés, une détérioration des paramètres spermatiques ne peut jamais être exclue. Il apparaît donc licite de proposer des congélations répétées du sperme éjaculé [1, 11, 15], dès que le diagnostic de syndrome de Klinefelter est posé. Ceci pourra permettre d'éviter le recours à une TESE-ICSI en cas d'évolution vers l'azoospermie.

Par ailleurs, l'âge du patient au moment de la prise en charge est essentiel. En effet, Okada et al. [20] ont montré que le pourcentage de succès après TESE-ICSI diminue de façon significative au delà de 35 ans chez l'homme. Dans notre étude, le patient avait 21 ans au moment de la première consultation. Grâce à une prise en charge multidisciplinaire rapide, nous avons pu congeler 20 paillettes de spermatozoïdes éjaculés, de contenu aléatoire, avant l'apparition d'une azoospermie survenue 21 mois plus tard. L'apparition de l'azoospermie coïncidait avec une chute sévère de la testostérone plasmatique à 59ng/100mL.

Les études concernant les enfants de patients présentant un syndrome de Klinefelter sont globalement rassurantes : la plupart des enfants ont un caryotype normal. Cependant, des anomalies chromosomiques ont été décrites dans les spermatozoïdes de patients Klinefelter homogène, dont une hyperploïdie dans 2,5 à 21,6% des spermatozoïdes analysés [13].

Ainsi, de nombreuses études retrouvent une augmentation du risque d'aneuploïdie et en particulier de disomie pour les chromosomes 13 (0,78%), 18 (0,47%) et 21 (0,98%) [18], mais également d'anomalies au niveau des chromosomes sexuels : 4,46% [14]; 24,XY : 1,02%, 24,XX : 0,63%, 24,YY : 0,41% [6]. Dans notre cas, le taux de spermatozoïdes aneuploïdes est de 20% pour les chromosomes 13 et 21, ce qui est une valeur importante mais non représentative compte tenu du faible nombre (20) de spermatozoïdes étudiés. Certaines équipes proposent un diagnostic prénatal [7, 9, 18], voire un diagnostic pré-implantatoire (DPI) [4]. Afin de mieux évaluer les risques pour le conceptus, nous avons ainsi effectué une analyse chromosomique des spermatozoïdes par FISH. Par ailleurs, la recherche des microdélétions du chromosome Y s'est révélée négative pour notre patient [17].

Enfin, l'analyse de l'ADN des spermatozoïdes congelés, réalisée afin de s'assurer de la qualité nucléaire des spermatozoïdes utilisés en ICSI, n'a montré aucun signe de fragmentation de l'ADN.

III. CONCLUSION

Cette étude rapporte la prise en charge rapide en AMP d'un jeune homme pour lequel un syndrome de Klinefelter pur a été diagnostiqué lors du bilan d'une oligozoospermie extrême.

Grâce à des congélations répétées de sperme, faites avant les FIV-ICSI, plusieurs tentatives d'ICSI ont été effectuées, utilisant d'abord du sperme éjaculé frais puis, lors de la survenue d'une azoospermie, les spermatozoïdes congelés. Cette procédure a permis au couple d'avoir un enfant sans avoir recours à la biopsie testiculaire. Par ailleurs, le couple dispose d'embryons congelés (10) et de sperme congelé (19 paillettes) permettant d'envisager des grossesses ultérieures.

Tableau 1 : Caractéristiques des prélèvements de sperme obtenus.

Date	Volume (mL)	Numération /mL (colonne de 50%, reprise du culot par 30µL de fert+30µL de sperm freezing)	Mobilité à 30 min		spermatozoïdes par paillettes
07/10/2004	2	<100 000	20% type C	spermogramme	ND
21/10/2004	1,5	<100 000	10% type B	congélation 2 paillettes	ND
09/11/2004	2,5	8000	10% type B	congélation 3 paillettes	6000
18/11/2004	2,5	<100 000	10% type B	congélation 3 paillettes	ND
30/11/2004	2,5	<100 000	10% type B	congélation 3 paillettes	ND
07/12/2004	2	<100 000	rare type B	congélation 3 paillettes	ND
05/01/2005	2,5	<100 000	rare type B	congélation 2 paillettes	ND
31/03/2005	2,5	5000	5% type C	congélation 2 paillettes	6000
05/04/2005	2,5	1 spermatozoïde mobile sur place en dehors de la cellule de Makler	ND	congélation 1 paillette	ND
18/04/2005	2	1 spermatozoïde mobile sur place en dehors de la cellule de Makler	ND	congélation 1 paillette	ND
27/05/2005	2	8000	Type C	spermogramme	ND
12/09/2005	2,5	2000	50% mobiles, 1/10 type B	spermogramme	ND

ND = Non déterminé.

Tableau 2 : Principaux paramètres des tentatives de FIV/ICSI effectuées.

n°	Date	Ovocytes recueillis (n)	Ovocytes matures (n)	Embryons obtenus (n) et qualité (grade)	Embryons transférés (n)	Embryons congelés (n)	Décongélation N°1	Décongélation N°2
1	31/01/05	10	9	6 (5 grade A) J3	2	3	3 embryons décongelés/2 transférés	-
2	07/10/05	21	19	15 (9 grade A) J3	2	7	5 embryons décongelés/2 transférés	2 embryons décongelés/2 transférés
3	06/07/06	32	28	16 (13 grade A) J2	3	10	-	-

Tableau 3 : Données de la littérature concernant les tentatives d'ICSI avec sperme éjaculé de patients porteurs d'un syndrome de Klinefelter [13].

Références	ICSI avec spermatozoïdes éjaculés	Embryons transférés (n)	Grossesse clinique (activité cardiaque) (n)	Enfant vivant (n)	Caryotype du conceptus/ Nouveau-né
Bourne <i>et al.</i> 1997 [2]	1	4	1 (jumeaux)	2	46,XY; 46,XX
Hinney <i>et al.</i> 1997 [10]	1	3	1 (unique, fausse couche 9 SA)		46,XX
Kitamura <i>et al.</i> 2000 [12]	4		1 (fausse couche 8 SA)		
Okada <i>et al.</i> 2005 [19]	1	2	1 (unique)	1	46,XX
Cruger <i>et al.</i> 2001 [3]	1	2	1 (unique)	1	46,XX
Staessen <i>et al.</i> 2003 [21]	1	3	1 (triplet, fausse couche 18 SA)		46,XY;46,XX(2)
Ulug <i>et al.</i> 2003 [22]	1	2	1 (jumeaux)	2	46,XY; 46,XX
Notre étude	1	3	1 (unique)	1	46,XX
TOTAL	11	17	8	7	5 filles, 2 garçons

REFERENCES

- ALBERT M. : Prise en charge des cryptozoospermies et des oligospermies extrêmes. *Andrologie*, 2005, 15 : 223-226.
- BOURNE H., STERN K., CLARKE G., PERTILE M., SPEIRS A., BAKER H. W. : 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.
- CRUGER D., TOFT B., AGERHOLM I., FEDDER J., HALD F., BRUUN-PETERSEN G. : Birth of a healthy girl after ICSI with ejaculated spermatozoa from a man with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1909-1911.
- DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A. : A review of ten years experience of ICSI. *Hum. Reprod. Update*, 2004, 10 : 19-28.
- FAURE A.K., AKNIN-SEIFER I., SATRE V. *et al.* : Fine mapping of re-arranged Y chromosome in three infertile patients with non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia. *Hum. Reprod.*, 2007, 22 : 1854-1860.
- FERLINA A., GAROLLAA., FORESTAC. : Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111 : 310-316.
- FRIEDLER S., RAZIELA., STRASSBURGER D., SCHACHTER M., BERN O., RON-EL R. : Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 2616-2620.
- GUTHAUSER B., BAILLY M., BERGERE M., WAINER R., VILLE Y., SELVA J. : Successful pregnancy and delivery after testicular sperm extraction despite an undetectable concentration of serum inhibin B in a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 2002, 77 : 1077-1078.
- HENNEBICQ S., PELLETIER R., BERGUES U., ROUSSEAUX S. : Risk of trisomy 21 in offspring of patients with Klinefelter's syndrome. *Lancet*, 2001, 357 : 2104-2105.
- HINNEY B., GUTTENBACH M., SCHMID M., ENGEL W., MICHELMANN H. W. : Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with sperm from a man with a 47,XXY Klinefelter's karyotype. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 718-720.
- ICHIOKA K., UTSUNOMIYA N., KOHEI N., UEDA N., INOUE K., TERAJ A. : Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 2006, 85 : 1511 e1511-1512.
- KITAMURA M., MATSUMIYA K., KOGA M. *et al.* : Ejaculated spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Int. J. Urol.*, 2000, 7 : 88-92.
- LANFRANCO F., KAMISCHKE A., ZITZMANN M., NIESCHLAG E. : Klinefelter's syndrome. *Lancet*, 2004, 364 : 273-283.
- LEVRON J., AVIRAM-GOLDRINGA., MADGAR I., RAVIV G., BARKAI G., DOR J. : Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 925-929.
- LIN Y.M., HUANG W.J., LIN J.S., KUO P.L. : Progressive depletion of germ cells in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome : optimal time for sperm recovery. *Urology*, 2004, 63 : 380-381.
- MARTIN G., SABIDO O., DURAND P., LEVY R. : Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 2005, 20 : 3459-3468.
- MITRAA., DADAR., KUMAR R., GUPTA N.P., KUCHERIA K., GUPTA S.K. : Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J. Androl.*, 2006, 8 : 81-88.
- MOREL F., BERNICOT I., HERRY A., LE BRIS M.J., AMICE V., DE BRAEKELEER M. : An increased incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 2003, 79 : 1644-1646.
- OKADA H., GODA K., MUTO S., MARUYAMA O., KOSHIDA M., HORIE S. : Four pregnancies in nonmosaic Klinefelter's syndrome using cryopreserved-thawed testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 2005, 84 : 1508.
- OKADA H., GODA K., YAMAMOTO Y. *et al.* : Age as a limiting factor for successful sperm retrieval in patients with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.*, 2005, 84 : 1662-1664.
- STAESSEN C., TOURNAYE H., VAN ASSCHE E. *et al.* : PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum. Reprod. Update*, 2003, 9 : 319-330.
- ULUG U., BENER F., AKMAN M.A., BAHCECI M. : Partners of men with Klinefelter syndrome can benefit from assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.*, 2003, 80 : 903-906.
- VAN ASSCHE E., BONDUELLE M., TOURNAYE H. *et al.* : Cytogenetics of infertile men. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1-24.

Manuscrit reçu : août 2007 ; accepté octobre 2007.

ABSTRACT

Birth after ICSI carried out with frozen ejaculated sperm from a 21-year-old patient with non-mosaic Klinefelter's syndrome.

Cécile FANGET, Isabelle AKNIN-SEIFER, Sylviane HENNEBICQ, Fabienne PRIEUR, Céline CHAULEUR, Emmanuelle DENIS-BELICARD, Guillaume MARTIN, Rachel LEVY

Klinefelter's syndrome is one of the main genetic causes of male infertility, as it is diagnosed in 11% of patients with azoospermia and 4% of infertile men.

This study reports a birth after ICSI performed with ejaculated sperm from a 21-year-old man with homogeneous non-mosaic Klinefelter's syndrome discovered during assessment of infertility for severe oligozoospermia.

Three ICSI were performed for this couple over an 18-month period. Pregnancy was not achieved after the first and second ICSI with fresh ejaculated sperm. At the third ICSI, the patient presented proven azoospermia on the day of the attempt, and frozen-thawed ejaculated spermatozoa were therefore used. A pregnancy was obtained after the transfer of 3 grade A embryos with the birth of a healthy girl.

The authors highlight the value of repeated preventive sperm cryopreservation when ejaculated spermatozoa are available in all cases of severe oligozoospermia or cryptozoospermia.

They also evaluated the quality (DNA fragmentation, ploidy) of the frozen/thawed spermatozoa.

***Key words* : cryopreservation, newborn, Klinefelter's Syndrome, male, pregnancy spermatozoa**