



HAL
open science

Les arrêts méiotiques : de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique

Farah Ghieh

► **To cite this version:**

Farah Ghieh. Les arrêts méiotiques : de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL103 . tel-04288682

HAL Id: tel-04288682

<https://hal.inrae.fr/tel-04288682v1>

Submitted on 2 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les arrêts méiotiques : de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique
Meiosis arrest : from gene defects identification to therapeutic approaches

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577 Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biologie de la reproduction
Graduate School : Sciences de la vie et Santé. Référent : Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BREED (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE)**, sous la direction de **François VIALARD**, Professeur des universités, et le co-encadrement de **Béatrice MANDON-PEPIN**, Chargée de Recherche

Thèse soutenue à Montigny le Bretonneux, le 20 décembre 2021, par

Farah GHIEH

Composition du Jury

Sophie FERLICOT PU-PH, Hôpital Kremlin-Bicêtre et Université Paris Saclay	Présidente
Julie COCQUET CR, Institut Cochin (INSERM U1016)	Rapporteuse et examinatrice
Charles PINEAU DR, IRSET, Université de Rennes 1 (INSERM UMR_S1085)	Rapporteur et examinateur
Christophe ARNOULT DR, Université Grenoble Alpes (CNRS UMR5309)	Examinateur
Anne-Laure BARBOTIN MCU-PH, Institut de Biologie de la Reproduction, CHU de Lille	Examinatrice
Vincent IZARD PH, Hôpital Kremlin-Bicêtre	Examinateur
François VIALARD PU-PH, Université Paris Saclay (BREED, UMR1198)	Directeur de thèse

Titre : Les arrêts méiotiques : de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique

Mots clés : Azoospermie, Blocage méiotique, Consanguinité, NGS

Résumé : L'azoospermie, définie comme l'absence de spermatozoïde dans l'éjaculat, concerne 1% des hommes. L'objectif de mon travail a été de démontrer l'apport des analyses génétiques pour la compréhension et la prise en charge des patients azoospermes pour lesquels un arrêt de maturation (AM) complet de la spermatogenèse a été précédemment identifié. Pour cela, nous avons réalisés le séquençage de l'exome et rechercher des variations du nombre de copie chez de nombreux patients.

Nous avons d'abord validé notre approche dans une famille consanguine, et identifiée un variant homozygote délétère dans le gène MEI1 connu pour être un gène majeur durant la méiose. Puis, nous avons démontré la possibilité de l'occurrence de plusieurs anomalies par l'étude de patients porteurs d'un remaniement chromosomique. Fort de ces succès, nous avons réalisé ces analyses sur une cohorte de 26 individus non

apparentés présentant une AM et identifié une altération de gènes de la méiose chez 58% de ces patients, 100% s'ils sont consanguins. Ceci a permis de proposer une nouvelle approche dans la prise en charge de ces patients et démontré l'hétérogénéité génétique de ce phénotype rare d'infertilité. Parallèlement, nous avons démontré qu'une dérégulation du spliceosome testiculaire pouvait entraîner une azoospermie, par altération du gène RBMXL2. En parallèle, nous avons mimé la délétion récurrente du gène TEX11 humain dans l'AM, en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 et réalisant un modèle murin que nous comptons utiliser dans le cadre du développement d'une thérapie génique. Or, les souris $Tex11^{del/Y}$ étant fertiles, cela interroge sur la validité de l'utilisation du modèle murin et/ou sur l'impact d'une telle délétion sur la spermatogenèse chez l'homme.

Title : Meiosis arrest: from gene defects identification to therapeutic approaches

Keywords : Azoospermia, Meiotic arrest, Consanguinity, NGS

Abstract : Azoospermia, defined as the absence of sperm in the ejaculate, affects 1% of men. The objective of my work has been to demonstrate the contribution of genetic analyses to the understanding and management of azoospermic patients for whom complete maturation arrest (MA) of spermatogenesis has previously been identified. To do this, we performed exome sequencing and looked for copy number variations in many patients. We first validated our approach in an inbred family and identified a deleterious homozygous variant in the MEI1 gene, known to be a major meiosis gene. Then, we demonstrated the possibility of the occurrence of several genetic abnormalities by studying patients with a chromosome rearrangement. Based on these successes, we performed these analyses on a cohort of 26 unrelated

individuals with MA and identified alterations of meiosis genes in 58% of these patients, 100% if they are consanguineous. This made it possible to propose a new approach in the management of these patients and demonstrated the genetic heterogeneity of this rare infertility phenotype. At the same time, we have shown that deregulation of the testicular spliceosome can lead to azoospermia, by alteration of the RBMXL2 gene. In parallel, we reproduced the recurrent deletion of the human TEX11 gene in MA, using CRISPR/Cas9 technology and producing a mouse model that we intended to use in the development of gene therapy. However, the $Tex11^{del/Y}$ mice being fertile, this questions the validity of the use of the mouse model and/or the impact of such a deletion on spermatogenesis in human.

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame Julie COCQUET et le Dr. Charles PINEAU d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens à remercier également les membres du jury : Dr. Christophe ARNOULT, Dr. Anne-Laure BARBOTIN, Pr. Sophie FERLICOT, et Dr. Vincent IZARD, d'avoir accepté d'évaluer ma thèse, ainsi que le Pr. Gabriel LIVERA d'être présent en tant qu'invité.

A François, un immense merci de m'avoir encadré pendant ces 3 ans de thèse et d'avoir cru en moi depuis mon stage de master 2. J'ai énormément appris à tes côtés, tu m'as transmis ton goût de la recherche, fait profiter de tes qualités et aider à traverser toutes épreuves. Ton habilité à mener plusieurs projets en même temps resteront pour moi un modèle. Tu étais toujours prêt à trouver du temps pour moi malgré ton emploi du temps chargé. J'espère pouvoir poursuivre l'aventure scientifique sur les anomalies méiotiques à tes côtés.

J'adresse des remerciements particuliers à ma co-encadrante Béatrice MANDON-PEPIN pour son implication dans la partie concernant les modèles murins et la structuration du projet de thèse, ainsi que son soutien et encouragements.

Mes remerciements vont également à l'équipe "Différenciation gonadique et ses Perturbations" de l'INRAe. Je remercie aussi Elodie POUMEROL pour son aide précieuse lors des manips et tous ses conseils.

Je tiens à remercier l'équipe MoDiT à l'INRAe et plus spécifiquement Johan CASTILLE, Bruno PASSET et Jean-Luc VILOTTE pour la modélisation murine de la lignée *Tex11^{Ex9-11del/Y}* et tous leurs précieux conseils concernant la gestion des lignées et la réalisation des manips.

Je remercie Eli SELLEM pour la partie des analyses des paramètres spermatiques.

Merci à tous les membres de l'équipe RHuMA, et plus particulièrement : Marie-Noelle, Esther, Yoann, et Maryse pour leur soutien pendant ces 3 années.

Je souhaite remercier Christophe HUE pour son expertise en NGS, et le responsable de la plateforme génomique de l'UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, le Pr. Henri-Jean GARCHON pour son aide dans le traitement des informations du séquençage d'exome et les analyses de données et du temps qu'il m'a consacré pour m'expliquer le traitement des données bioinformatiques.

Je remercie Delphine FAUVERT pour son aide précieuse dans la technique SNP-CGH Array et qui sans ses conseils, ce projet n'aurait pas été possible. Un grand merci au Dr. Rodolphe DARD pour tous ses conseils en PCR et en séquençage Sanger. J'adresse mes vifs remerciements à Esther DOS SANTOS et Christelle Le SCIELLOUR pour leurs

explications et leurs aides en PCR et pour faire le design d'amorces. Je remercie toute l'équipe technique de la plateforme de cytogénétique du CHI de Poissy St Germain en Laye : Carole, Lemane Marie, Séverine et Amandine pour leur accueil toujours si chaleureux, leur gentillesse et leurs conseils expérimentés au laboratoire.

Je tiens à remercier vivement Mme Joanne FORTEMPS pour son aide dans les expériences d'immunohistochimie et dans l'utilisation du microtome, pour sa bonne humeur et bienveillance qui ont été un vrai soutien lors de nos nombreuses conversations. Merci également à toutes les personnes et techniciennes d'Anapath du CHI de Poissy St Germain en Laye toujours disponibles et à l'écoute.

Je souhaite remercier les Dr. Anne-Laure BARBOTIN et Valérie MITCHELL de m'avoir accueilli dans l'hôpital Calmette à Lille et pour leurs explications et leur expertise dans l'analyse des lames de coupes de testicules humains, ainsi que leur implication dans le projet.

Un mot également à Pr. Sylvie JAILLARD, pour son implication dans le projet, et pour les conseils partagés dans l'analyse d'exome et l'insuffisance ovarienne prématurée.

Je souhaite remercier l'ensemble des médecins cliniciens et anatomopathologistes qui ont permis le recrutement des patients pour la réalisation de ce projet national et en particulier les Drs SERAZIN, BAILLY, RIGOT et IZARD.

Je tiens à remercier le Pr. Mariano OSTUNI et l'université de Paris d'avoir accepté ma candidature pour le poste d'ATER qui débute en décembre. Je suis super motivée pour débiter un nouveau chapitre de ma vie.

J'ai pu découvrir des personnes formidables durant ces trois années de thèse. Du fond du cœur, merci Anissa, Camille, Marta, et Perrine pour l'amitié qui nous lie aujourd'hui et pour tous les moments agréables passés avec vous. Merci aux étudiantes Eloise, Emeline, et Louise qui ont fait partie de ce projet et m'ont aidé dans la réalisation des différentes manipulations sur le modèle murin.

Merci à Hendrick pour son aide pendant les heures supplémentaires passées à comprendre les TD et les TP à enseigner. Merci pour tes encouragements et toutes nos discussions que j'ai apprécié. Bon courage pour la fin de ta thèse !

À toute ma famille qui m'a toujours soutenue. À mes parents, mes frères et sœurs qui m'ont aidée et encouragée tout au long de mes études malgré la distance qui nous sépare. Grâce à vous que je suis là. Vous m'avez toujours donné confiance pour avancer, et j'espère aujourd'hui vous rendre fier. Je vous aime.

Les 5 années que j'ai passées à Paris pour mes études ont été un voyage difficile, avec des hauts et des bas. Heureusement, je n'étais pas seule sur cette route, mais

accompagnée d'amis attentionnés toujours prêts à m'aider et me motiver. Pour cela, je tiens à tous les remercier chaleureusement. Merci à Samuel, Olivier, Max, Anthony et Alejandro de m'avoir transmis la fièvre de la salsa !

Hugo, te rencontrer a été l'une des plus belles choses qui me soit arrivée, merci pour ton soutien qui me pousse à faire de mon mieux au quotidien.

Enfin, je souhaite terminer mes remerciements par mon meilleur ami, et bientôt mon futur collègue Antoine dont l'amitié a été d'un grand soutien, pour toutes nos aventures ensemble à Paris et pour être présent dans les meilleurs moments comme les plus difficiles.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS	15
AVANT-PROPOS	19
Partie I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Chapitre I : Le système reproductif masculin	23
I. La mise en place de l'appareil génital mâle	23
II. Anatomie et fonction du testicule	27
III. Épithélium séminifère	29
A. Les cellules de soutien du testicule : cellules de Sertoli	31
B. La lignée germinale	33
1. Développement des cellules germinales fœtales	33
2. Différenciation des cellules germinales XY en pro-spermatogonies	36
3. Inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales mâles	37
IV. Tissu interstitiel	42
A. Cellules de Leydig	42
B. Cellules myoïdes périvitubulaires	43
Chapitre II : La spermatogenèse	46
I. La phase de multiplication des spermatogonies par mitose	48
II. La méiose des cellules germinales mâles	53
A. Première division méiotique	55
1. Prophase I méiotique	55
a. Initiation de la recombinaison via induction des cassures double-brins	56
i. La mécanique de la formation des cassures double-brins	57
ii. Synchronisation, placement et modulation des cassures double brins	59
b. Formation du complexe synaptonémal et appariement des homologues (synapsis)	61
c. Réparation des cassures double brins par recombinaison homologue	67
i. Échange de brins	67
ii. Crossing-over <i>versus</i> Non crossing-over	70
iii. Protéines de la recombinaison méiotique	71
d. Attachement des télomères aux membranes nucléaires	74
e. Asynapsis et mise en place du MSCI	75
B. Fin de la première division méiotique	78
C. La deuxième division méiotique	86
III. La spermiogénèse	86
A. Développement de l'acrosome	87
B. Condensation du noyau et remodelage de la chromatine	89
C. Développement du flagelle	92
D. Spermiation	96
IV. Régulation de la spermatogenèse	98
A. Régulation hormonale	98
B. Régulation épigénétique de la différenciation des cellules germinales	102
1. Les ARNs non codants (ARNnc)	102
a. Les miARNs	105

b.	Les piARNs _____	105
1.	Rôle des protéines de liaison à l'ARN (RBP) dans la spermatogenèse _____	107
a.	La famille RBM _____	108
b.	La famille PIWI _____	111
Chapitre III : Infertilité masculine _____		120
I.	Définition _____	120
II.	L'analyse du sperme _____	120
III.	Les techniques d'assistance médicale à la procréation _____	123
A.	Hyperstimulation ovarienne contrôlée _____	123
B.	Prélèvement et préparation du sperme _____	124
C.	Fécondation _____	124
1.	Insémination intra-utérine (IIU) _____	124
2.	Fécondation <i>in-vitro</i> (FIV) _____	125
3.	Fécondation <i>in-vitro</i> avec micro-injection du spermatozoïde (ICSI) _____	125
IV.	L'azoospermie _____	126
A.	Définition _____	126
B.	La biopsie testiculaire _____	128
C.	Phénotypes histologiques testiculaires dans les azoospermies non-obstructives _____	129
1.	Les hypospermatogénèses _____	129
2.	Le syndrome des cellules de Sertoli seules (SCOS) _____	130
3.	Les arrêts de maturation testiculaire (AM) _____	130
V.	Les étiologies génétiques de l'azoospermie _____	130
A.	Anomalies chromosomiques et azoospermie _____	131
1.	Syndrome de Klinefelter (47,XXY) _____	131
2.	Les remaniements chromosomiques _____	134
3.	Le syndrome des hommes « 46,XX » _____	135
1.	Le double Y 47,XXY _____	137
2.	Les microdélétions du chromosome Y (Yq) _____	137
B.	Azoospermie obstructive et anomalies du gène CFTR _____	139
Chapitre IV : À la recherche de nouveaux variants génétiques impliqués dans les azoospermies _____		142
I.	Stratégies d'identification de nouveaux variants _____	142
A.	Approche des « gènes candidats » _____	142
1.	Résultats obtenus avec l'approche des « gènes candidats » _____	143
B.	Approches pangénomique (whole-genome) _____	145
1.	Puces à ADN et cartographie par homozygotie _____	145
a.	L'hybridation génomique comparative (CGH) _____	145
b.	L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH array _____	147
2.	Les technologies de séquençage de nouvelle génération _____	149
II.	Résultats du séquençage de nouvelle génération dans l'azoospermie _____	153
A.	Azoospermie -obstructive _____	153
B.	Azoospermie non-obstructive _____	154
III.	Validation des gènes candidats _____	160
IV.	Le gène <i>TEX11</i> _____	167
A.	Altérations du gène <i>TEX11</i> et azoospermie non-obstructive _____	167
B.	Identification, conservation et expression du gène <i>Tex11</i> _____	171
C.	Modèles murins et fonction du gène <i>Tex11</i> _____	173
D.	Validation des variants du gène <i>TEX11</i> , et thérapie génique _____	174
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE THÈSE _____		177

Partie II : ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	179
Chapitre I. Investigation génétique du phénotype d'azoospermie non-obstructive due à l'arrêt de maturation testiculaire chez l'homme	180
Article 1	181
Objectifs et principaux résultats de l'étude	182
Article 2	183
Objectifs et principaux résultats de l'étude	184
Article 3	186
Objectifs et principaux résultats de l'étude	187
Article 4	189
Objectifs et principaux résultats de l'étude	190
Chapitre 2 : L'étude fonctionnelle d'une altération génétique humaine transposée dans un modèle murin	213
Article 5	214
Objectifs et principaux résultats de l'étude	215
Discussion générale et perspectives	258
I. Changer et améliorer progressivement la gestion Clinique	261
A. Découvertes secondaires ou « fortuites »	262
B. Prudence dans l'interprétation des variants	264
II. Caractérisation et mécanismes de l'arrêt de maturation spermatique	264
III. Approches thérapeutiques ciblées dans l'ANO due à l'AM	268
A. Thérapie génique via CRISPR/Cas9	271
B. Thérapie génique via des vecteurs viraux	271
C. Thérapie génique via des vecteurs non viraux	274
BIBLIOGRAPHIE	277
ANNEXES	319
COMMUNICATIONS	320

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aal	Aalignés
AAV	Adeno-associated Virus
ABCD	Absence congénitale bilatérale du canal déférent
ABP	Androgen-binding protein
ADAD2	Adenosine Deaminase Domain Containing 2
ADGRG2	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNnc	ADN non-codants
ADNsb	ADN simple brin
AE	Élément axial
ALDH1A1	Aldéhyde déshydrogénase famille 1, sous-famille A1
ALDH1A2	Aldéhyde déshydrogénase famille 1, sous-famille A2
ALDH1A3	Aldéhyde déshydrogénase famille 1, sous-famille A3
AM	Arrêt de maturation
AMH	Anti-Müllerian Hormone
AMP	Assistance médicale à la procréation
ANO	Azoospermie non-obstructive
AO	Azoospermie Obstructive
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
Apr	Apraired
AR	Acide rétinoïque
AR	Androgen Receptor
ARL2	ADP Ribosylation Factor Like GTPase 2
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non-codants
ARNr	ARNs ribosomaux
ARNt	ARN de transfert
ART	Assisted reproductive technologies
As	Asingle
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR Interacting Protein
AURKC	Aurora Kinase C
AV	Adeno-Virus
AZF	Azoospermia factor
BHT	Barrière hémato-testiculaire
BMI1	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger
BMP	Particules magnétiques bactériennes

Boucle D	Boucle de déplacement
BRCA1	Breast tumor suppressor gene 1
BRCA2	BRCA2 DNA Repair Associated
BRDT	BRomDomaine Testis-specific
BT	Biopsie Testiculaire
BUB3	Budding uninhibited by benomyl
C-Kit	KIT Proto-Oncogene tyrosine kinase
C. elegans	Caenorhabditis elegans
C11ORF80	Chromosome 11 Open Reading Frame 80
C14ORF39	Chromosome 14 Open Reading Frame 39
CABYR	Calcium Binding Tyrosine Phosphorylation Regulated
CAPZA3	Capping Actin Protein Of Muscle Z-Line Subunit Alpha 3
CCDC36	Coiled-Coil Domain Containing 36
CCDC63	Coiled-Coil Domain Containing 63
CCNA1	Cyclin A1
CCNB1	Cycline B1
CDBs	Cassures double brins
CDK1	Cyclin Dependant Kinase 1
CE	Elément central
CFTR	CF Transmembrane Conductance Regulator
CGH	Hybridation génomique comparative
CGP	Cellules germinales primordiales
CHH	Congenital hypogonadotropic hypogonadism
CMP	Cellules myoïdes péritubulaires
CNV	Copy number variations
CO	Crossing-over
CRISPR-Cas9	Clustered regular interspersed short palindromic repeats associated protein 9
CS	Complexe synaptonémal
CTCF	CCCTC-Binding Factor Like
CYP26B1	Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1
DAZAP1	DAZ Associated Protein 1
DAZL	Deleted in Azoospermia Like
DDX3X	DEAD-Box Helicase 3 X-Linked
DDX3Y	DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked, ancien DBY
DDX4	DEAD-Box Helicase 4
DHH	Desert Hedgehog Signaling Molecule
dHJ	Doubles jonctions de Holliday
DMC1	DNA Meiotic Recombinase 1
DMRT1	Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha
DNMT3B	DNA Methyltransferase 3 Beta
DNMT3L	DNA methyltransferase 3-like

DPI	PreImplantation Genetic Diagnosis
DPY19L2	Dpy-19 Like 2
DSD	Disorder of sex developement
EGF	Epidermal growth factor
EMI2	Early Meiotic Inhibitor 2
Emx2	Empty spiracles homeobox gene 2
Endo-siARNs	Endogenous short interfering RNAs
EOMES	Eomesodermin
ES	Spécialisation ectoplasmique
ESCs	Embryonic stem cells
EXO1	Exonuclease 1
FANCA	FA Complementation Group A
FANCM	FA Complementation Group M
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FIV	Fécondation in-vitro
FKBP6	FK506-binding protein 6
FNA	Fine Needle Aspiration
FOXO1	Forkhead Box O1
FSH	Follicle stimulating hormone
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
FV	Sendai Virus Fusion Protein
GCA	Germ cell arrest
GDNF	Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor
GFRa1	GDNF Family Receptor Alpha 1
GH	Growth hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GWAS	Genome-Wide Association Studies
H1T	testicular H1 histone variant
H2AX	H2A.X Variant Histone
HANP1	Haploid germ cell-specific nuclear protein 1
HCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HDR	Homology-directed repair
HFM1	Helicase For Meiosis 1
HILS1	Spermatid specific linker histone H1-like protein
hnRNP G	Ribonucléoprotéine G nucléaire hétérogène
HOOK	Hook Microtubule Tethering Protein 1
HORMAD1	HORMA Domain Containing 1
HROB	Homologous Recombination Factor With OB-Fold
HSD17B3	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 3
HSP70-2	Heat Shock Protein
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection

ID4	Inhibitor Of DNA Binding 4, HLH Protein
IFT	Transport intraflagellaire
IGF	Insulin growth factor
IHO1	Interactor Of HORMAD1 1
IIU	Insémination intra-utérine
IL1A	Interleukin 1 alpha
IMSI	Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection
IMT	Transport intra-manchette
INSL3	Insulin Like-3
IOP	Insuffisances ovariennes prématurées
<i>jpc</i>	Jours post-coïtum
<i>jpp</i>	Jours post-partum
KASH5	KASH Domain Containing 5
Kb	Kilobases
KI	Knock-In
KO	Knock-out
LH	Luteinizing hormone
LHR	Luteinizing Hormone Receptor
LHX9	Lim Homeobox9
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
IncARN	Longs ARN non-codant
LOH	Loss of heterosigosity
LV	Lentivirus
m-TESE	Micro-TESE
M1AP	Meiosis 1 Associated Protein
M33	Mouse Homologue of Polycomb
MAD2	Mitotic arrest deficient 2
MAEL	Maelstrom homolog
MAGE-A1	MAGE Family Member A1
MAGE-A4	MAGE Family Member A4
MAGEB6	MAGE Family Member B6
MAJIN	Membrane Anchored Junction Protein
Mb	Mégabases
MCM8	Minichromosome Maintenance 8 Homologous Recombination Repair Factor
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1
MEI1	Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1
Mei4	Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 4
MEIOB	Meiosis Specific with OB domains
MEIOC	Meiosis specific gene with coiled coil domain
miARNs	MicroARNs
MIS	Meiosis-inducing substance
MLH1	MutL Homolog 1
MLH3	MutL Homolog 3

MMR	DNA mismatch repair
MOV10L1	Moloney Leukemia virus 10-like 1
MPF	Maturation/Mitosis promoting factor
MPS	Meiosis-preventing substance
MPS1	Monopolar spindle 1
MRE11	MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
MSCI	Meiotic sex chromosomes silencing
MSH4	MutS homolog 4
MSH5	MutS homolog 5
MSOME	Motile Sperm Oganelle Morphology Examination
MSUC	Meiotic silencing of unsynapsed chromatin
MTOC	Centre organisateur des microtubules
NAHR	Non-allelic homologous recombination
NANOG	Nanog Homeobox
NANOS1	Nanos C2HC-Type Zinc Finger 1
NANOS2	Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2
NBS1	Nibrin
NCO	Non crossing-over
NGN3	Neurogenin 3
NGS	Next-Generation Sequencing
NHEJ	nonhomologous end joining
NMD	non-sens mediated mRNA decay
NR5A1	Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAM	protospacer adjacent motif
PAR	Pseudo-autosomal region
PAS	Period Acid Schiff's
PAX7	Paired Box 7
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PGD2	Prostaglandine D2
PGDS	Prostaglandin D Synthase
PIWI	P-element induced wimpy testis in Drosophila
PIWIL1	Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1
PIWIL2	Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 2
PIWIL3	Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 3
PIWIL4	Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 4
PLK1	Polo Kinase 1
PLK4	Polo Like Kinase 4
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
PNLDC1	PARN Like Ribonuclease Domain Containing Exonuclease 1

PRDM9	PR domain coding protein
PRM1	Protamine 1
PRM2	Protamine 2
Prospermatogonies M	Prospermatogonies Multiplying
Prospermatogonies T	Prospermatogonies Transitional
PSCR	Postmeiotic sex chromosome repression
PSMC3IP	PSMC3 Interacting Protein
PTCH1	Patched 1
RAD21	RAD21 Cohesin Complex Component
RAD21L	RAD21 Cohesin Complex Component Like
RAD50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein
RAD51	RAD51 Recombinase
RARA	Nuclear retinoic acid receptors A
RARB	Nuclear retinoic acid receptors B
RARG	Nuclear retinoic acid receptors G
RBMX	RNA Binding Motif protein, lié à l'X
RBMXL2	RBMX Like 2
RBMX	RNA Binding Motif protein, lié à l'Y
RBP	RNA binding protein
REC114	Recombinaison 114
REC8	REC8 Meiotic Recombination Protein
RNF212	Ring Finger Protein 212
RNP	Particules ribonucléoprotéiques
RPA	Replication Protein A
RV	Retrovirus
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SAC	Spindle assembly checkpoint
Sall4	Spalt Like Transcription Factor 4
SCOS	syndrome des cellules de Sertoli seules
SETX	Senataxin
SF-1	Steroidogenic Factor 1
sgRNA	Single guide RNA
SHOC1	Shortage In Chiasmata 1
SHOX	Short Stature Homeobox
SK	Syndrome de Klinefelter
SLC9A3	Solute Carrier Family 9 Member A3
SMC1α	Structural Maintenance Of Chromosomes 1 α
SMC1β	Structural Maintenance of Chromosomes 1 β
SMC3	Structural Maintenance Of Chromosomes 3
snoRNAs	Small nucleolar RNAs
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNP-CGH	Single nucleotide polymorphism - Array comparative genomic hybridization
snRNA	Small nuclear RNA

SOHLH1	Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1
SOHLH2	Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2
SOX10	SRY-Box10
SOX3	SRY-Box3
SOX9	SRY-Box9
SPATA22	Spermatogenesis Associated 22
SPINK2	Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 2
SPO11	SPO11 Initiator Of Meiotic Double Stranded Breaks
SPO22	Sporulation specific protein 22
SRR	Sperm retrieval rates
SRY	Sex determining Region of Y chromosome
SSC	Cellules souches spermatogoniales
ssDNA	Single strand DNA
STAG1/SA1	Stromal Antigen 1
STAG2/SA2	Stromal Antigen 2
STAG3/SA3	Stromal Antigen 3
STRA8	Stimulated by Retinoic Acide Gene 8
STX2	Syntaxin 2
SUN1	Sad1 And UNC84 Domain Containing 1
SUN5	Sad1 And UNC84 Domain Containing 5
SV	Sendai Virus
SYCE1	Synaptonemal complex central element 1
SYCE2	Synaptonemal complex central element 2
SYCE3	Synaptonemal complex central element 3
SYCP1	Synaptonemal complex protein 1
SYCP2	Synaptonemal complex protein 2
SYCP3	Synaptonemal complex protein 3
TAF4B	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 4b
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TBC	Complexes tubulo-bulbaires
TDRD1	Tudor Domain Containing 1
TDRD5	Tudor Domain Containing 5
TDRD7	Tudor Domain Containing 7
TDRD9	Tudor Domain Containing 9
TERB1	Telomere Repeat Binding Bouquet Formation Protein 1
TERB2	Telomere Repeat Binding Bouquet Formation Protein 2
TESE	Testicular sperm extraction
Tex11	Testis expressed 11
TEX12	Testis expressed 12
TEX14	Testis expressed 14
TEX15	Testis expressed 15
TF	Filaments transversaux
TGF	Testicular growth factor

TMPRSS9	Transmembrane Serine Protease 9
TOPBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1
TP1	Transition protein 1
TP2	Transition protein 2
TPR	Tétratricopeptides
Tra2β	Transformer 2 Beta Homolog
USP26	Ubiquitin Specific Peptidase 26
USP9Y	Ubiquitin Specific Peptidase 9 Y-Linked
UTF1	Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1
UTP14c	UTP14C Small Subunit Processome Component
WES	Whole-exome sequencing
WGS	Whole-genome sequencing
WHO	World health organization
WNK3	WNK Lysine Deficient Protein Kinase 3
WT	Wild type
Wt1	Wilm's tumor suppressor 1
WT1	WT1 Transcription Factor
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2
ZFN	Zinc finger nucleases
ZFX	Zinc finger Protein X-Linked
ZFY	Zinc finger protein Y-linked
ZMYND15	Zinc Finger MYND-Type Containing 15
ZNF85	Zinc Finger Protein 85
ZSWIM7	Zinc Finger SWIM-Type Containing 7

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures :

Figure 1 : Anatomie de l'appareil de reproduction masculin.

Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de vertébré au début de l'organogenèse.

Figure 3 : Différentiation gonadique dans l'espèce humaine.

Figure 4 : Chronologie du développement des cordons testiculaires chez la souris.

Figure 5 : Schéma anatomique et organisation du testicule humain.

Figure 6 : Épithélium séminifère dans les testicules de mammifères.

Figure 7 : La cellule de Sertoli englobant les cellules germinales.

Figure 8 : Diagramme schématique illustrant les périodes de prolifération des cellules de Sertoli chez l'homme.

Figure 9 : Populations des cellules germinales en développement chez la souris et l'homme.

Figure 10 : Facteurs impliqués dans l'initiation de la méiose murine dans les deux sexes.

Figure 11 : Description générale du processus de la spermatogenèse.

Figure 12 : Stades de l'épithélium séminifère chez l'homme (I-VI).

Figure 13 : Stades de l'épithélium séminifère chez la souris (I-XII).

Figure 14 : Expansion clonale et différenciation des spermatogonies.

Figure 15 : Marqueurs des spermatogonies indifférenciées et différenciées.

Figure 16 : Progression de la méiose des cellules germinales.

Figure 17 : Structure et organisation du complexe synaptonémal pendant la prophase I.

Figure 18 : Protéines impliquées dans l'échange de brin au cours de la réparation des CDBs chez la souris.

Figure 19 : Voies de recombinaison méiotique.

Figure 20 : Le complexe LINC/ le bouquet.

Figure 21 : Inactivation des chromosomes sexuels méiotiques (MSCI).

Figure 22 : Réseau du premier point de contrôle méiotique.

Figure 23 : Le point de contrôle SAC au cours de la méiose.

Figure 24 : Les étapes clés de la compaction du noyau durant la spermiogénèse murine.

Figure 25 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de souris.

Figure 26 : Processus de la spermiation.

Figure 27 : Contrôle hormonal et paracrine de la spermatogénèse.

Figure 28 : Classification des ARNnc.

Figure 29 : Biogenèse des miARN et piARN.

Figure 30 : Régulation épigénétique par les petits ARNs des différentes étapes de la spermatogénèse.

Figure 31 : Modèle du mode de fonctionnement de la protéine RBMXL2 au cours de la méiose murine.

Figure 32 : Biogenèse et fonction des piARNs pendant la spermatogénèse murine.

Figure 33 : Rôle potentiel de MOV10L1 et ses interactions avec les protéines de la machinerie des piARNs au cours de la spermatogénèse murine.

Figure 34 : Classification des différents phénotypes histologiques de la spermatogénèse humaine normale et pathologique.

Figure 35 : Schéma d'obtention des différentes anomalies chromosomiques.

Figure 36 : Les anomalies spermatiques et les résultats de TESE des microdélétions d'AZF.

Figure 37 : Évolution des techniques cytogénétiques et de génétiques moléculaires.

Figure 38 : La distribution des gènes en fonction de la spécificité du transcrit dans les testicules ainsi que dans tous les autres tissus. (Adaptée du site « The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org>).

Figure 39 : Analyse chromosomique sur puces à ADN ou SNP-CGH array.

Figure 40 : Cartographie d'homozygotie pour la localisation d'un gène pathogène.

Figure 41 : Vue d'ensemble de la stratégie d'identification d'un variant candidat par séquençage exomique.

Figure 42 : Diagnostic des tests génétiques dans l'azoospermie.

Figure 43 : Le système CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome.

Figure 44 : Création de souris KO/KI à l'aide du système CRISPR/Cas9.

Figure 45 : Délétion hémizygote des exons TEX11 10 à 12 et des régions introniques flanquantes chez deux patients azoospermes.

Figure 46 : Localisation d'une délétion exonique et des mutations identifiées dans les domaines protéiques de TEX11 chez l'Homme.

Figure 47 : Modèle schématisé du traitement de l'azoospermie chez la souris.

Figure 48 : Caractérisation des types d'arrêts de maturation chez l'homme.

Figure 49 : Thérapie génique *in vitro* ou *in vivo* dans le cadre de l'infertilité masculine.

Liste des tables :

Table 1 : Normes et valeurs de référence des paramètres spermatiques selon l'OMS en 2010.

Table 2 : Anomalies morphologiques du spermatozoïde selon la classification de David.

Table 3 : Tableau récapitulatif des gènes candidats identifiés en ANO humaine.

Table 4 : Bilan des mutations et polymorphismes du gène TEX11 décrites dans la littérature dans le cadre d'ANO.

AVANT-PROPOS

Chez les mammifères, à la fécondation, il y a établissement du sexe chromosomique (XX ou XY). Puis le sexe gonadique va se mettre en place sous le contrôle des gènes du déterminisme du sexe pour entraîner la différenciation en testicule ou ovaire. Chez le mâle, la différenciation comprend notamment les grandes étapes suivantes :

- Le développement fœtal de la gonade indifférenciée à la surface du mésonéphros
- La différenciation du testicule grâce à l'expression gonadique du gène SRY, chef de file de la différenciation mâle, entraînant l'expression de plusieurs gènes testiculaires.
- L'acquisition de la fonction endocrine et exocrine (spermatogenèse) du testicule. La spermatogenèse est un processus de différenciation cellulaire qui assure la production de spermatozoïdes dans les tubes séminifères. Ce mécanisme complexe, composé de différentes étapes clés bien coordonnées, se mettent en place à partir de la puberté. Une faille dans l'une des différentes étapes de la spermatogenèse peut conduire à une infertilité chez le mâle.

Notre équipe de recherche étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'infertilité masculine et féminine en s'intéressant à toutes les étapes de la reproduction, du gamète à l'évaluation néonatale, afin d'envisager si besoin une modification des pratiques et/ou une approche thérapeutique en cas d'anomalie de reproduction. Dans le cadre de ma thèse, l'objectif global était d'améliorer nos connaissances sur les étiologies génétiques de défauts spermatogéniques sévères entraînant une infertilité masculine. En raison de la grande diversité des anomalies responsables d'infertilité masculine, nous nous sommes focalisés sur un trouble quantitatif de la spermatogenèse : l'azoospermie due à un arrêt de maturation. Ce phénotype fait partie des pathologies dont l'étiologie est souvent inconnue et pour

laquelle la prise en charge est stéréotypée, se résumant actuellement à la réalisation d'une biopsie testiculaire.

Le but ultime de ce travail sera non seulement de répondre à la demande des patients de « savoir » la cause principale de leur infertilité, mais aussi, de trouver une stratégie diagnostique afin d'améliorer leur prise en charge et prédire leur chance d'être parents. Par conséquent, l'identification et la présentation de biomarqueurs pronostiques ainsi que la recherche de techniques thérapeutiques non invasives semblent nécessaires.

Afin de préciser le contexte physiologique de mon travail, je commencerai par une partie bibliographique que je diviserai en quatre chapitres. Dans le chapitre I, je ferai un bref rappel sur le système reproducteur masculin et l'anatomie des testicules. Le chapitre II décrira le processus de la spermatogenèse, ainsi que les principales étapes clés de la méiose. Les chapitres III et IV seront consacrés respectivement à l'azoospermie et les approches diagnostiques pour l'identification de nouvelles étiologies génétiques de ce phénotype sévère d'infertilité.

Après cette introduction, je présenterai la problématique sur laquelle mon travail est basé, ainsi que les objectifs de la thèse.

La seconde partie de ce manuscrit exposera les études expérimentales réalisées au cours de cette thèse. Elle est organisée sous forme d'une série d'articles associés à deux chapitres :

Chapitre 1 : Investigation génétique du phénotype d'azoospermie non-obstructive due à l'arrêt de maturation testiculaire chez l'homme (articles 1, 2, 3 et 4).

Chapitre 2 : L'étude fonctionnelle d'une altération génétique humaine transposée dans un modèle murin (article 5).

Enfin, je terminerai ce mémoire par une troisième partie qui sera consacrée à la discussion générale des résultats qui ont pu être obtenus pour les deux axes de recherche, et des perspectives.

Partie I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

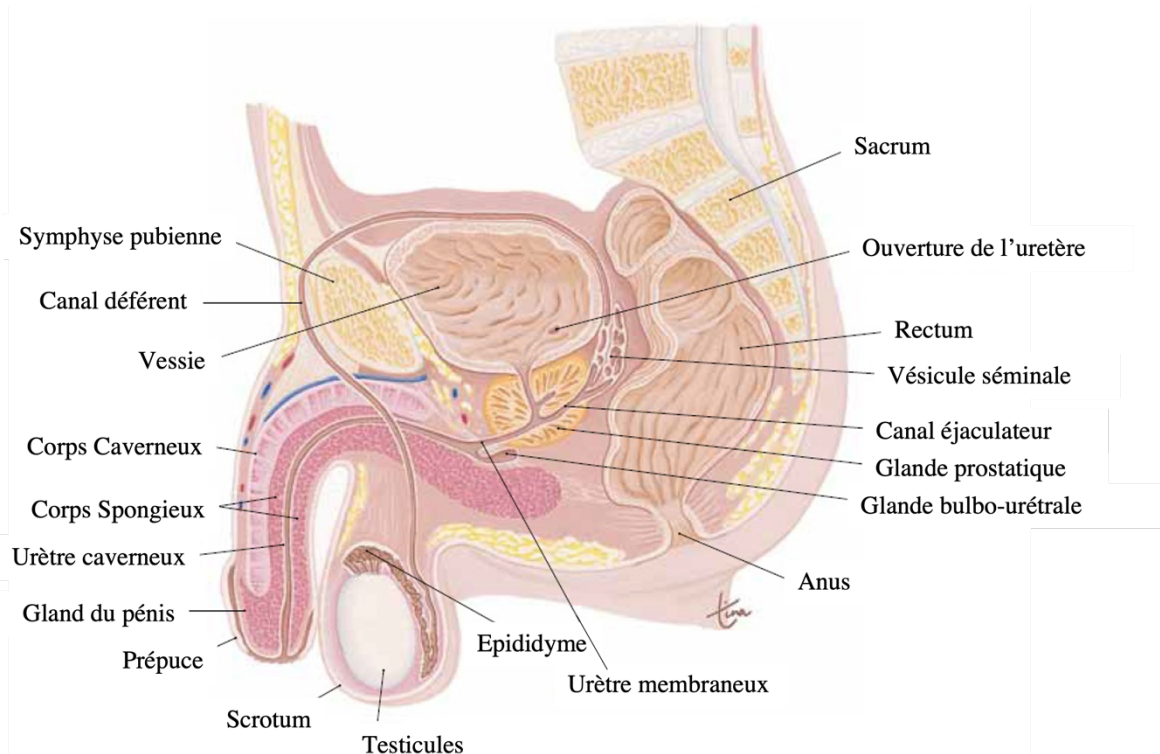


Figure 1 : Anatomie de l'appareil de reproduction masculin.

(Adaptée du site : <https://www.brainkart.com>)

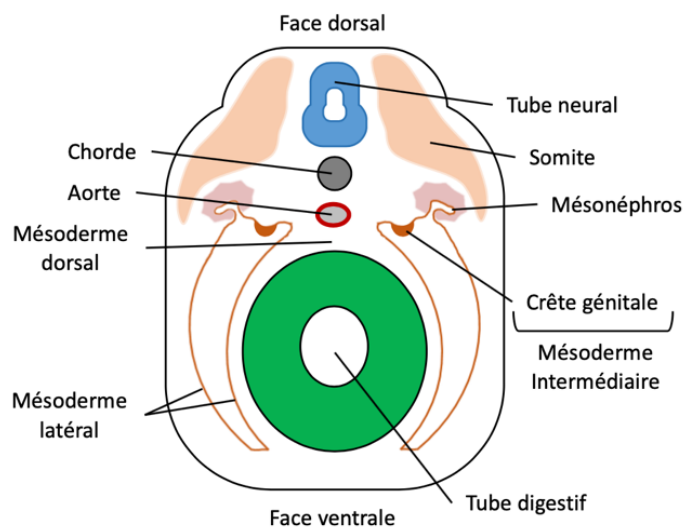


Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de vertébré au début de l'organogénèse.

Chapitre I : Le système reproductif masculin

I. La mise en place de l'appareil génital mâle

Chez l'homme, le système reproducteur masculin (**figure 1**) regroupe :

- les testicules (gonades mâles)
- l'épididyme
- le canal déférent
- les organes génitaux externes : urètre et pénis
- les glandes annexes : glandes prostatiques et glandes bulbo-urétrales de Cowper, vésicules séminales.

La mise en place de l'appareil génital se déroule pendant la période foetale. Si au début de la gestation, les embryons XX ou XY ne se différencient que par leur caryotype, c'est à partir de la 7^{ème} semaine de gestation, dans l'espèce humaine, que les gènes sexe-spécifiques vont s'exprimer et permettre la différenciation des gonades en ovaire ou testicule.

Les crêtes génitales ou gonades indifférenciées (dit également "bipotentielles") se développent à partir du mésoderme intermédiaire qui est situé entre le mésoderme latéral et les somites (**figure 2**). L'épaississement par prolifération cellulaire de l'épithélium cœlomique monocouche permet la formation des crêtes génitales. Chez les mammifères, plusieurs gènes jouent un rôle crucial dans la formation de ces crêtes génitales comme *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*) (Luo *et al.*, 1994), *Wt1* (*Wilm's tumor suppressor 1*) (Kreidberg *et al.*, 1993), *Lhx9* (*Lim Homeobox9*) (Birk *et al.*, 2000), *M33* (*Mouse Homologue of Polycomb*) (Katoh-Fukui *et al.*, 1998) et *Emx2* (*Empty spiracles homeobox gene 2*) (Miyamoto *et al.*, 1997). Lorsque les crêtes génitales sont formées, les cellules germinales primordiales (CGP) migrent dans ces crêtes génitales.

Suite à l'expression du gène *SRY* (*Sex determining Region of Y chromosome*), à partir de 41 jours de vie embryonnaire chez l'homme (Hanley *et al.*, 2000), des évènements .

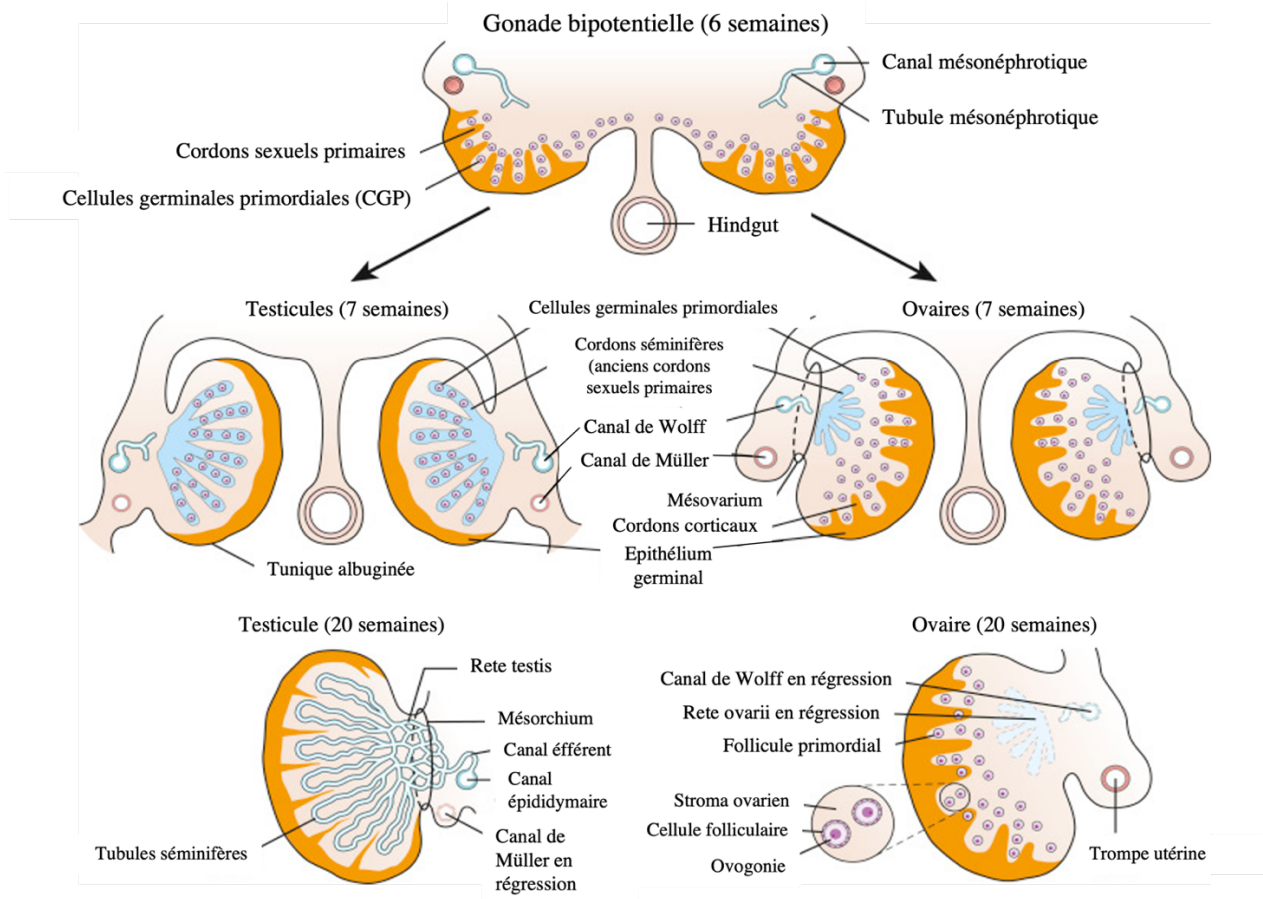


Figure 3 : Différentiation gonadique dans l'espèce humaine.

(Adaptée de Norris and Carr, 2021)

cellulaires et moléculaires vont permettre la différenciation de la gonade "indifférenciée" en testicule (**figure 3**). Deux types de cordons sont identifiés : les testiculaires et ceux du rete testis, à l'extrémité des premiers. Parallèlement, il y a formation du canal paramésonephrotique (ou canal de Müller), aux semaines 6-7 de gestation chez l'Homme, par invaginations de l'épithélium coelomique depuis la région du pronéphros, jusqu'à la région caudale. Les voies excrétrices du mésonephros vont devenir les canaux de Wolff, ceux-ci s'ouvrant dans la région dorsale du cloaque, futur sinus uro-génital. Ces 2 paires de canaux vont évoluer de façon différente en fonction du sexe de la gonade. Chez le mâle, l'induction du gène *Sox9* (*SRY-Box Transcription Factor 9*), en aval de *Sry*, va induire la différenciation des cellules de Sertoli et l'expression de l'AMH (*Anti-Müllerian Hormone*) (**figure 4**). Suite à la production d'AMH, les canaux de Müller régressent (canaux nécessaires à un développement des organes génitaux femelles) tandis que les canaux de Wolff persistent, sous l'action de la testostérone. L'ensemble entraîne la masculinisation de la gonade en développement (**figure 3**). Dans l'embryon femelle, à l'inverse, on observe un développement des canaux du Müller et la disparition des canaux de Wolff (par absence de testostérone). Le sinus urogénital, le tubercule génital et les plis génitaux, formeront les organes génitaux externes par l'action des hormones dont la dihydrotestostérone chez le mâle. La différenciation de l'appareil reproducteur se déroule donc selon une cascade génétique, commençant par l'établissement du sexe génétique à la conception. Chez les mammifères, la présence du gène *SRY* va permettre de modifier l'équilibre entre les voies féminines et masculines, et permettre à ces dernières de persister pour former un testicule. L'absence de *SRY* entrainera quant à elle une inhibition des voies masculines et, avec l'expression de plusieurs gènes "pro-ovariens", le développement d'un ovaire.

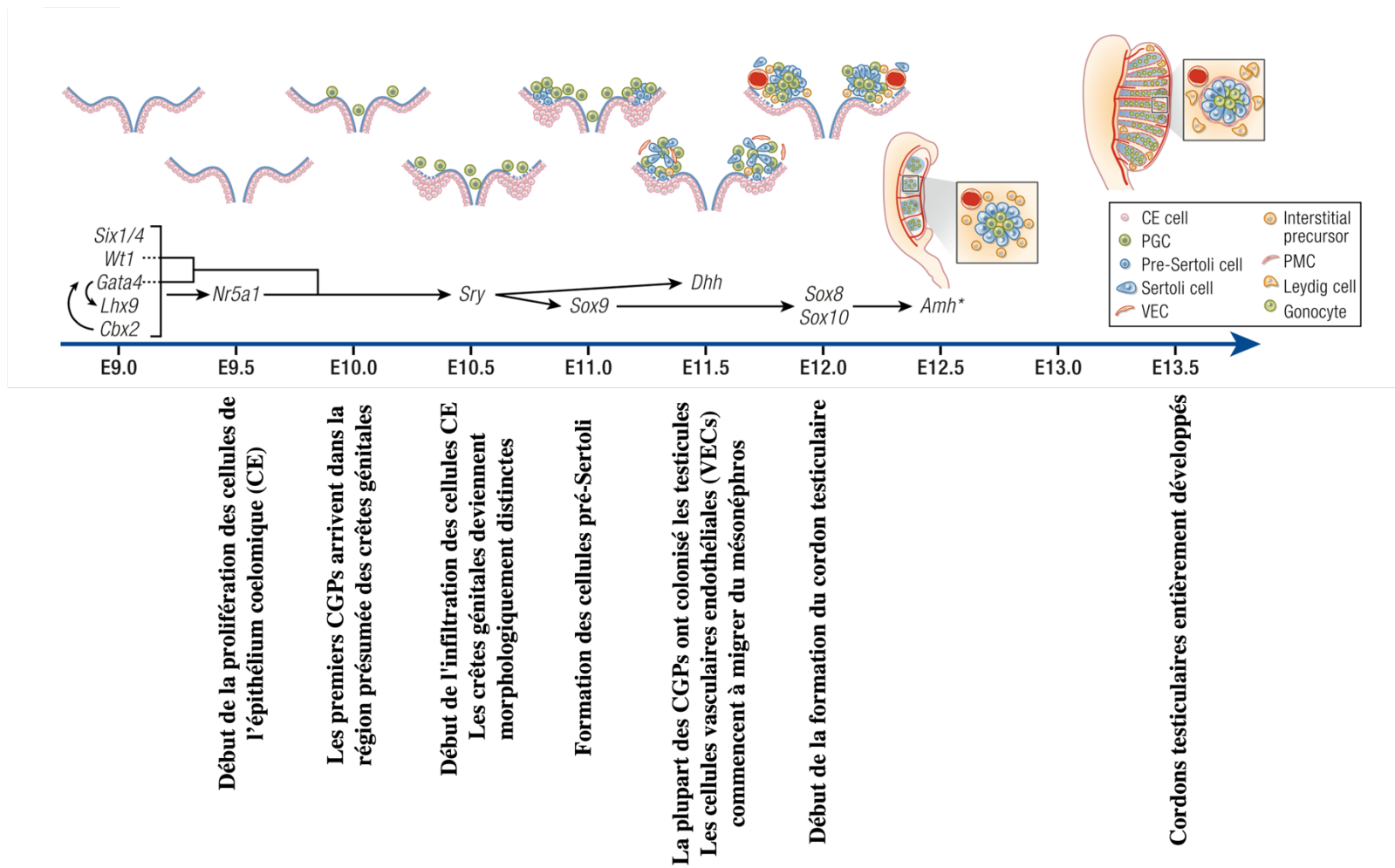


Figure 4 : Chronologie du développement des cordons testiculaires chez la souris.
 (Adaptée de Mäkelä *et al.*, 2019)

II. Anatomie et fonction du testicule

Les testicules (**figure 5**) sont des organes reproducteurs mâles, principalement responsables de deux fonctions distinctes :

- La production de spermatozoïdes (fonction exocrine, lors de la gamétogenèse).
- La synthèse des hormones stéroïdes sexuelles mâles, les androgènes (fonction endocrine, lors de la stéroïdogénèse).

Les testicules sont situés dans le scrotum, ce qui permet de les maintenir à une température d'environ 34-35°C chez l'Homme, soit légèrement inférieure à la température corporelle, mais température nécessaire pour une production de spermatozoïdes viables. La migration des testicules du bas de l'abdomen vers le scrotum a lieu durant le développement foetal, et s'achève juste avant la naissance. Chez l'homme, les testicules ont une forme ovoïde de 4 à 5 cm de longueur et 2 cm à 3 cm de largeur, pour un volume testiculaire de 16 à 20 ml.

Le cordon spermatique suspend la face supérieure des testicules à l'abdomen, et contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des nerfs, et le canal déférent qui transporte le sperme des testicules à l'urètre (**figure 5**). Une tunique vaginale, à double couche, enveloppe les testicules sauf aux bords postérieur et supérieur où l'épididyme et le cordon spermatique sont attachés. La couche viscérale ou interne de la tunique vaginale est proche de l'épididyme, des testicules et du canal déférent. La surface latérale postérieure des testicules présente un petit espace entre les testicules et le corps de l'épididyme connu sous le nom de sinus de l'épididyme. Au plus profond de la tunique vaginale se trouve une tunique, l'albuginée, une enveloppe épaisse parcourue par des vaisseaux testiculaires et composée par des cellules musculaires lisses et des fibres de collagène qui encapsulent chaque testicule.

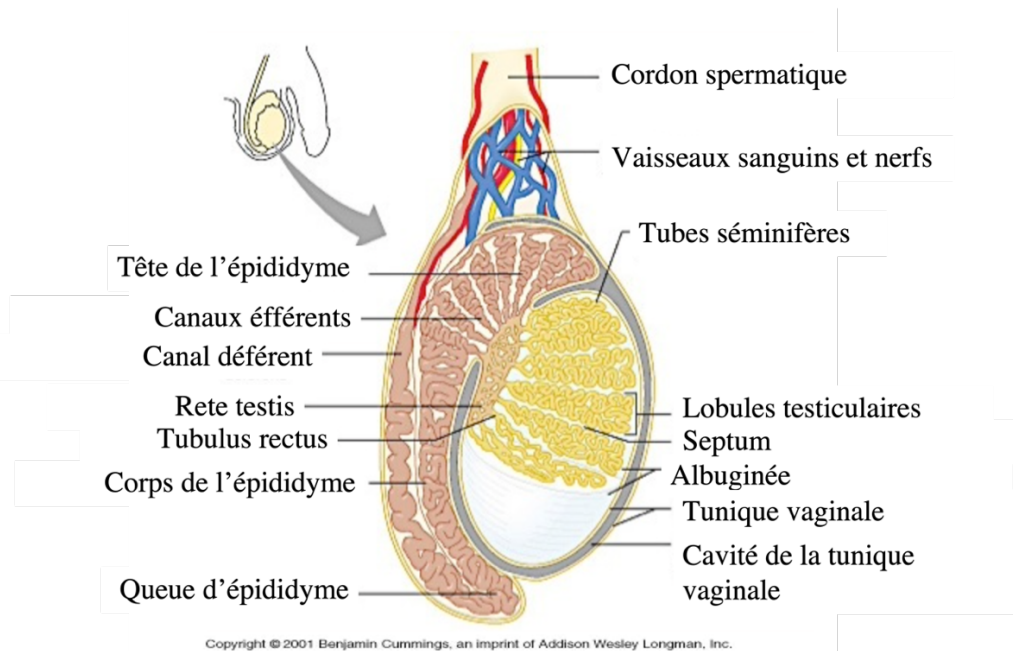


Figure 5 : Schéma anatomique et organisation du testicule humain.

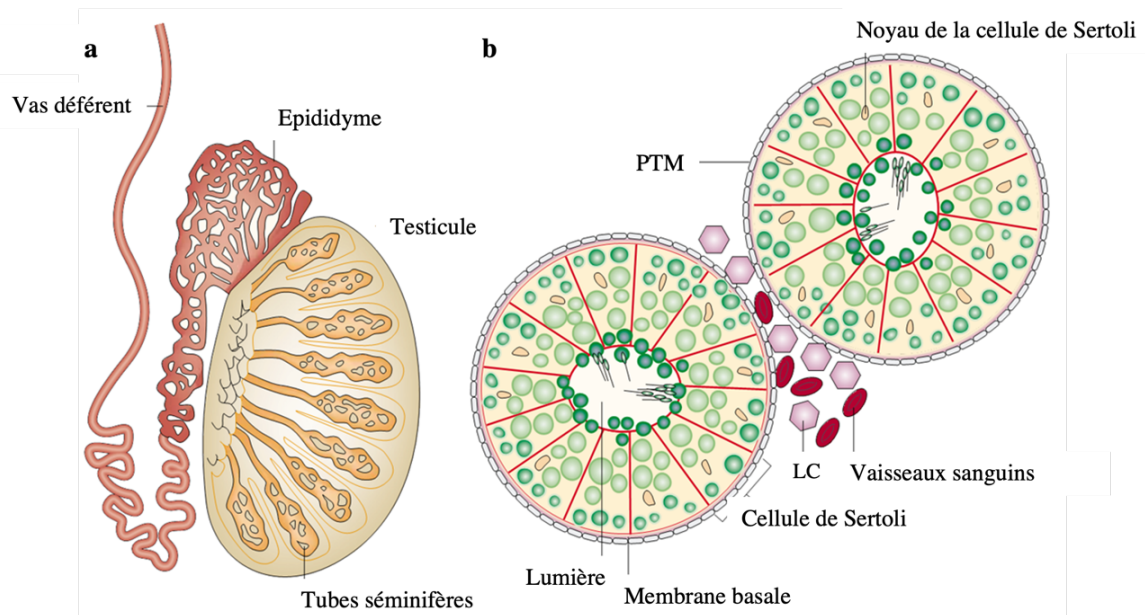


Figure 6: Épithélium séminifère dans les testicules de mammifères.

(a) Schéma d'une coupe transversale d'un testicule, montrant l'emplacement des tubes séminifères, du canal déférent et de l'épididyme. (b) Coupe transversale schématique à travers un tube testiculaire, montrant les cellules germinales (vert) à différents stades de maturation intégrées dans les cellules somatiques de Sertoli (chaque cellule de Sertoli est encadrée en rouge). Les cellules de Leydig (LC, en rose) sont présentes dans l'interstitium. Les spermatozoïdes sont dans la lumière des tubes. PTM = cellule myoïde pérítubulaire. (Modifiée de Cooke and Saunders, 2002)

L'albuginée permet la propulsion des spermatozoïdes et du liquide testiculaire hors du testicule grâce aux contractions rythmiques spontanées.

Au niveau histologique, chaque testicule est divisé intérieurement en compartiments appelés lobes ou cordons testiculaires. Chaque lobe contient plusieurs tubules séminifères, dans lesquels se déroule la spermatogenèse (détaillée dans le chapitre II). Au niveau de la partie supérieure du testicule, l'épaississement de l'albuginée forme le corps de Highmore (perforé par des canaux) qui contient le rete testis où débouchent les extrémités des tubes séminifères (**figure 5**). Des cloisons conjonctives, tendues entre l'albuginée et le rete testis, délimitent 200 à 300 lobules testiculaires, communicants et comprenant plusieurs tubes séminifères. Les spermatozoïdes produits dans les testicules sont transportés par les canaux reproducteurs : épидидyme, canal déférent, canal éjaculateur et enfin urètre. Les glandes reproductrices produisent des sécrétions qui sont ajoutées aux spermatozoïdes. L'ensemble forme le sperme, c'est-à-dire le liquide éjaculé de l'urètre. Ces glandes reproductives sont constituées des vésicules séminales, de la prostate et des glandes bulbo-urétrales.

III. Épithélium séminifère

L'épithélium séminifère (**figure 6**) représente 60 à 80% du volume testiculaire total. L'architecture testiculaire et la production de spermatozoïdes sont soutenues par un réseau complexe de communications entre divers types de cellules. Les structures testiculaires sont divisées en deux compartiments principaux : le tissu interstitiel, contenant les cellules de Leydig, qui sont responsables de la production d'androgènes et l'épithélium séminifère proprement dit, contenant les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

L'épithélium séminifère est entouré d'une lame basale, d'une à plusieurs couches de cellules myoïdes pérítubulaires, d'une couche de fibronectine recouverte de cellules endothéliales et de fibrilles de collagènes.

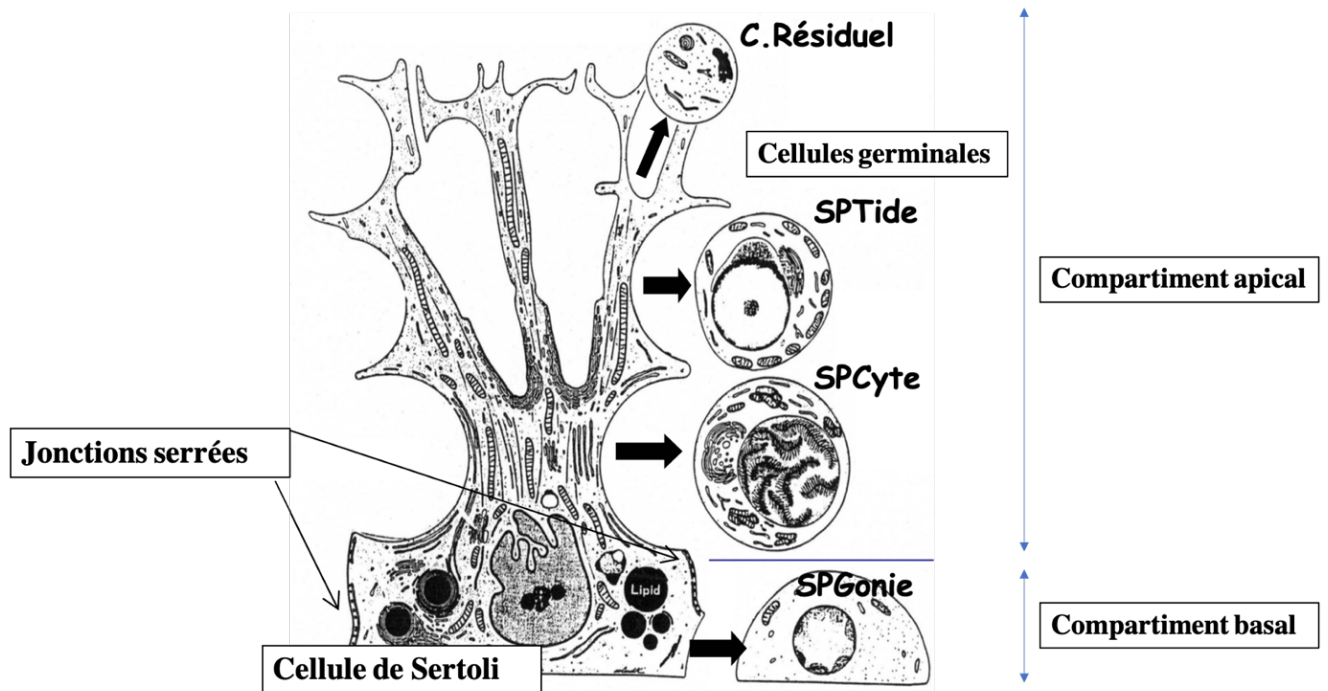


Figure 7: La cellule de Sertoli englobant les cellules germinales.

SPGonie= spermatogonie, SPCyte= spermatocyte, SPTide= spermatide, C.Résiduel= corps résiduel.

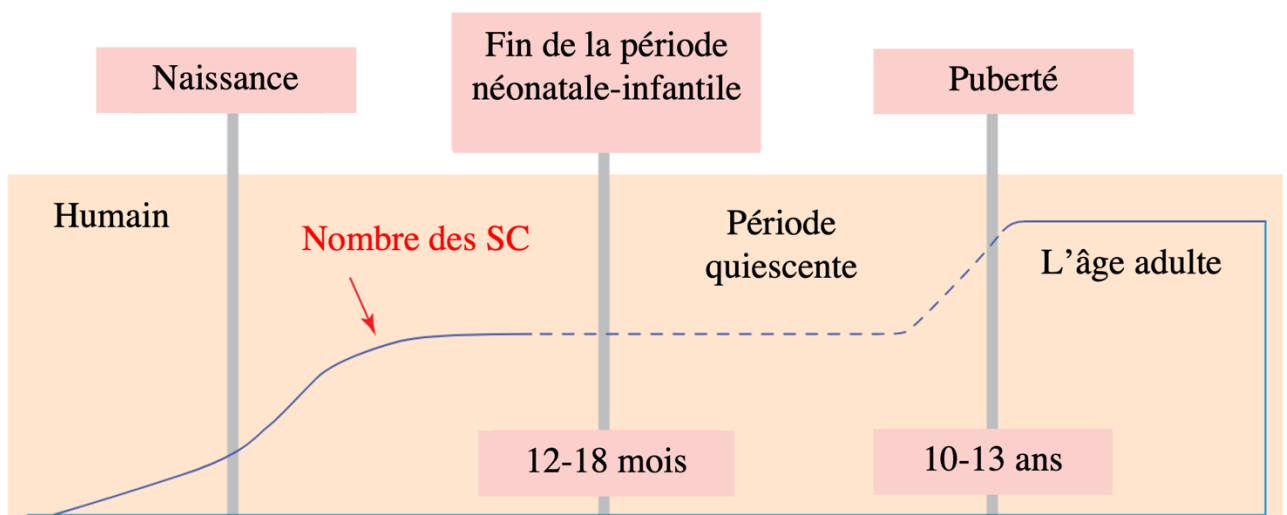


Figure 8 : Diagramme schématique illustrant les périodes de prolifération des cellules de Sertoli chez l'homme.

SC= cellules de Sertoli. (Modifiée de Sharpe *et al.*, 2003a)

A. Les cellules de soutien du testicule : cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli (**figure 7**) sont des cellules somatiques du testicule et les premières cellules à se différencier de manière reconnaissable dans la gonade foetale. Chez la souris à 10.5 *jpc* (vers le 41-44^{ème} jour de gestation chez l'Homme), les cellules de l'épithélium coelomique qui expriment le gène *Sry* sont appelées les cellules pré-Sertoli (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990). Elles vont proliférer et se différencier en cellule de Sertoli exprimant le gène *Sox9* (Karl and Capel, 1998; Schmahl *et al.*, 2000). *Sox9* est indispensable pour la différenciation d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli. L'expression de SOX9 va aussi entraîner l'activation d'autres facteurs comme FGF9 (*Fibroblast Growth Factor 9*) et prostaglandine D2 (PGD2)/Prostaglandine D synthase (PGDS) (enzyme qui catalyse l'étape finale dans la synthèse de PGD2) qui vont également contribuer à la différenciation des cellules de Sertoli. Des boucles de régulation FGF9/FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) et PTGDS/PGD2 fonctionnent en parallèle et contribuent à la différenciation d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli. Il y a une amplification et un maintien des niveaux de SOX9 contribuant ainsi à la différenciation du testicule (Piprek, 2010; Moniot *et al.*, 2009; Bagheri-Fam *et al.*, 2008).

Les cellules de Sertoli présentent un arrêt de prolifération entre 11.5 et 12.5 *jpc*, lorsqu'elles s'organisent dans la gonade (Schmahl *et al.*, 2000). En effet, ces cellules s'agrègent entre elles et créent des contacts avec les cellules germinales pour les entourer et former des clusters, futurs cordons séminifères qui se développeront ensuite en tubes séminifères chez l'adulte (Nel-Themaat *et al.*, 2009; Nel-Themaat *et al.*, 2011). Chez l'Homme, ce regroupement en cordons séminifères a lieu entre la 6^{ème} et 7^{ème} semaine de gestation (Jirásek, 1971; WARTENBERG, 1989).

Le schéma de prolifération des cellules de Sertoli est organisé au cours de deux périodes de la vie chez toutes les espèces mammifères (Sharpe *et al.*, 2003b). La première phase de prolifération survient pendant la vie foetale et néonatale et la

seconde pendant la période péripubertaire et pubertaire (**figure 8**). Ces deux phases sont séparées par une période de « quiescence » (Sharpe *et al.*, 2003).

Pendant la phase du développement foetal, les cellules de Sertoli expriment différentes molécules, comme l'AMH, qui leur sont spécifiques et qui jouent un rôle important pour le développement correct du testicule (cf paragraphe « la mise en place de l'appareil génital mâle »; régression des canaux de Müller) (Sharpe *et al.*, 2003).

C'est autour de la puberté que les cellules de Sertoli sortent de leur état de quiescence, prolifèrent et deviennent matures sous l'action de l'axe gonadotrope et de plusieurs facteurs comme la testostérone, l'hormone thyroïdienne ou l'acide rétinoïque (Buzzard *et al.*, 2003).

La cellule de Sertoli mature, non proliférative, présente une pléthore de caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Sa forme est pyramidale et sa hauteur détermine celle de l'épithélium séminifère. Ses faces latérales englobent les cellules germinales en différenciation. A la puberté, l'AMH diminue dans les cellules de Sertoli avec l'apparition de la première vague de spermatogenèse dans les tubes séminifères. Les cellules de Sertoli deviennent sensibles aux androgènes (Boukari *et al.*, 2009). Des sécrétions polarisées contribuent à la formation d'un tubule séminifère avec une lumière (**figure 7**) (Sharpe *et al.*, 2003).

Les cellules de Sertoli sont le siège de la spermatogenèse et elles assurent un grand nombre de rôles cruciaux à différentes phases (Hai *et al.*, 2014) :

- (1) Nourrir et supporter les cellules germinales en développement, notamment via l'action des hormones gonadotropes, et en sécrétant différentes protéines et facteurs de croissance.
- (2) Compartimenter les tubes séminifères grâce aux complexes de jonctions serrées inter-Sertoli impliquées dans la constitution de la barrière hémato-testiculaire (BHT) qui protège les cellules germinales en développement, notamment du système immunitaire.

- (3) Contrôler la migration et l'acheminement des cellules germinales en cours de différenciation et libération des spermatozoïdes matures dans la lumière du tube séminifère (spermiation).
- (4) Phagocyter l'excédent de cytoplasme des spermatides en maturation lors de la formation des spermatozoïdes, ainsi que les cellules germinales apoptotiques.
- (5) Secréter du fluide testiculaire dans la lumière du tube séminifère, favorisant le transfert des spermatozoïdes vers l'épididyme.

Les cellules de Sertoli sont donc indispensables pour l'architecture du testicule mais également pour la survie des cellules germinales. Un développement correct des cellules de Sertoli est un critère essentiel au développement des cellules germinales ainsi qu'à la fonction de reproduction de l'individu adulte.

B. La lignée germinale

Si l'ensemble des cellules somatiques du testicule assure une fonction de structure de l'architecture de la gonade ainsi qu'une fonction endocrine fondamentale pour le développement, les cellules germinales fœtales, et notamment la mise en place de ces dernières, seront responsables du pool de spermatogonies souches et permettront ainsi la production d'une quantité de gamètes adéquate pour la vie reproductive de l'âge adulte.

1. Développement des cellules germinales fœtales

Les cellules de la lignée germinale subissent deux grandes phases de développement :

- La première phase a lieu au cours de la vie fœtale (dès la 6^{ème} semaine de gestation chez l'homme ; entre 12-5 et 14.5 jpc chez la souris) et néonatale et permet la transition de la CGP vers la pro-spermatogonie puis spermatogonie.

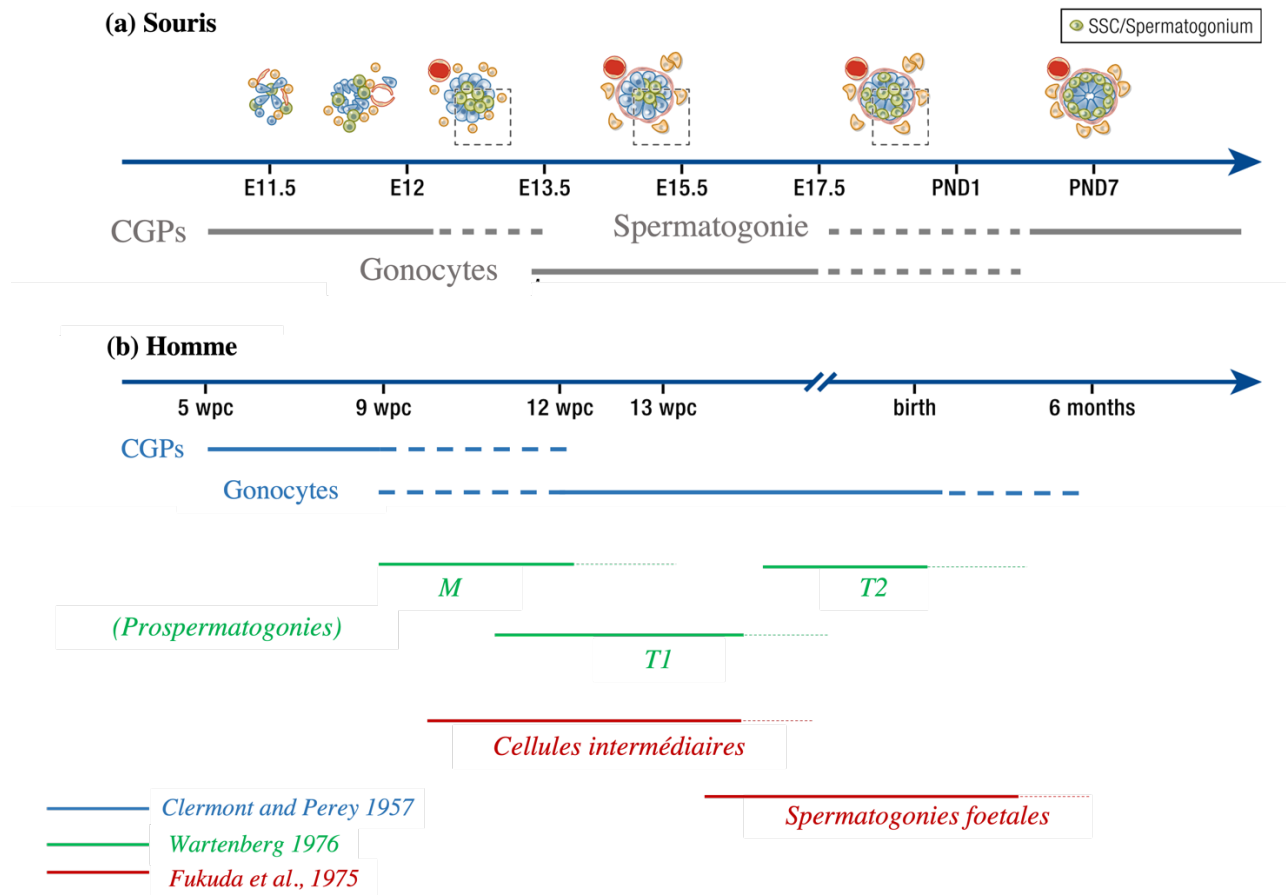


Figure 9: Populations des cellules germinales en développement chez la souris et l'homme.

(Modifiée de Mäkelä et al., 2019)

- La deuxième phase a lieu au moment de la puberté et suit les cycles de la spermatogenèse, qui, à partir de la spermatogonie, produiront le pool de spermatozoïdes. Cette deuxième phase sera développée dans le chapitre suivant (Chapitre II).

Durant la première phase foétale, différentes grandes étapes ont lieu : l'inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales, la suppression d'expression des gènes de pluripotence, et l'expression de marqueurs spécifiques contrôlant le développement des cellules germinales mâles (Stukenborg *et al.*, 2013).

Chez l'homme, à partir de la colonisation de la gonade par les cellules germinales, (dès 5^{ème} semaine de gestation) et tout au long de la vie foétale, ces cellules germinales subissent une phase de transformation ou préspermatogenèse. Chez les rongeurs, ces cellules germinales foétales sont appelées gonocytes pendant toute cette période. Sur le plan histologique, ces cellules sont caractérisées par leur gros noyau avec plusieurs nucléoles bien visibles (Wartenberg, 1976). Deux types de nomenclatures ont été proposées concernant ces cellules germinales foétales chez l'Homme (**figure 9**) :

- A partir des gonocytes foétaux, une population de prospermatogonies M (Multiplying) apparaît présentant une activité mitotique (64 *jpc*, soit environ 9 semaines de gestation). Ces cellules sont progressivement remplacées par les prospermatogonies T (Transitional) puis par les spermatogonies souches. Deux sous-catégories de prospermatogonies T sont décrites: les prospermatogonies T1 qui apparaissent environ à 85 *jpc* (12^{ème} semaine de gestation), puis les prospermatogonies T2 vers la 20^{ème} semaine de gestation (Hilscher and Hilscher, 1976; Wartenberg, 1976) (**figure 9**).
- D'autres recherches ont mis en évidence trois populations de cellules germinales au cours de la vie foétale qui sont : les gonocytes puis les cellules intermédiaires et enfin les spermatogonies foétales (Fukuda *et al.*, 1975). Les cellules intermédiaires sont décrites vers la 10^{ème} semaine avec un pic de prédominance aux alentours de la 15^{ème} semaine (coïncide avec l'apparition des

premières spermatogonies fœtales), lesquelles seront majoritaires à la 22^{ème} semaine de vie fœtale. A ce stade là, plus aucun gonocyte n'est observable (Fukuda *et al.*, 1975) (**figure 9**).

Chez l'homme, les gonocytes expriment majoritairement des marqueurs de pluripotence (PLAP ; OCT3/4 ; NANOG ; C-KIT) ainsi que des antigènes oncogéniques (M2A ; AP-2 γ). Ils se différencient d'abord en cellules intermédiaires puis en prospermatogonies. Cette différenciation est accompagnée par la perte d'expression progressive des marqueurs gonocytaires et l'acquisition des marqueurs caractéristiques des prospermatogonies (MAGE-A1; MAGE-A4; VASA). Chez l'Homme ces cellules se différencient de manière asynchrone conduisant ainsi à l'existence de plusieurs sous populations de cellules germinales à différents stades de différenciation au sein du testicule fœtal (**figure 9**).

2. Différenciation des cellules germinales XY en pro-spermatogonies

Chez les mammifères, les cellules germinales fœtales réinitialisent leur épigénome et acquièrent un profil de méthylation spécifique au sexe de l'individu à des stades de développement différents chez les mâles et les femelles.

Une première vague de déméthylation globale du génome des CGP a lieu peu après la fécondation. Cette phase de déméthylation épargne les gènes soumis à l'empreinte, les éléments répétés (et le chromosome X pour les CGP XX) (Seisenberger *et al.*, 2012). La deuxième vague de déméthylation a lieu au niveau des régions exclues de la première vague et se déroule lors de l'entrée des CGP dans la gonade (10,5 *jpc* chez la souris, 7^{ème} semaine de gestation chez l'Homme). Un certain pourcentage de méthylation est toujours présent dans les cellules XY (environ 14%) (Seisenberger *et al.*, 2012). Puis vers 15,5-17,5 *jpc* chez la souris (vers la 19^{ème} semaine de gestation chez l'Homme), les CGP XY commencent leur reméthylation *de novo* pour atteindre un niveau de méthylation maximal après la naissance au stade pachytène de première

division méiotique (Kato *et al.*, 2007; Oakes *et al.*, 2007a) (chez les femelles, cette reméthylation ne débute qu'après la naissance).

La reméthylation des cellules germinales XY est sous le contrôle de *Dnmt3l* (*DNA methyltransferase 3-like*) (Bourc'his and Bestor, 2004; La Salle *et al.*, 2007). Brièvement, DNMT3L est impliqué dans l'état de quiescence des pro-spermatogonies et le contrôle de leur état de méthylation. C'est un cofacteur des enzymes DNMT3A (*DNA Methyltransferase 3 Alpha*) et DNMT3B (*DNA Methyltransferase 3 Beta*), impliquées dans la reméthylation *de novo* des CGP XY (Hata *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2007; La Salle and Trasler, 2006; Suetake *et al.*, 2004).

Cette reméthylation spécifique des CGP mâles donne naissance aux pro-spermatogonies accompagnés d'une diminution de l'expression de gènes pluripotents et une augmentation des gènes de la différenciation mâle. Cette diminution d'état pluripotent se fait en concomitance avec l'arrêt mitotique progressif des cellules germinales en phase G0/G1 entre 12,5 et 14,5 *jpc* chez la souris (Western *et al.*, 2008). L'état de quiescence des pro-spermatogonies dure jusqu'au stade périnatal (vers 2-3 *jpp*) où elles reprennent les mitoses pour former la population de cellules souches spermatogoniales (Yoshida *et al.*, 2006) puis entrent en méiose au cours de la spermatogenèse.

L'évolution des cellules germinales à partir des spermatogonies sera abordée dans le chapitre II.

3. Inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales mâles

Dans l'ovaire fœtal de souris, les cellules germinales femelles XX arrêtent de proliférer et entrent en méiose à partir de 13,5 *jpc*. Les cellules germinales XY du testicule fœtal continuent à proliférer et deviennent progressivement quiescentes. La méiose des CGP

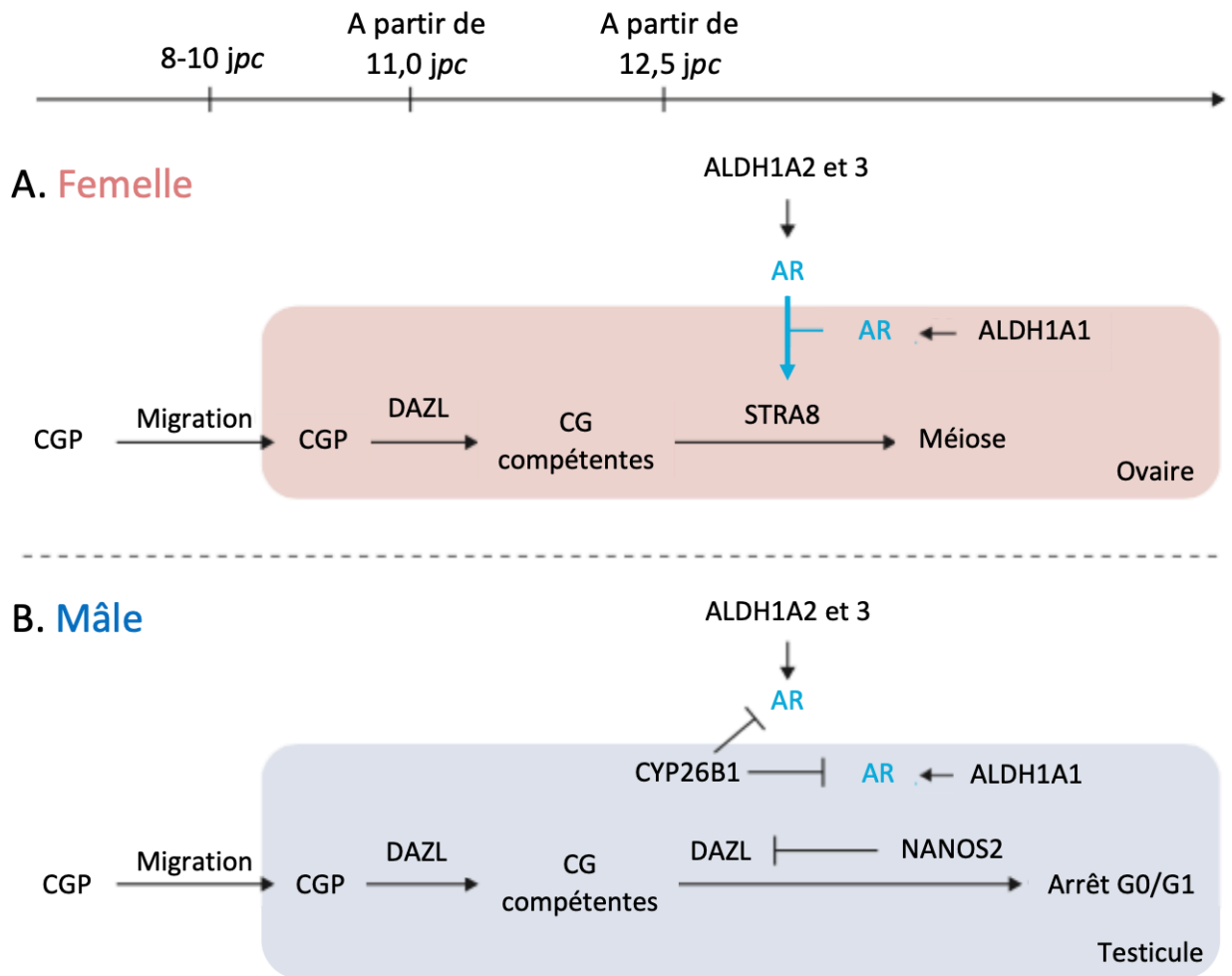


Figure 10 : Facteurs impliqués dans l'initiation de la méiose murine dans les deux sexes. (Adaptée de Endo *et al.*, 2019)

XY est initiée après la naissance, à partir de la puberté des mâles (Anderson *et al.*, 2008; Baltus *et al.*, 2006). Aussi, le testicule foetal doit donc se prémunir contre une entrée en méiose de ses cellules germinales XY.

L'initiation de la méiose est un événement intrinsèque aux cellules germinales, mais dépend aussi des facteurs environnementaux produits par les cellules somatiques gonadiques. L'environnement somatique des cellules germinales mâles va orienter leur devenir. Les cellules germinales XY sont rapidement localisées au sein des cordons séminifères, ce qui entraîne leurs isolements et une protection envers des signaux environnementaux.

Dès les années 1970, une hypothèse a été émise que l'entrée en méiose des cellules germinales XX serait enclenchée durant la vie embryonnaire par une substance induisant la méiose (MIS, pour *meiosis-inducing substance*) (Byskov and Saxén, 1976). A l'inverse, une substance (MPS pour *meiosis-preventing substance*) empêcherait la méiose en inhibant l'action du MIS, et donc, l'entrée en méiose des cellules germinales XY.

Chez la souris, l'inactivation de *Dazl* (*Deleted in Azoospermia Like*) empêche l'entrée en méiose des CGP XX ou l'entrée en quiescence pour les cellules germinales XY (Lin *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2011). *Dazl* permet aux CGP d'induire l'ovogenèse ou la spermatogenèse en les permettant de répondre aux signaux somatiques présents dans la gonade XX ou XY (**figure 10**). En revanche, son expression est finement contrôlée dans les cellules germinales XY pour empêcher une initiation précoce de la méiose.

Le gène *Stra8* (*Stimulated by Retinoic Acide Gene 8*) est considéré comme un régulateur clé de l'entrée en méiose des cellules germinales. Cette méiose est initiée par le gène *Stra8* à des stades différents en fonction du sexe. Il a été montré par différents modèles murins knockout, que *Stra8* est indispensable, après la naissance pour le passage d'un mode de divisions mitotiques vers celui de divisions méiotiques, dans la gonade mâle (Anderson *et al.*, 2008; Mark *et al.*, 2008). *Stra8* est un gène stimulé par l'acide

rétinoïque (AR) chez l'homme et la souris. En période fœtale, dans les gonades embryonnaires XY, il est donc indispensable qu'une initiation potentielle de la méiose par l'AR soit inhibée. L'enzyme CYP26B1 (*Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1*), enzyme dégradant l'AR, empêcherai l'entrée en méiose (MacLean *et al.*, 2001; White *et al.*, 2000). CYP26B1 est exprimée par les cellules de Sertoli, de 12,5 à 15,5 *jpc* pour atteindre un pic d'expression à 13,5 *jpc* (Bowles *et al.*, 2006). L'invalidation de *Cyp26b1* chez la souris (MacLean *et al.*, 2007) ou son inhibition dans des testicules en culture *in vitro* (Bowles *et al.*, 2006), induit une sur-expression de *Stra8*. Ainsi, CYP26B1 protège les cellules germinales mâles fœtales d'une exposition à l'AR en dégradant cette dernière. *Cyp26b1* empêcherait ainsi une initiation de la méiose dans le testicule fœtal (**figure 10**).

D'autres facteurs sont nécessaires pour maintenir une répression de la méiose comme NANOS2 (*Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2*) et FGF9. La protéine de liaison NANOS2 est exprimée spécifiquement dans les gonades XY à partir de 12,5 *jpc* (Tsuda *et al.*, 2003). Cette expression persiste dans le testicule adulte. Une augmentation de l'expression de *Stra8* à 14,5 *jpc* a été observée dans les cellules germinales XY *Nanos2^{-/-}*, induisant une initiation précoce de la méiose (Suzuki and Saga, 2008). Ces cellules dégèneront en apoptose à partir de 15,5 *jpc*. Toutefois, l'expression de *Cyp26b1* était similaire dans les testicules *Nanos2^{-/-}* par rapport aux testicules *Nanos^{+/-}* (Suzuki and Saga, 2008). De plus, il a été démontré que le niveau d'expression de *Dazl* est inversement proportionnel à l'expression de NANOS dans les gonades XY (Suzuki *et al.*, 2007). Dans les gonades *Nanos2^{-/-}*, l'expression de *Dazl* est significativement plus élevée par rapport au contrôle à 15,5 *jpc* (Kato *et al.*, 2016).

Ces résultats suggèrent que NANOS2 régule *Dazl* dans les CGP et réprime ainsi son expression à partir de 12,5 *jpc* spécifiquement dans les gonades mâles empêchant l'initiation de la méiose.

FGF9 est un autre facteur intervenant dans l'initiation de la méiose foetale mâle. Le phénotype des souris *Fgf9*^{-/-} est proche de celui des souris *Nanos2*^{-/-} avec une entrée précoce des cellules germinales XY en méiose (DiNapoli *et al.*, 2006). FGF9 régule positivement l'expression de *Nanos2* dans des cultures de gonades de souris mâle et femelle à 12,5 et 13,5 *jpc* (Barrios *et al.*, 2010; Bowles *et al.*, 2010). L'ajout d'AR dans le milieu de culture, en revanche, inhibe l'expression de *Nanos2* dans les testicules embryonnaires (Barrios *et al.*, 2010). Ces résultats révèlent que FGF9 (impliqué au préalable dans la différenciation testiculaire) empêche aussi l'initiation précoce de la méiose dans les cellules germinales de testicules foetaux en agissant inversement à l'AR sur l'expression de *Nanos2*. Or, comme l'expression de *Cyp26b1* dans les cellules de Sertoli diminue progressivement avec le développement embryonnaire (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006), cela nécessite une prise de relais par les facteurs NANOS2 et FGF9 pour empêcher l'entrée en méiose de façon précoce des CGP XY.

Les 3 gènes, *Cyp26b1*, *Nanos2* et *Fgf9* sont donc essentiels pour l'inhibition de la méiose des CGP XY, avec d'abord l'action de CYP26B1, puis de FGF9, et enfin de NANOS2. Dans les gonades femelles, l'AR n'est pas dégradé (avec notamment l'absence de CYP26B1) et peut donc agir sur les CGP en induisant l'expression de STRA8 (**figure 10**).

Récemment, il a été montré que l'expression de *Stra8* dans les ovaires foetaux de souris est indépendante de l'expression de l'AR. L'invalidation des gènes *Aldh1a1* (*aldéhyde déshydrogénase famille 1, sous-famille A1*), *Aldh1a2* et *Aldh1a3* codant pour les enzymes de synthèse d'AR, n'empêche pas l'initiation de la méiose, mais induit une absence d'expression d'AR et une diminution de celle de STRA8 (Chassot *et al.*, 2020). Des résultats similaires ont été obtenus après la suppression des récepteurs nucléaires de l'AR (RARA (*nuclear retinoic acid receptors A*), RARG et RARB) (Vernet *et al.*, 2020). Cela suggère que dans les ovaires foetaux de la souris, l'initiation de la méiose ne dépend pas nécessairement de l'AR.

Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes qui déclenchent la méiose dans l'ovaire foetal et ceux qui l'empêchent dans le testicule foetal.

IV. Tissu interstitiel

A. Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig assurent une des fonctions essentielles du testicule : la production d'androgènes dans le milieu interstitiel (entre les cordons testiculaires). Les cellules de Leydig font parties des trois types cellulaires majeurs du testicule, avec les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Cette population cellulaire est le deuxième type cellulaire majeur du compartiment des cellules somatiques (Leydig, 1850).

Chez tous les mammifères, il existe au moins deux populations temporellement différenciables de cellules de Leydig : les cellules de Leydig foetales (présentes jusqu'à la naissance) et les cellules de Leydig adultes (dans le testicule pré-pubère), qui présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes (revue dans Habert *et al.*, 2001; O'Shaughnessy and Fowler, 2011).

Les cellules de Leydig foetales se différencient entre les cordons séminifères, dans le compartiment interstitiel, et sont en association étroite avec les vaisseaux sanguins. Ce sont les cellules progénitrices présentes dans ce milieu interstitiel qui prolifèrent durant toute la vie embryonnaire pour donner des cellules de Leydig foetales (Orth, 1982). Elles apparaissent après les cellules de Sertoli, entre 12.5 et 13.5 jpc chez la souris et autour de la 8^{ème} semaine de gestation chez l'homme (Rabinovici and Jaffe, 1990; O'Shaughnessy *et al.*, 2006; Ostrer *et al.*, 2007). Durant la vie embryonnaire, les cellules de Leydig possèdent toutes les enzymes nécessaires à la production de testostérone à l'exception de la 17 β -hydroxylase déshydrogénase type 3 (HSD17B3). Cette dernière est essentielle pour la réaction finale de production de la testostérone. L'androgène produit par les cellules de Leydig foetales est donc principalement

l'androstenedione. Uniquement durant la période foétale, les cellules de Sertoli, qui synthétisent la HSD17B3, sont primordiales car elles vont utiliser l'androstenedione issue des cellules de Leydig pour la convertir en testostérone (à partir de 13,5 jpc chez la souris) (Baker *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 2013). Les androgènes produits permettent la masculinisation du fœtus en initiant la formation des organes génitaux externes (scrotum et pénis), le développement des canaux de Wolff (pour former l'épididyme, les canaux déférents, les vésicules séminales et le canal éjaculateur) et la masculinisation du cerveau. Les cellules de Leydig foetales produisent également le facteur INSL3 (Insulin Like-3) qui est essentiel pour la descente testiculaire.

Chez la souris, les cellules de Leydig foetales sont remplacées à la puberté par les cellules de Leydig adultes. Entre population de cellules de Leydig foetales et cellules de Leydig adultes, une période de transition fait apparaître des cellules précurseurs de Leydig adultes (Shima *et al.*, 2015). Les cellules de Leydig adultes se différencient dans le compartiment interstitiel après la naissance à partir de progéniteurs foetaux restés quiescents. Les cellules de Leydig adultes expriment la HSD17B3 et sont alors capables de synthétiser, à partir du cholestérol, la testostérone. La signalisation LH (Luteinizing Hormone) agit sur la maturation des cellules de Leydig adultes pour assurer les fonctions de production des androgènes chez les mâles.

B. Cellules myoïdes périvitubulaires

À l'extérieur de la membrane basale du tubule séminifère, se trouvent plusieurs couches de cellules myofibroblastiques modifiées appelées cellules myoïdes périvitubulaires (CMP). Ces cellules sont visibles dès 13,5 jpc chez la souris, soit peu de temps après la formation des cordons séminifères (Jeanes *et al.*, 2005). L'origine de ces cellules reste incertaine. Néanmoins, il a été démontré qu'elles ne sont pas issues du mésonéphros (Combes *et al.*, 2009; Cool *et al.*, 2008). La différenciation des cellules périvitubulaires est contrôlée par DHH (*Desert Hedgehog Signaling Molecule*), produit par les cellules de Sertoli, qui agit via son récepteur PTCH1 (Patched 1) à la surface des

cellules péritubulaires. L'absence du gène *Dhh* chez les souris provoque une absence des cellules péritubulaires ce qui suggère que le signal DHH des cellules de Sertoli induit la différenciation des cellules péritubulaires (Clark *et al.*, 2000).

Les CMP jouent plusieurs rôles : (i) elles produisent des facteurs essentiels pour la formation de la matrice extracellulaire, appel e la lamina propria, en collaboration avec les cellules de Sertoli (Skinner and Fritz, 1985). Cette matrice extracellulaire est indispensable pour la structure et l'intégrité des cordons séminifères. (ii) Les cellules myoïdes participent à isoler les tubes séminifères du milieu interstitiel. (iii) Enfin, elles permettent la contraction des tubes séminifères requis pour l'excrétion des spermatozoïdes à l'âge adulte.

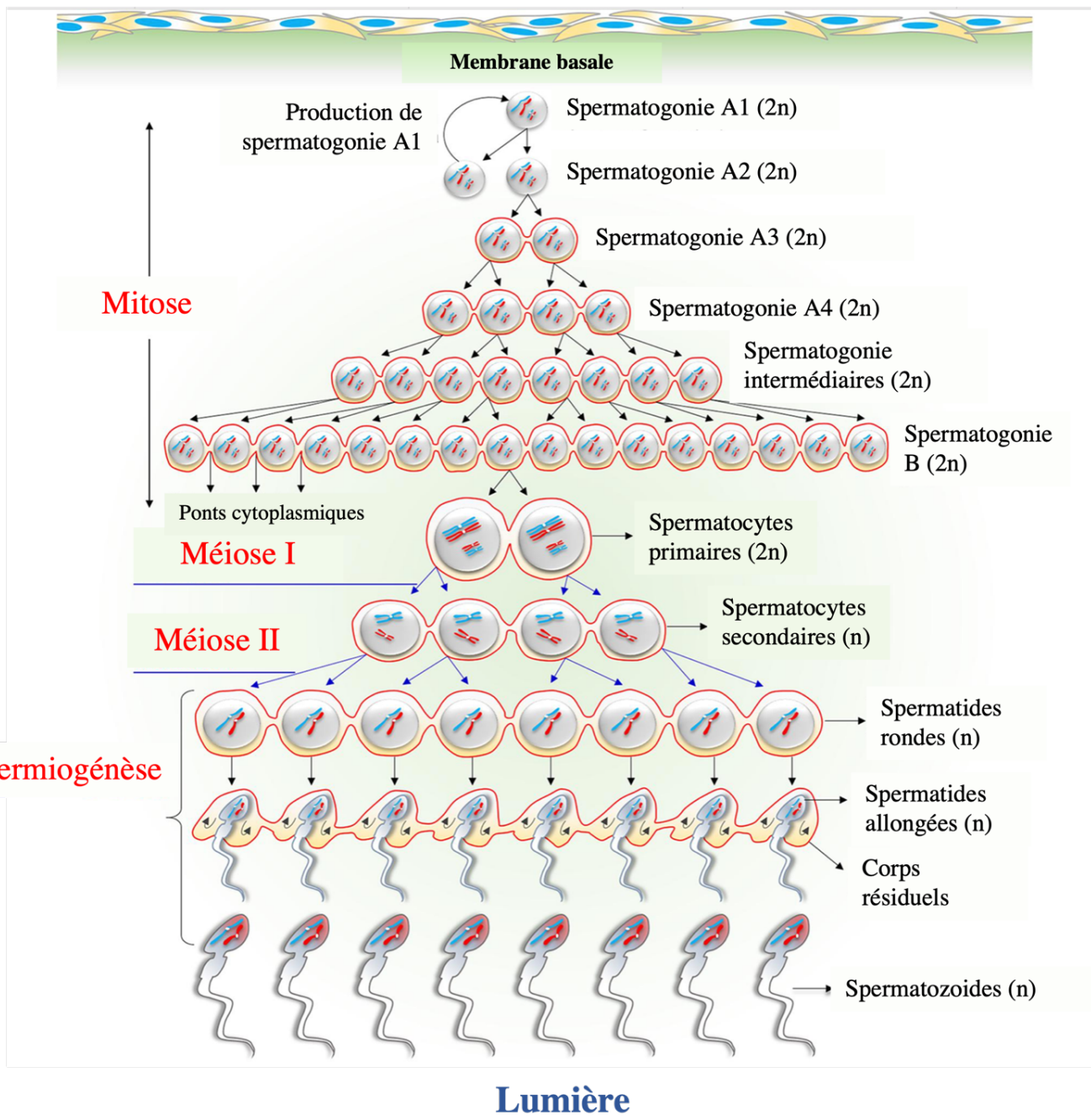


Figure 11 : Description générale du processus de la spermatogénèse.
 (Adaptée de Rahman and Pang, 2020)

Chapitre II : La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus biologique sophistiqué permettant la formation des gamètes mâles matures haploïdes, les spermatozoïdes, à partir des cellules souches : les spermatogonies. Ce processus comprend le renouvellement et la différenciation des cellules souches, la réorganisation et la demi-réduction du génome, ainsi que le reconditionnement du génome et la transformation cellulaire. Les étapes majeures (**figure 11**) sont :

- (1) La **phase de multiplication** : prolifération mitotique et différenciation des spermatogonies en spermatocytes pré-leptotène.
- (2) La **méiose** : divisions méiotiques des spermatocytes produisant des cellules germinales haploïdes, les spermatides.
- (3) La **spermiogénèse** : maturation des spermatides rondes en spermatozoïdes.
- (4) La **spermiation** : libération de spermatozoïdes matures hautement spécialisés dans la lumière des tubes séminifères.

L'ensemble de ce processus nécessite environ 74 jours chez l'homme et 35 jours chez la souris, et sera possible grâce à une série très complexe d'événements moléculaires, nécessitant des interactions appropriées entre les cellules de Sertoli, les cellules germinales, et les cellules tubulaires épithéliales. Ceci sera possible grâce à l'intégrité de la BHT permettant de protéger les cellules germinales du système immunitaire (Wu *et al.*, 2020). Ces étapes se déroulent de façon centripète dans les tubes séminifères avec les cellules les moins différenciées situées à la périphérie des tubes (les cellules germinales en mitose) et les cellules les plus différenciées à la lumière des tubes (**figure 11**). Ainsi, les cellules germinales s'organisent en couches superposées de cellules en différenciation et évoluent de façon régulière et coordonnée entre les différentes générations définissant ainsi les stades de l'épithélium séminifère. Ils se répètent dans le temps et constituent les cycles de l'épithélium séminifère. Le nombre de stades de l'épithélium

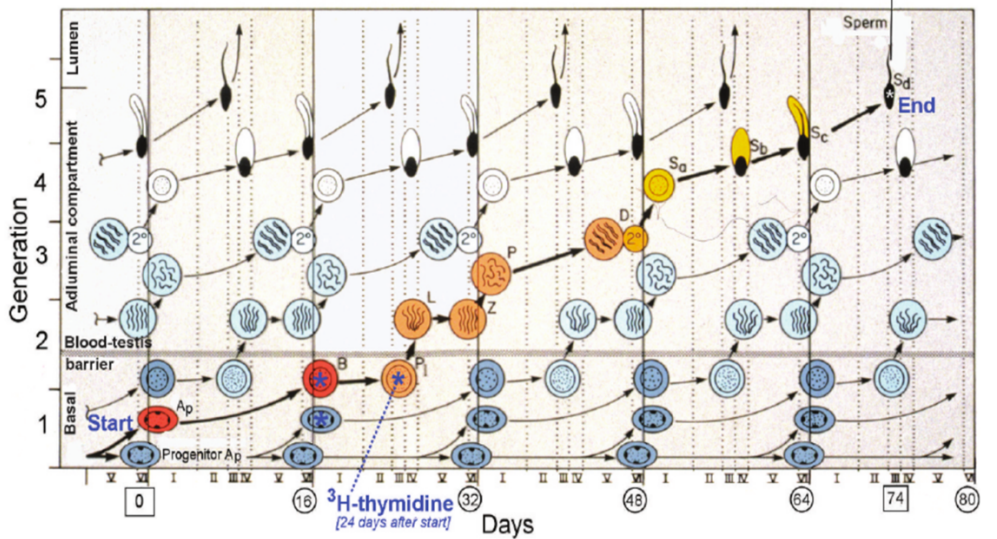


Figure 12 : Stades de l'épithélium séminifère chez l'homme (I-VI).

Représentation des 4,6 cycles de l'épithélium séminifère requis pour qu'une spermatogonie Ap aboutisse à un groupe de spermatozoïdes achevant la spermiation, 74 jours plus tard. L'avancement des cellules a été suivi grâce à l'utilisation de ^3H -thymidine. (Adaptée de Amann, 2008)

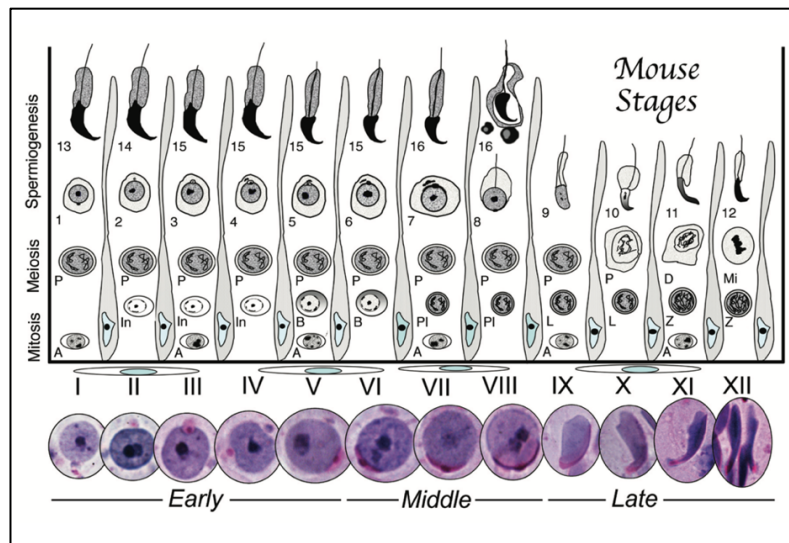


Figure 13 : Stades de l'épithélium séminifère chez la souris (I-XII).

Caractérisation des 12 stades de l'épithélium séminifère chez la souris. La morphologie des spermatides colorés en PAS permet de différencier les stades de l'épithélium séminifère suivant la morphologie cellulaire et la forme de l'acrosome (mis en évidence en couleur rose). Spermatogonies (A, In, B) ; spermatocytes (PI : pré-leptotène, L : leptotène, Z : zygotène, P : pachytène, D : diacinèse, Mi : division méiotique) ; spermatides ronds (1-8); spermatides allongés (9-16). (Adaptée de Meistrich and Hess, 2013)

séminifère est spécifique à chaque espèce : 6 chez l'homme (**figure 12**), 12 chez la souris (**figure 13**), et 14 chez le rat (Clermont, 1972).

I. La phase de multiplication des spermatogonies par mitose

Les spermatogonies sont des cellules germinales mâles qui résident près de la membrane basale de l'épithélium séminifère. On différencie les types A et B sur la base de la morphologie nucléaire.

Les spermatogonies de type A sont largement accolées à la membrane basale, de morphologie aplatie, et présentent une fine chromatine nucléaire de coloration pâle. Elles sont considérées comme le pool de cellules souches spermatogoniales (SSCs), ou spermatogonies indifférenciées.

Les SSCs sont définies par leur double potentiel :

- 1) D'auto-renouveler pour maintenir le pool de cellules souches,
- 2) De se différencier pour maintenir une production continue de spermatozoïdes tout au long de la vie des hommes post-pubères.

En fonction des espèces, différents sous-groupes de différenciation sont observés au sein de ces spermatogonies A. Chez les rongeurs (**figure 14A**), on retrouve 5 stades indifférenciés : As (Asingle), Apr (Apraired), Aal (Aalignés) 4, 8 et 16. Le renouvellement des SSCs est réalisé par une sous-population de spermatogonies isolées (uniques), As, situées sous la membrane basale des tubules séminifères (Huckins, 1971; Oakberg, 1971; de Rooij, 1973). Leur division mitotique produit une paire de spermatogonies Apr qui soit achèvent la cytokinèse et produisent de nouvelles As (division auto-renouvelée), soit resteront reliées par un pont intracytoplasmique (cytokinèse incomplète) et continueront à se diviser pour produire une chaîne de quatre

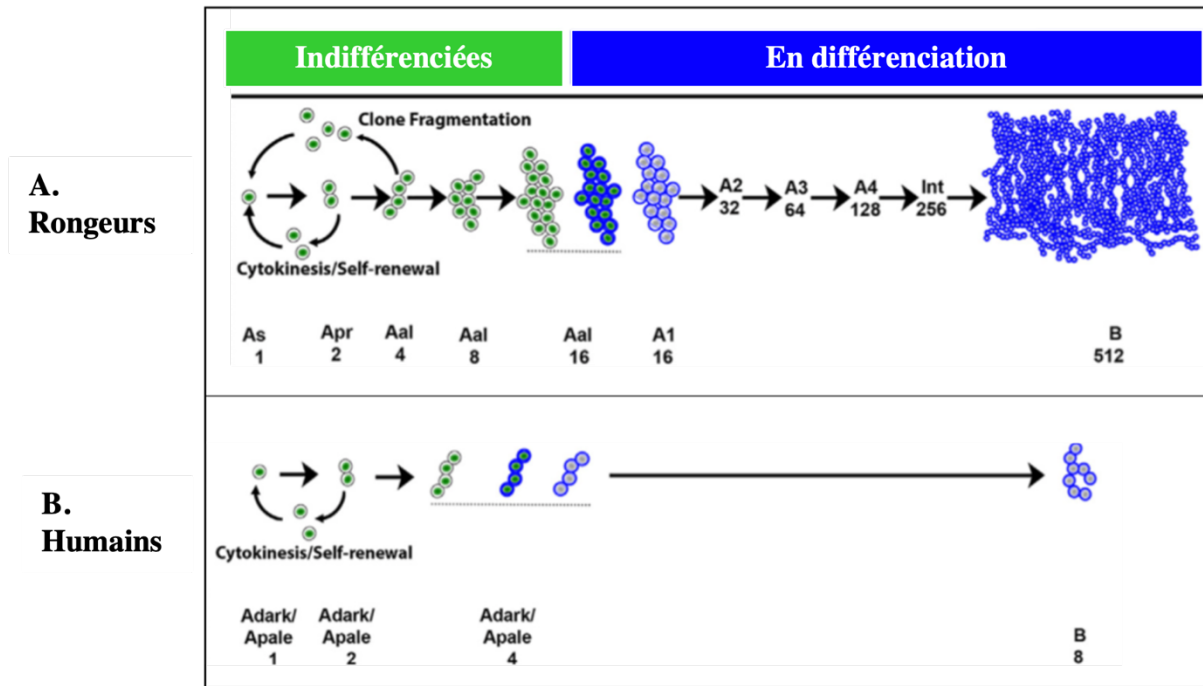


Figure 14 : Expansion clonale et différenciation des spermatogonies.

(A) chez les rongeurs, (B) chez les humains. Les spermatogonies indifférenciées sont nommées As, Apr ou Aal chez les rongeurs et Adark ou Apale chez l'humain. Les spermatogonies différenciées sont nommées A1-A4, Int et B chez les rongeurs et uniquement B chez l'humain. As=Asingle, Apr=Apairé, Aal=Aaligné, Int=Intermédiaire. (Modifié de Fayomi and Orwig, 2018)

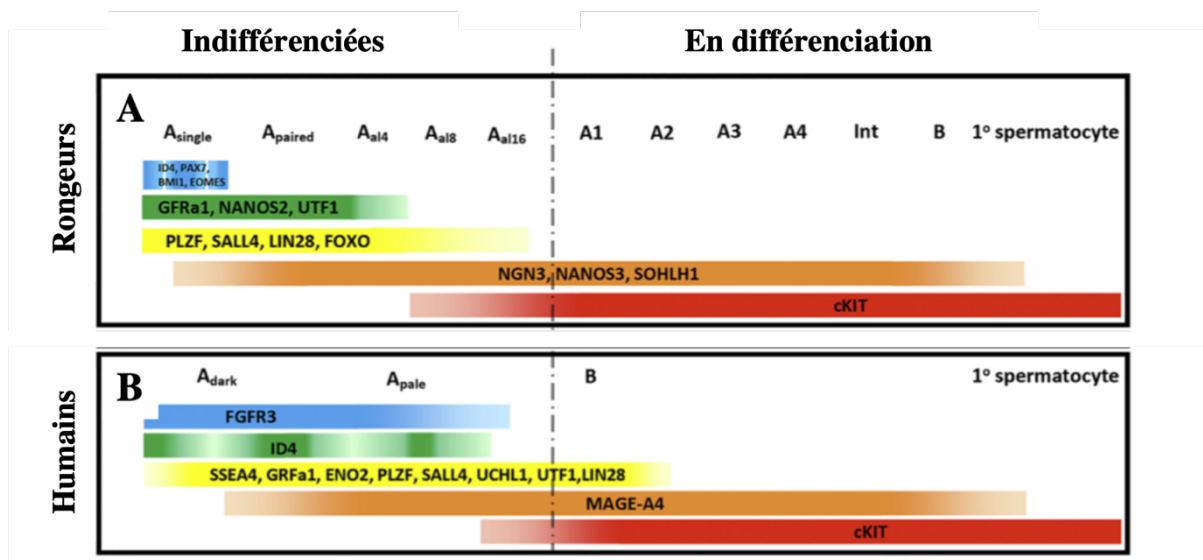


Figure 15 : Marqueurs des spermatogonies indifférenciées et différenciées.

(A) chez les rongeurs, (B) chez les humains. (Modifiée de Fayomi and Orwig, 2018)

spermatogonies alignées A (Aal4) lors de la division suivante (Phillips *et al.*, 2010; de Rooij and Griswold, 2012). Par mitoses successives, les spermatogonies Aal4 vont alors former de plus grandes chaînes de 8 (Aal8), 16 (Aal16) et parfois 32 spermatogonies. L'ensemble des SSCs représente environ 0,3% de cellules germinales dans le testicule de rongeur, dont 10% d'As (soit 0,03 % des cellules germinales ; Fig. 2A) (Phillips *et al.*, 2010; Huckins, 1971; Oakberg, 1971). Enfin, les spermatogonies Aal16 ou 32 se différencient en spermatogonies A1.

Chez les rongeurs, suite à plusieurs divisions mitotiques des spermatogonies A1, ces cellules remplissent des segments entiers de tubule séminifère et produisent les spermatogonies A2, A3, A4, puis dit intermédiaires et enfin, les B. Ces spermatogonies B se divisent une dernière fois par mitose pour produire des spermatocytes primaires pré-leptotènes (qui initieront la méiose, voir ultérieurement à la partie II du chapitre II). À ce dernier stade, il faudra la mise en place d'un contact étroit avec les cellules de Sertoli et l'intégrité de la BHT afin que la méiose puisse débiter et que les cellules rentrent dans le compartiment ad-luminal (Wu *et al.*, 2020).

Après la naissance, certains facteurs jouent un rôle important dans l'auto-renouvellement des spermatogonies A indifférenciées. C'est le cas du facteur GDNF (Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor) produit par les cellules de Sertoli et de ses récepteurs présents à la surface des spermatogonies A (Chen and Liu, 2015). De plus, les spermatogonies indifférenciées Apr et Aal sont caractérisées par l'expression de gènes associés à l'auto-renouvellement et à la prolifération (par exemple, *Bmi1*, *Nanos2*, *Plzf*, *Id4*, *Eomes*, *Foxo1*, *Lin28*, *Pax7*, *Sall4* et autres) (Chen and Liu, 2015). À l'inverse, les spermatogonies A1-4 à B, appartenant au groupe des spermatogonies différenciées, sont caractérisées par une régulation négative des gènes d'auto-renouvellement et une régulation positive de ceux associés à la différenciation (e.g., *Sohlh1*, *Sohlh2*, *Dnmt1*, *c-kit*, etc.) (**figure 15**) (revue Fayomi and Orwig, 2018).

Dans les testicules de primates non humains ou humains, on ne retrouve que deux types morphologiquement distincts de spermatogonies indifférenciées, identifiées

comme A_{dark} et $A_{\text{p\^ale}}$ (**figure 14B**), sur la base des diff\u00e9rences de morphologie nucl\u00e9aire et d'intensit\u00e9 de coloration avec l'h\u00e9matoxyline (Clermont and Leblond, 1959; Clermont and Antar, 1973; Clermont, 1966). Les spermatogonies A_{dark} sont des cellules relativement petites, sph\u00e9riques ou l\u00e9g\u00e8rement ovo\u00efdes sur la membrane basale des tubes s\u00e9minif\u00e8res et pr\u00e9sentant une chromatine sombre et dense dans des noyaux uniform\u00e9ment color\u00e9s. Les spermatogonies $A_{\text{p\^ale}}$ sont identifi\u00e9es comme des cellules relativement plus grandes, ovales ou presque rondes sur la membrane basale des tubes s\u00e9minif\u00e8res et montrent des noyaux p\u00e2les et allong\u00e9s avec une chromatine plus grossi\u00e8re ou granulaire.

Sur la base d'un marquage *in vivo* avec de la 3H-thymidine, il a \u00e9t\u00e9 montr\u00e9 (Clermont, 1969) que seules les $A_{\text{p\^ale}}$ incorporaient de la 3H-thymidine chez les singes Vervet (*Cercopithecusaethiops*) sugg\u00e9rant des cellules souches "actives" qui maintiennent la spermatog\u00e8se dans le testicule adulte. Les auteurs ont conclu que les A_{dark} sont des cellules souches de "r\u00e9serve" en cas d'agression nocive de la spermatog\u00e8se (par exemple, une chimioth\u00e9rapie ou th\u00e9rapie par rayonnement). Ceci a \u00e9t\u00e9 d\u00e9montr\u00e9 ult\u00e9rieurement, par la r\u00e9g\u00e9n\u00e9ration de la spermatog\u00e8se, apr\u00e8s une irradiation aux rayons X ayant caus\u00e9 un \u00e9puisement de la spermatog\u00e8se (Clifton and Bremner, 1983; Oakberg, 1974; van Alphen *et al.*, 1988). Le faible indice mitotique et la capacit\u00e9 de r\u00e9g\u00e9n\u00e9ration des spermatogonies A_{dark} sont compatibles avec les caract\u00e9ristiques d'une "vraie cellule souche", la prolif\u00e9ration r\u00e9guli\u00e8re d' $A_{\text{p\^ale}}$ est indicative du "renouvellement des prog\u00e9niteurs" (Ehmcke and Schlatt, 2006).

La comparaison de l'expression de certains marqueurs mol\u00e9culaires des spermatogonies a montr\u00e9 que les spermatogonies A_{dark} et certaines $A_{\text{p\^ale}}$ des primates (non humains et humains), pr\u00e9sentent un ph\u00e9notype indiff\u00e9renci\u00e9 similaire aux spermatogones A_s , A_{pr} et certaines A_{al} des rongeurs ($GFRa1+/PLZF+/SALL4+/cKIT-$). Certains $A_{\text{p\^ale}}$ ont un ph\u00e9notype de transition similaire \u00e0 celui des spermatogonies A_{al} \u00e0 grande cha\u00eene (par exemple, $GFRa1+/SOHLH1+/NGN3+/cKIT+$) (Hermann *et al.*, 2009; Ramaswamy *et al.*, 2014). Les marqueurs de spermatogonies indiff\u00e9renci\u00e9es qui sont conserv\u00e9s des rongeurs aux primates comprennent $GFRa1$ (*GDNF Family*

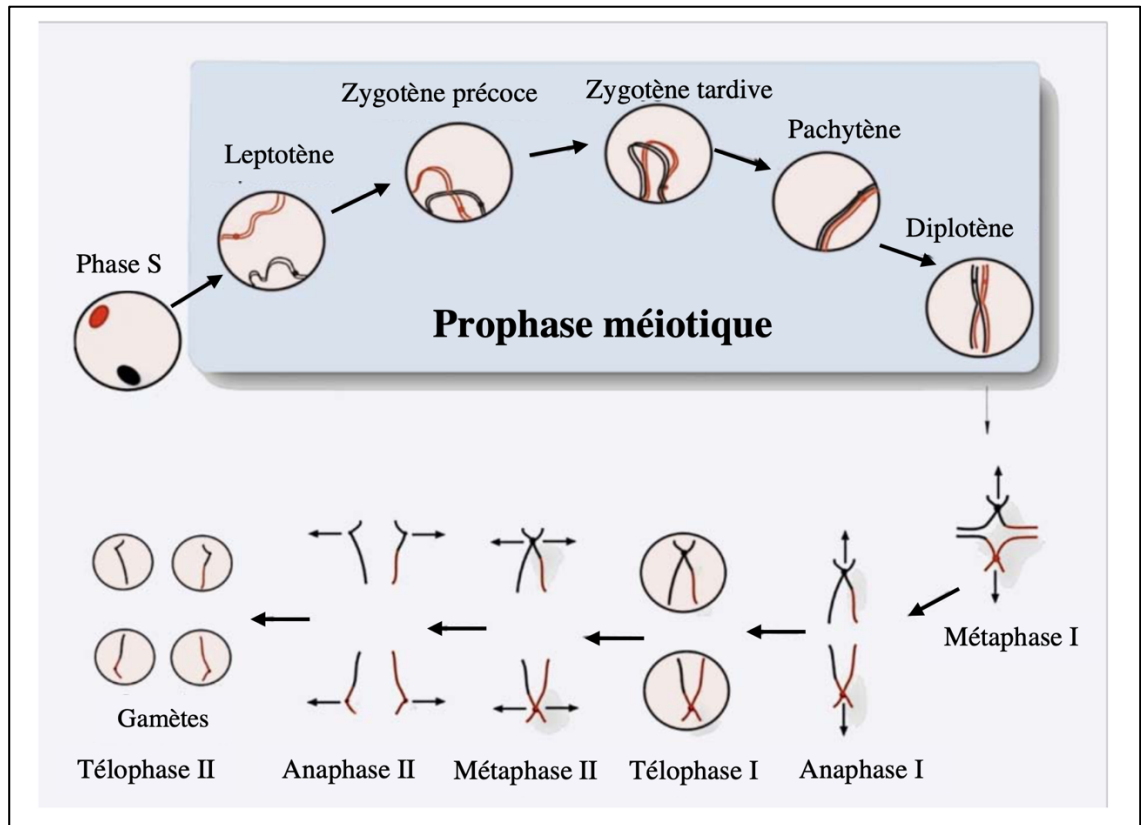


Figure 16 : Progression de la méiose des cellules germinales.

La méiose génère des gamètes haploïdes (n) à partir d'une cellule diploïde suite à deux cycles consécutifs de ségrégation des chromosomes/chromatides. La première division méiotique marquée principalement par la prophase I, correspondant à 90% environ de la durée de la méiose. Elle est divisée en cinq étapes consécutives : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Elle est marquée par la recombinaison chromosomique. Au cours de la métaphase I et de l'anaphase I, la ségrégation des chromosomes homologues aura lieu dans les pôles opposés. Peu de temps après, la deuxième division méiotique sépare les chromatides sœurs afin de former des cellules haploïdes.

(Modifiée de Roig 2005)

Receptor Alpha 1), *UTF1* (*Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1*), *PLZF* (*Promyelocytic leukemia zinc finger*), *SALL4* (*Spalt Like Transcription Factor 4*) et *LIN28* (Ramaswamy *et al.*, 2014; Hermann *et al.*, 2009; van Bragt *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2000; Costoya *et al.*, 2004; Buaas *et al.*, 2004; Eildermann *et al.*, 2012; Gassei and Orwig, 2013; Zheng *et al.*, 2009; Aeckerle *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015; Di Persio *et al.*, 2017; Sachs *et al.*, 2014). Le facteur *c-KIT* semble être un marqueur conservé des spermatogonies différenciées, marquant la transition vers les spermatogonies A1 chez les rongeurs ou les spermatogonies B1 chez les primates non humains et les spermatogonies B chez les humains.

II. La méiose des cellules germinales mâles

La méiose est un processus de division cellulaire unique et spécialisé, fondamental à la production de gamètes et à la reproduction sexuée animale ou végétale. La méiose permet la production de gamètes haploïdes au moyen de deux cycles de ségrégation chromosomique : la division réductionnelle et la division équationnelle (**figure 16**). Si la 2^{ème} division rappelle une division mitotique, avec la séparation des chromatides sœurs, la première division méiotique va diviser fidèlement le génome de moitié par ségrégation des chromosomes homologues. Cette division, et en particulier la prophase I, implique des cascades d'évènements complexes qui sont hautement conservés chez les organismes à reproduction sexuée. Ce processus implique la mise en place d'interactions protéine-protéine (synapsis) et ADN-ADN (recombinaison méiotique conduisant à la formation de croisement).

Comme pour la mitose, chacune des deux divisions méiotiques est divisée en quatre étapes : prophase, métaphase, anaphase et télophase. La méiose des cellules germinales mâles dure environ 14 jours chez la souris, et 23 jours chez l'homme.

Chez les mâles, la méiose aboutit à la création de quatre spermatides haploïdes à partir d'un spermatocyte 4N. Ces cellules initient la méiose de manière séquentielle le long

du tube séminifère, entraînant un phénomène connu sous le nom d'onde spermatogénique, et est à l'origine d'une production continue de spermatozoïdes tout au long de la vie post-pubertaire de l'individu.

Le processus méiotique a été étudié dans un certain nombre d'organismes, chacun fournissant un aperçu de ces mécanismes hautement conservés, tout en possédant des caractéristiques uniques qui aident à façonner notre compréhension :

- Les organismes unicellulaires simples, tels que la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, permettent l'examen de cultures à grande échelle et synchrones [>70%] ainsi qu'une analyse temporelle/étape spécifique aux échelles génomiques et biochimiques. Ces organismes, facilement modifiables génétiquement, permettent l'analyse de produits méiotiques par dissection de spores et viabilité. De plus, les variations génétiques entre les souches permettent de comparer les séquences d'ADN entre chaque génération et d'identifier les recombinaisons génétiques.

- Le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), avec ses propriétés uniques et son organisation spatiale des cellules méiotiques, permet la visualisation de différents stades de la méiose au sein du même organisme. De plus, de vastes banques de mutants permettent une analyse génétique de la méiose chez cette espèce. De plus, *C. elegans* existe en tant qu'hermaphrodites (ainsi que mâles), permettant de comprendre l'impact des mutations méiotiques à la fois sur la spermatogenèse et l'ovogenèse au sein d'un même organisme.

- Les mammifères, essentiellement la souris *Mus musculus* et toutes les lignées mutantes qui en découlent, offrent un niveau de complexité supplémentaire, avec l'impact du contrôle endocrinien nécessaire pour coordonner le programme méiotique avec la réceptivité sexuelle. Chez les mammifères, la méiose est globalement assez similaire entre les sexes alors que d'autres espèces, comme *Drosophila melanogaster*, les méioses mâle et femelle sont très différentes.

A. Première division méiotique

Cette première division méiotique, étape fondamentale de la spermatogenèse, est précédée par la duplication du matériel génétique des cellules germinales diploïdes. Ces cellules "répliquées", ou spermatocytes primaires 4N, vont alors subir la première division méiotique, dite réductionnelle, pour aboutir à la formation de deux spermatocytes secondaires contenant 2N chromosomes à deux chromatides sœurs.

1. Prophase I méiotique

La prophase de première division méiotique (appelée prophase I) est l'étape la plus longue de la méiose, représentant 90% de la durée de celle-ci. Elle est subdivisée en cinq phases successives (**figure 16**) : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. L'événement principal de la prophase I est la recombinaison méiotique. C'est un mécanisme utilisé par la majorité des eucaryotes pour permettre une ségrégation précise des chromosomes homologues et permettre un brassage génétique. Elle est marquée par les cassures double-brins de l'ADN (CDBs), réparties sur tout le génome. La réparation de ces CDBs fait suite à l'appariement entre eux des 2 chromosomes homologues, permettant ainsi d'avoir un « modèle » de réparation. Ce processus de réparation s'accompagne d'un échange réciproque de matériel génétique ou brassage génétique

L'ensemble de ces mécanismes s'accompagne de modifications morphologiques des chromosomes, à l'origine de la description des différentes étapes de la prophase I :

- Stade pré-leptotène : les chromosomes débutent un cycle de compaction.
- Stade leptotène du grec « leptos » (mince en français), est caractérisé par une individualisation nette des chromosomes, apparaissant minces et filiformes et par une augmentation du volume nucléaire. Ce stade est caractérisé par : (1) l'induction des CDBs, et (2) le début de la formation du complexe synaptonémal (ensemble de protéines permettant l'appariement des chromosomes homologues). Durant ce stade, les extrémités des chromosomes vont se fixer à la membrane nucléaire (détaillé plus

tard), mécanisme indispensable à un bon appariement ultérieur des chromosomes homologues.

- Stade zygotène du grec « zygos » (paire en français), stade où les chromosomes sont de plus en plus condensés, et apparition de l'élément central du complexe synaptonémal.

- Stade pachytène de grec « pakhus » (épais en français), les chromosomes homologues sont très condensés et complètement appariés entre eux, formant ainsi une "synapsis" ou bivalent. Au niveau des CDBs apparaissent les crossing-overs (CO) entre les chromosomes homologues.

- Stade diplotène du grec « diploos » (double en français). Les chromosomes homologues se séparent mais restent solidaires au niveau des chiasmas (résultant des crossing-overs). Il y a un début de relâchement de la chromatine et une perte progressive des composants du complexe synaptonémal.

- Stade diacinèse du grec, « kinesis » (mouvement en français) : ce stade est caractérisé par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, les bivalents continuent à se raccourcir et à se compacter jusqu'à la métaphase I, pour qu'ils soient presque aussi courts que leurs homologues de la métaphase mitotique.

Nous allons revenir en détail sur les différentes étapes de la prophase I.

a. Initiation de la recombinaison via induction des cassures double-brins

L'événement initiateur de la recombinaison méiotique est la formation des CDBs programmées. Elles se produisent **au stade précoce du leptotène**, et est un prérequis à un appariement complet des chromosomes homologues ou synapsis. L'emplacement et le nombre de CDBs sont contrôlés par des facteurs détaillés ci-dessous.

i. La mécanique de la formation des cassures double-brins

Une grande partie de nos connaissances biochimiques sur la formation et la réparation des CDBs proviennent d'organismes facilement modifiables génétiquement pour observer ou analyser les intermédiaires de réparation. Des études sur d'autres organismes, tels que la souris, ont permis de confirmer les voies de formation et de réparation des CDBs tout en identifiant des différences critiques entre les espèces et/ou entre les sexes.

La protéine essentielle pour la formation des CDBs est SPO11 (*SPO11 Initiator Of Meiotic Double Stranded Breaks*).

Chez *S. cerevisiae*, SPO11 a été identifié comme le facteur responsable de la création des CDBs (Keeney *et al.*, 1997). Des protéines homologues ont depuis été découvertes chez les plantes (SPO11-1,2,3), les vers (SPO-11), les mouches (mei-w68), les souris (SPO11 α et SPO11 β), et chez l'homme (SPO11 ou TOPOVIA) (Szostak *et al.*, 1983; Keeney *et al.*, 1997; McKim and Hayashi-Hagihara, 1998; Dernburg *et al.*, 1998; Hartung and Puchta, 2000). SPO11 est un homologue de TopoVIA, la sous-unité catalytique A de la topoisomérase TOPOVI des archaebactéries (ou Topo6). La formation des CDBs est obtenu par clivage endonucléolytique du brin lié par SPO11 (lié de manière covalente aux extrémités 5' des cassures méiotiques de l'ADN). Chez les mammifères, deux monomères SPO11 sont donc nécessaires pour induire un seul CDB, chaque protéine brisant un brin d'ADN (Keeney *et al.*, 1997). Chez la levure, SPO11 clive l'ADN mais reste liée aux extrémités 5' de l'ADN.

Chez la souris, les deux isoformes (α et β) de SPO11 sont capables de générer des CDBs (bien que la majorité des CDBs soit induite par SPO11 β) et sont exprimées pendant toute la prophase I. La formation des CDBs est issu de l'action conjointe de SPO11 et d'une topoisomérase, TOPOVIBL (nommé aussi C11ORF80, pour *Chromosome 11 Open Reading Frame 80*) (Robert *et al.*, 2016; Vrielynck *et al.*, 2016), agissant ensemble sous forme d'hétérotétramère.

Spo11 est essentiel à la fertilité mâle et femelle, et donc au bon déroulement de la spermatogenèse et l'ovogenèse. L'inactivation de *Spo11* chez la souris entraîne une stérilité des animaux avec un blocage méiotique au stade zygotène. Les mâles mutants présentent une dégénérescence des spermatocytes *Spo11*^{-/-} et une absence de formation de CDBs et du complexe synaptonémal (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000).

De plus, l'action de SPO11 nécessite des partenaires protéiques supplémentaires pour former les cassures double-brins. La plupart d'entre eux ont initialement été découverts chez la levure (*Mei4* (*Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 4*) et *Rec114* (*RECombinaison 114*)) (Menees *et al.*, 1992; Keeney, 2001). Chez la souris, la protéine HORMAD1 (*HORMA Domain Containing 1*) et sa protéine associée IHO1 (*Interactor Of HORMAD1 1*, ou *CCDC36*) jouent un rôle essentiel dans la formation des CDBs en recrutant les facteurs accessoires de SPO11 tels que REC114 et MEI4 (Stanzione *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018). MEI4 forme un complexe avec REC114 et IHO1 qui catalyse la réparation des CDBs sur l'axe des chromosomes méiotiques des spermatocytes de souris (Stanzione *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). Les souris *Mei4*^{-/-} ou *Rec114*^{-/-} présentent un phénotype similaire à celui des souris *Spo11*^{-/-} : absence de CDBs, défaut d'appariement des chromosomes homologues et absence des protéines nécessaires à la réparation des cassures (Kumar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018).

Une autre protéine, chez la souris, joue un rôle dans la génération de CDBs: MEI1 (*Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1*) (Libby *et al.*, 2003). Bien que la fonction biochimique de MEI1 reste mal définie, l'analyse fonctionnelle de souris mutants de *Mei1* montre son rôle essentiel dans la génération de CDBs. Les ovocytes et les spermatocytes *Mei1*^{-/-} n'ont pas de CDBs, phénotype similaire à celui des spermatocytes *Spo11*^{-/-}.

Au niveau des CDBs se forment des nodules spécifiques de la méiose. Au stade leptotène, on parle de nodules méiotiques précoces (early nodules). Ces nodules,

composés de différentes protéines, évoluent au cours de la prophase I en composition et en nombre (intermediate nodules en zygotène, late nodules en pachytène) pour aboutir dans certains cas à des crossing-overs entre les chromosomes homologues. Chez les mammifères, après la formation des CDBs, l'activité de la protéine SPO11, localisée au niveau de ces CBDs, est restreinte, pour limiter le nombre de cassures. Cette régulation est possible grâce à l'action d'un complexe multiprotéique MRN (composé de MRE11, RAD50 et NBS1), accompagné de l'activation de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). ATM se localise au niveau des CBDs et phosphoryle H2AX (variant de l'histone H2A) sur l'acide aminé Ser139. H2AX phosphorylée, nommée alors γ H2AX, signale ainsi les CBDs jusqu'à leur réparation ultérieure (Rogakou *et al.*, 1998 ; Mahadevaiah *et al.*, 2001; Barchi *et al.*, 2005; Bellani *et al.*, 2005). γ H2AX disparaît progressivement lors de l'appariement des chromosomes homologues. Puis une seconde vague de phosphorylation de H2AX est observée sur toute la chromatine des gonosomes (détaillé plus tard).

ii. Synchronisation, placement et modulation des cassures double brins

L'analyse des événements de recombinaison, dans divers organismes modèles, a révélé que les CBDs ne se produisent pas uniformément et ne sont pas distribués de manière aléatoire dans le génome (Baudat and Nicolas, 1997; Gerton *et al.*, 2000; Cromie *et al.*, 2007). Certaines régions semblent être beaucoup plus favorables à leur formation, et sont appelées points chauds ou "hot-spots". Ce seraient plutôt des régions intergéniques et/ou promotrices où les nucléosomes sont moins présents (Petes, 2001).

Une cartographie précise des hot-spots de CBDs a été établie (Buhler *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2011) chez la souris et montre que la localisation des points chauds de recombinaison diffère entre les souches et les sexes (Baudat and Massy, 2007). Dans différents organismes, y compris la souris et l'homme, les hot-spots sont en partie localisés dans des régions enrichies en triméthylation de la lysine 4 ou 36 de l'histone

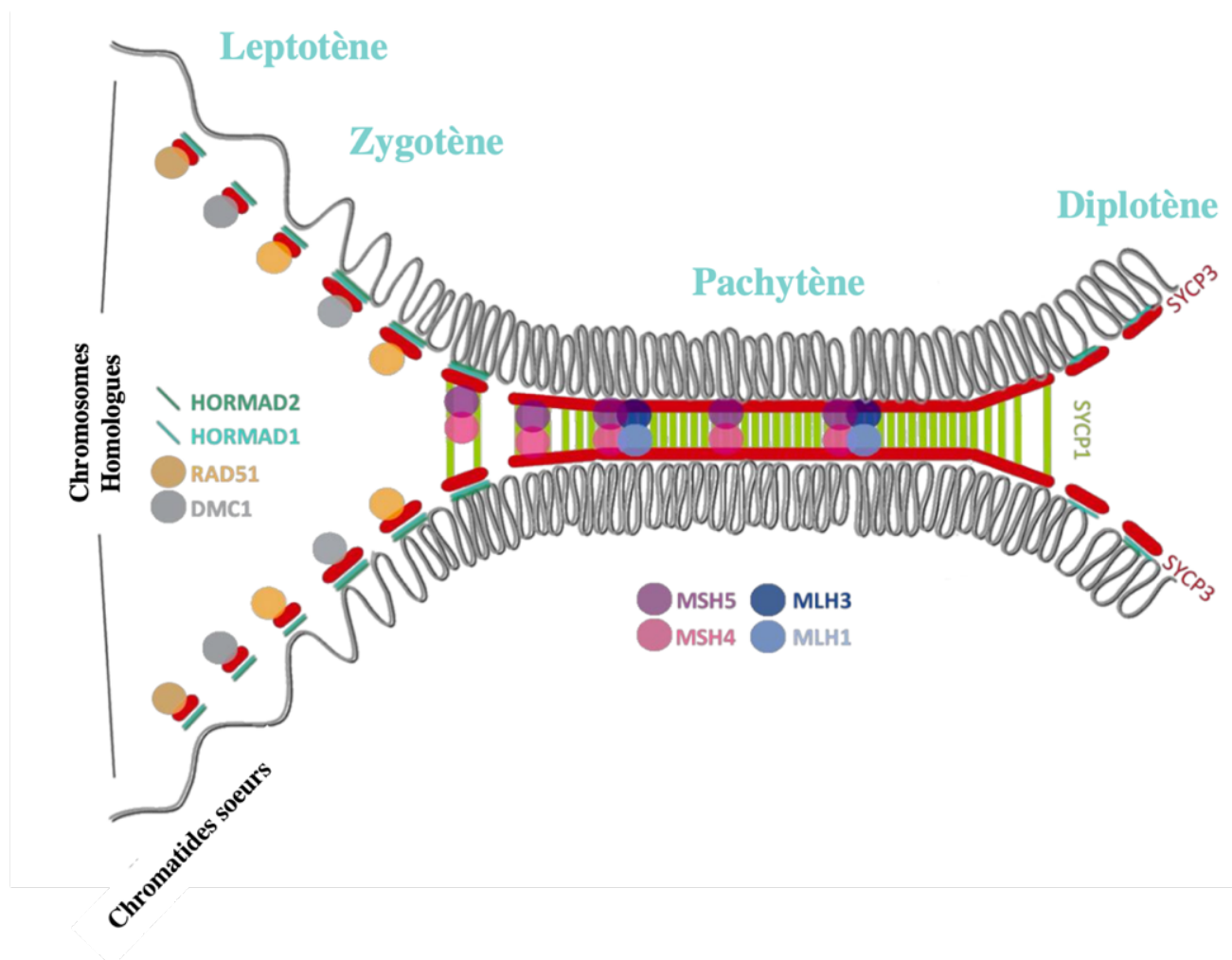


Figure 17 : Structure et organisation du complexe synaptonémal (SC) pendant la prophase I.

Au début de la prophase I, les chromatides sœurs s'organisent en boucles qui s'ancrent dans les axes chromosomiques qui formeront l'échafaudage SC. Le SC est une structure en forme de fermeture éclair formée par les éléments latéraux (SYCP3 et SYCP2, en rouge) et l'élément central (SYCP1, en vert clair). Au stade de leptotène, les protéines SYCP3 et SYCP2 commencent à se localiser le long des axes chromosomiques (éléments axiaux). Dans le même temps, des protéines de réparation comme DMC1 (gris) et RAD51 (orange) sont recrutées sur les sites des CDBs. Au zygotène, lorsque les chromosomes homologues commencent à s'apparier, SYCP1 et d'autres protéines sont recrutées entre les éléments latéraux pour former les filaments transversaux (élément central). Au fur et à mesure que la réparation CDB progresse, les protéines MSH4 et MSH5 (respectivement rose et violet) de réparation des mésappariements se localisent sur les intermédiaires de recombinaison. Au stade pachytène, la synapsis est terminée et les protéines MLH1 et MLH3 (respectivement bleu clair et bleu foncé) marquent les sites de croisement. Enfin, les chromosomes homologues commencent à se séparer au niveau du diplotène maintenu ensemble par les sites CO.

(Modifiée de Cohen and Holloway, 2010)

H3 (H3K4me3, H3K36me3) (Borde *et al.*, 2009; Powers *et al.*, 2016; Diagouraga *et al.*, 2018). De plus, la méthyltransférase PRDM9 (*PR domain coding protein 9*) se localise au niveau de ces points chauds (Baudat *et al.*, 2010; Parvanov *et al.*, 2010). PRDM9, lie l'ADN grâce à son domaine en doigt de zinc et favorise l'enrichissement en H3K4me3 et H3K36me3 (Diagouraga *et al.*, 2018). Ceci permettrait une ouverture de la chromatine et rend accessible le génome pour la formation puis la réparation des CDBs. L'inactivation de *Prdm9* chez la souris entraîne une infertilité, une formation aléatoire des CDBs, une absence de réparation des CDBs et un arrêt méiotique au stade pachytène de la méiose I (Brick *et al.*, 2012). De nombreuses inconnues persistent car, *in fine*, les CDBs se forment même en l'absence de *Prdm9*. Ceci suggère que PRDM9 ne serait pas le seul déterminant du recrutement des complexes comportant SPO11. Ceci est renforcé par (1) l'observation de régions promotrices enrichies en signaux H3K4me3 n'affichant pas des taux de CDBs élevés (Smagulova *et al.*, 2011) et (2) l'induction des CDBs dans la région pseudoautosomique (PAR) n'est pas dépendante de PRDM9 chez la souris (Brick *et al.*, 2012).

Au total, les connaissances actuelles permettent de suggérer que, chez la souris, *Prdm9* et/ou ses sites de liaison pourraient combiner deux propriétés : le recrutement de *Spo11* au niveau des hotspots pour générer les CDBs, et le dépôt d'une marque chromatiniennne.

b. Formation du complexe synaptonémal et appariement des homologues (synapsis)

Après une reconnaissance et un appariement initial (alignement), les chromosomes homologues vont s'apparier par l'intermédiaire d'un complexe protéique dans un processus appelé la « synapsis » (synapse). Ce processus est un événement séquentiel qui culmine par l'achèvement d'une structure tripartite (**figure 17**) connue sous le nom de complexe synaptonémal (CS), maintenant les chromosomes homologues à moins de 100 nm les uns des autres (Page and Hawley, 2004). Identifié pour la première fois

indépendamment par Fawcett et Moses en 1956 (Fawcett, 1956; Moses, 1956), les différents états physiques du CS permettent de définir les sous-stades de la prophase I (**figure 17**).

L'assemblage du CS débute au stade leptotène avec l'apparition de l'élément axial (AE) le long des chromosomes homologues. Les AE servent de sites d'amarrage pour de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle et la recombinaison, et les AE interagissent également avec les anneaux de cohésines pour faciliter la cohésion des chromatides sœurs et les interactions des chromosomes homologues.

Au cours du stade zygotène, les deux AE s'assemblent par polymérisation (sorte de "fermeture éclair") pour former un élément central (CE), permettant de rapprocher les chromosomes homologues étroitement (à ~400 nm). Ainsi, le CS se forme et permet l'appariement des chromosomes homologues progressivement sur toute leur longueur.

Au stade pachytène, les chromosomes homologues sont complètement appariés, le CS est formé, et les crossing-overs apparaissent.

Au diplotène le CS commence à se désassembler, les chiasmas deviennent visibles. La diacinèse est l'étape finale de la prophase I, lorsque la majorité du CS est dissociée et que les chromosomes sont maintenus ensemble uniquement par leurs chiasmas, la manifestation physique de l'enjambement chromosomique.

Dans la plupart des cas, la formation du CS dépend de l'initiation de la recombinaison qui est, à son tour, essentielle pour le traitement des événements de cette même recombinaison et donc pour la progression de la prophase I.

Bien que l'organisation structurale de CS soit conservée de la levure à l'homme, les protéines constitutives varient d'un organisme à l'autre. Afin de simplifier, il ne sera détaillé dans ce paragraphe que les protéines identifiées chez la souris et l'Homme.

Chez la souris, au stade leptotène, deux protéines spécifiques de la méiose sont localisées au niveau des AE : SYCP2 et SYCP3 (*SYnaptosomal Complex Protein 2 et 3*) (Zickler *et al.*, 1998; Page *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2006). Elles forment des filaments le

long des chromosomes non appariés (Page and Hawley, 2004). Le CS en cours de formation est aussi composé d'une protéine spécifique de la méiose : SYCP1 (*Synaptonemal Complex Protein1*), localisée au niveau de CE (de Vries *et al.*, 2005). SYCP1 apparaît d'abord dans les régions sub-téломériques au cours du stade zygotène, puis se propage vers les centromères. SYCP1 est indispensable au recrutement des protéines de CE et donc à l'appariement des chromosomes. En effet, la suppression de SYCP1 murine induit une stérilité mâle et femelle causée par l'absence de formation du CS et l'entrée en apoptose des cellules germinales au stade pachytène (de Vries *et al.*, 2005). La formation d'AE n'est pas inhibée dans les cellules méiotiques de souris *Sycp1*^{-/-}, mais les chromosomes homologues sont incapables de s'apparier.

SYCP2 et SYCP3 sont des protéines de liaison à l'ADN, spécifiques de la méiose. Elles possèdent également un domaine responsable d'une interaction entre-elles (Offenberg *et al.*, 1998). La suppression de *Sycp2* chez la souris, conduit à l'échec de la synapsis et à un arrêt méiotique au stade zygotène chez les mâles (les femelles sont fertiles mais la taille des portées est réduite) (Yang *et al.*, 2006). L'inactivation du gène *Sycp3* induit là aussi une stérilité mâle (hypotrophie testiculaire de 70 %), alors que les femelles sont fertiles (un taux élevé de cellules aneuploïdes apparaît cependant dans les ovaires) (Yuan *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2002). Dans les spermatocytes *Sycp3*^{-/-}, la synapse des chromosomes homologues est défectueuse et les cellules germinales rentrent en apoptose entraînant une absence de spermatocytes au stade pachytène.

La localisation de SYCP2 dépend de SYCP3 et en l'absence de SYCP3, SYCP2 ne parvient pas à se localiser correctement dans l'AE (Yuan *et al.*, 2000).

Le CS consiste donc en l'assemblage des deux éléments latéraux (les anciens AE), maintenus ensemble par les filaments transversaux de l'élément central constitué par SYCP1. Cette dernière est une des protéines des filaments transversaux (TF) du CS (de Vries *et al.*, 2005). Sa présence le long du CS indique les régions où il y a appariement des chromosomes homologues.

La formation du CS fait également intervenir d'autres protéines : des cohésines. Elles sont soit spécifiques de la méiose (comme SMC1 β , RAD21L, REC8 and STAG3/SA3), soit ubiquitaires et donc retrouvées au cours de la mitose (SMC1 α , SMC3, RAD21, STAG1/SA1 et STAG2/SA2). Durant la méiose, les cohésines maintiennent les chromatides sœurs appariées, ainsi que les chromosomes homologues. L'inactivation de ces protéines entraîne diverses anomalies dans la structure du CS (Revenkova *et al.*, 2004; Herrán *et al.*, 2011; Winters *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2005).

Ainsi, l'invalidation d'une cohésine spécifique de la méiose, comme *Stag3* (*Stromal Antigen 3*), entraîne un blocage au stade leptotène, avec défaut de mise en place des éléments axiaux et de la cohésion des centromères des chromatides sœurs (Hopkins *et al.*, 2014; Winters *et al.*, 2014). SMC1 β (*Structural Maintenance of Chromosomes 1 β*), détectée dès le stade pré-leptotène, se localise sur l'axe des chromosomes durant la prophase I et est également requise pour la formation correcte des éléments axiaux du CS. Les souris invalidées pour la cohésine *Smc1 β* sont stériles dans les deux sexes et la méiose des spermatocytes I *Smc1 β ^{-/-}* est bloquée au stade pachytène ; (Revenkova *et al.*, 2004). Ces spermatocytes présentent un raccourcissement des éléments axiaux, une perte précoce de la cohésion des chromatides sœurs et donc une formation incomplète du CS (Revenkova *et al.*, 2004). *Rec8* (*REC8 Meiotic Recombination Protein*), autre cohésine spécifique de la méiose et détectable dès le stade pré-leptotène, joue un rôle essentiel pour contrôler la synapse et la reconnaissance des chromosomes homologues. REC8 est localisée au niveau des boucles de chromatine. Sa suppression chez la souris, ne perturbe pas les premières étapes de la mise en place du CS, mais des anomalies sont observées comme un appariement des chromatides sœurs et non pas entre les chromosomes homologues (Xu *et al.*, 2005). Les cohésines REC8 et SMC1 β pourraient fournir une base pour la formation des éléments axiaux. Afin de garantir la formation du CS et le bon appariement des chromosomes homologues, l'intégrité du complexe de cohésines spécifiques de la méiose est donc critique.

Les protéines présentes au niveau de l'élément central (CE) varient selon les espèces, la souris en possède quatre, SYCE1, SYCE2, SYCE3 (*Synaptonemal complex central element 1, 2 ou 3*) et TEX12 (*Testis expressed sequence 12*). L'inactivation d'un des gènes de ces éléments centraux perturbe le processus de recombinaison méiotique (Bolcun-Filas *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2006; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Schramm *et al.*, 2011). Les souris mâles et femelles mutantes pour *Syce2* ou *Syce1* sont infertiles, et présentent des défauts dans l'assemblage du complexe synaptonémal, et une absence de synapsis et de réparation des CDBs (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Bolcun-Filas *et al.*, 2009) . Il existe donc un lien étroit entre les protéines du CS et la recombinaison des chromosomes homologues.

En plus des composants canoniques, il existe d'autres protéines associées au CS comme FKBP6 (*FK506-binding protein 6*), nécessaire pour l'achèvement/le maintien de la synapsis homologue chez les mâles. FKBP6 colocalise fortement avec SYCP1 sur les chromosomes appariés, même en l'absence de SYCP3. Cependant, sa fonction exacte n'est pas élucidée (Crackower *et al.*, 2003; Noguchi *et al.*, 2008).

Les deux protéines HORMAD1 et 2 s'associent également aux chromosomes non appariés, avant et après la synapsis. Chez les souris déficientes en *Hormad1*, les chromosomes homologues ne parviennent pas à s'apparier, provoquant des défauts de recombinaison. Ceci confirme un rôle des protéines avec un domaine HORMA chez les mammifères, rôle dans la coordination de la progression de la synapse et la recombinaison méiotique (Daniel *et al.*, 2011).

En résumé de ce paragraphe, le CS se forme du stade leptotène jusqu'au stade pachytène. Il est composé d'éléments axiaux (constitués de SYCP2 et SYCP3) en association avec des cohésines (dont SMC1 β , STAG3 et REC8, spécifiques de la méiose) liées à des éléments centraux (SYCE1, SYCE2 et TEX12) par l'intermédiaire d'éléments transversaux (SYCP1). L'assemblage incorrect de ce CS conduit à la mort de la cellule, à une recombinaison méiotique perturbée et à la formation de cellules germinales

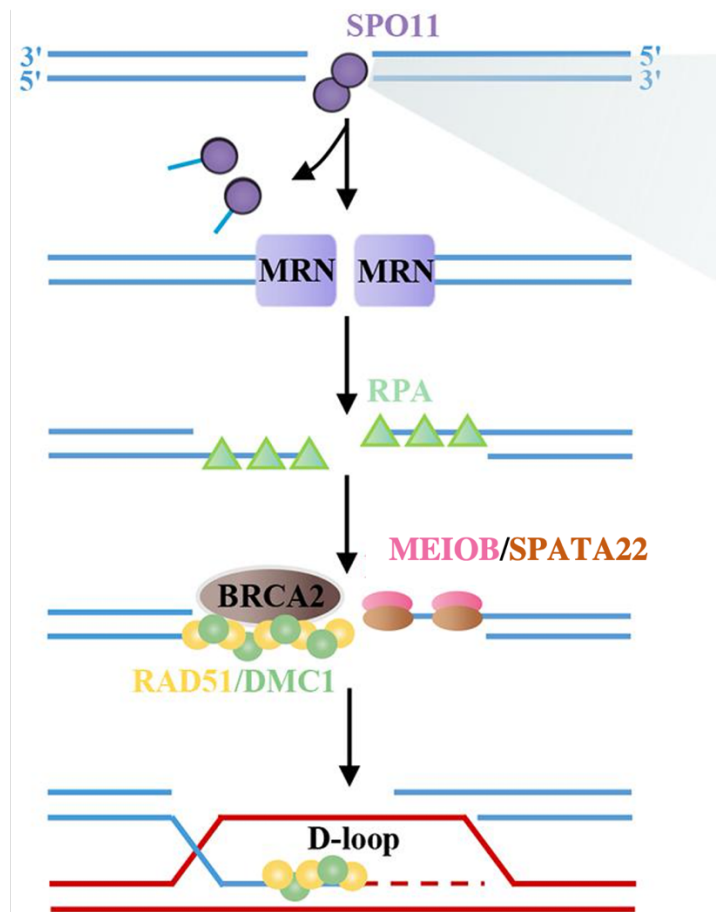


Figure 18 : Protéines impliquées dans l'échange de brin au cours de la réparation des CDBs chez la souris.

Les CDBs génèrent des extrémités d'ADN qui subissent une résection de 5' à 3' générant des queues d'ADNsb 3'. Celles-ci sont reconnues par la protéine RPA. Les protéines DMC1 et RAD51 se lient à ces extrémités d'ADNsb et catalysent l'invasion du brin dans le duplex d'ADN homologue générant un intermédiaire de boucle de déplacement (boucle D), puis initie la synthèse d'ADN et l'extension de la boucle D. Outre RAD51 et DMC1, ce processus dynamique est également régulé par d'autres facteurs de recombinaison, notamment BRCA2 (BRCA2 DNA Repair Associated), MEIOB et SPATA22.

(Modifiée de Huang *et al.*, 2021)

aneuploïdes. Chez l'homme, l'altération de formation du CS entraîne un arrêt complet de la méiose I et une infertilité masculine (Judis *et al.*, 2004).

c. Réparation des cassures double brins par recombinaison homologue

i. Échange de brins

Une fois les CDBs générées par SPO11, cette dernière va se détacher du site de coupure. La réparation des CDBs forme différentes structures de réparation. Pendant la progression de la méiose, la majorité des CDBs de l'ADN sont réparées sans échange de chromatine. Une petite partie des CDBs engendre un crossing-over, nécessitant un échange réciproque de matériel génétique entre les chromosomes homologues.

Une étape de maturation au niveau des CDBs se met en place. Cette étape est nommée la résection et correspond à la dégradation des extrémités de l'ADN avec la formation d'extrémité 3' simple-brin (ssDNA ou ADNs_b) de part et d'autre de la cassure. L'exonucléase EXO1 (*Exonuclease 1*) intervient dans ce processus (Zakharyevich *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011). Les extrémités sortantes sont prises en charge par des recombinaisons. La réparation d'une CDB nécessite une matrice complémentaire intacte, qui est, dans les cellules méiotiques, le chromosome homologue. RPA (*Replication Protein A*) est la principale protéine de liaison à l'ADNs_b des eucaryotes, avec des fonctions de réplication et de réparation de l'ADN (Liu and Huang, 2016) (**figure 18**). Chez les mammifères, la RPA est progressivement remplacée par les membres de la famille RecA (RAD51 et DMC1, protéines hautement conservées) formant des nodules de recombinaison précoces (Moens *et al.*, 2007). En méiose comme en mitose, la réparation des CDB se déroule sous le contrôle de RAD51 (*RAD51 Recombinase*) (Sugiyama *et al.*, 1997). Intervient également une recombinaison spécifique de la méiose : DMC1 (*DNA Meiotic Recombinase 1*) (Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996). Ces recombinaisons se fixent au niveau des CDBs et elles initient la recombinaison inter-

homologue et la réparation des cassures (Tarsounas *et al.*, 1999). Ces deux protéines peuvent former des homopolymères, structures en anneaux, capables de se fixer à l'extrémité 3' de l'ADNsb et la région intacte du chromosome homologue sert de matrice de réparation (Sehorn and Sung, 2004). Cette association recombinaisons-ADNsb permet aussi l'échange de brin d'ADN (Edlinger and Schlögelhofer, 2011).

La suppression de *Rad51* chez la souris est létale (avant 8,5 dpc) (Tsuzuki *et al.*, 1996). Les souris *Dmc1*^{-/-} mâles et femelles sont stériles (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). Chez les mâles, il y a un arrêt des spermatocytes au stade tardif du zygotène/début pachytène de méiose I (Pittman *et al.*, 1998). Dans ces cellules, il n'y a pas d'initiation de la formation du CS, probablement dû à l'absence de la protéine SYCP1, et les intermédiaires de recombinaisons sont absents (Pittman *et al.*, 1998). Ces observations soulignent l'interdépendance du complexe synaptonémal avec la formation des nodules.

Le maintien d'un nombre approprié de foyers RAD51/DMC1 au cours du stade zygotène, ainsi que la formation des recombinaisons homologues pendant la méiose sont possibles grâce à la protéine MEIOB (*Meiosis Specific with OB domains*). Cette protéine, conservée chez les vertébrés, s'exprime spécifiquement dans les cellules germinales méiotiques précoces et colocalise avec RPA sur les axes chromosomiques au niveau des sites ADN simple brin (**figure 18**). La suppression de *Meiob* chez la souris entraîne une stérilité mâle et femelle, avec un blocage de la cellule germinale au stade de zygotène/pachytène-like (Souquet *et al.*, 2013). Les cellules germinales *Meiob*^{-/-} présentent des défauts d'appariement des chromosomes, ainsi qu'une absence de réparation des CDBs. Dans les spermatocytes *Meiob*^{-/-}, les foyers DMC1-RAD51 du stade zygotène sont diminués de 70% par rapport aux spermatocytes normaux (Souquet *et al.*, 2013). En coopération avec la protéine SPATA22 (*Spermatogenesis Associated 22*), MEIOB présente également une activité exonucléase 3'-5', MEIOB et SPATA22 colocalisent et interagissent avec RPA sur les chromosomes méiotiques, suggérant que MEIOB, SPATA22 et RPA coopèrent ensemble pour assurer une

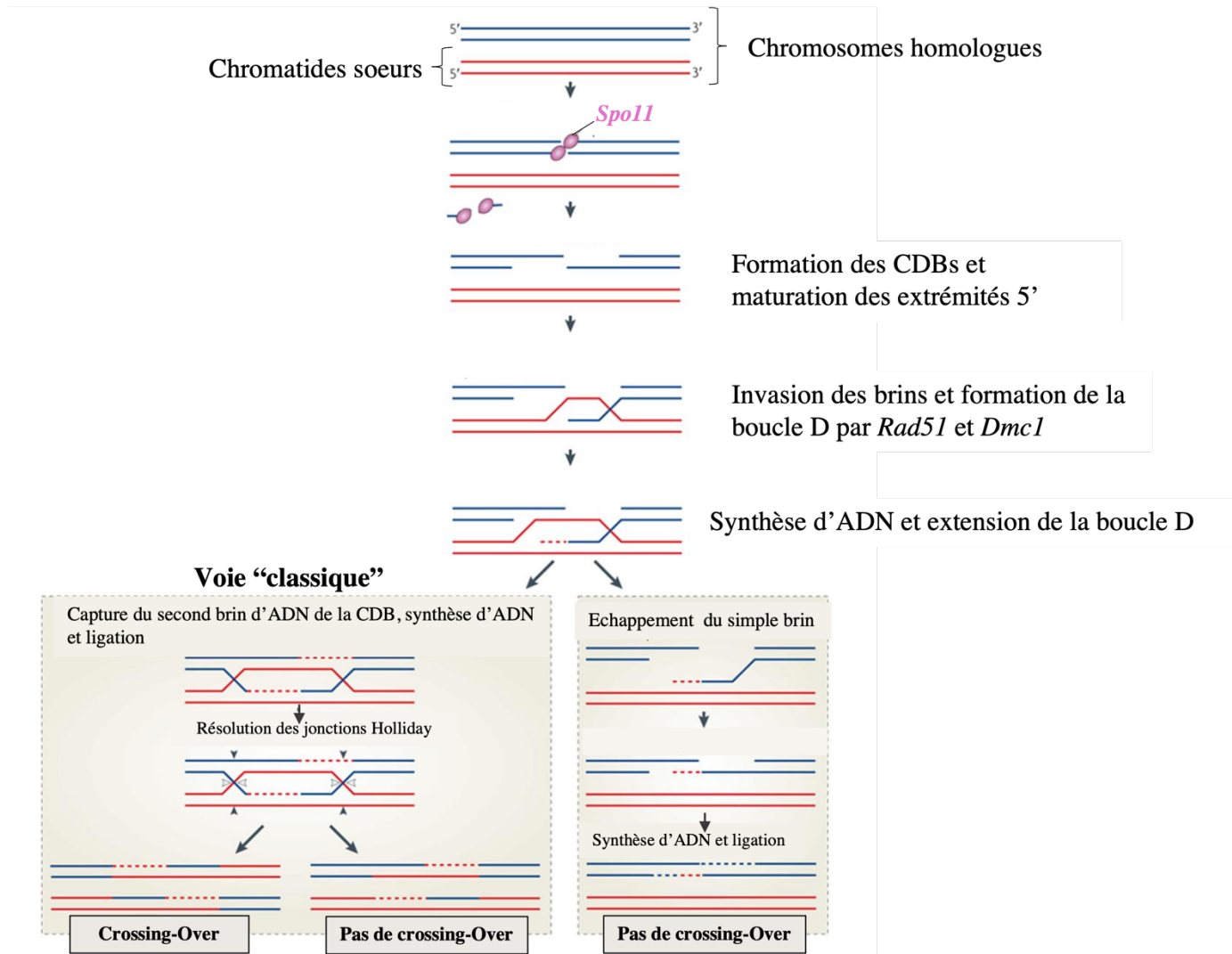


Figure 19 : Voies de recombinaison méiotique.

A gauche : Les intermédiaires de recombinaison peuvent être traités comme croisés (CO) ou non croisés (NCO). Dans la voie classique, lorsque l'invasion des brins est stabilisée, la capture de l'autre extrémité et la synthèse d'ADN génèrent une double jonction (dHJ). La plupart des dHJ résolvent principalement la formation d'un produit de CO.

A droite : L'autre voie alternative, se produit lorsque le brin envahissant s'hybride à nouveau avec l'extrémité opposée du CDB d'origine, conduisant à un produit NCO.

(Adaptée de Sasaki *et al.*, 2010)

recombinaison méiotique appropriée (Ribeiro *et al.*, 2021). Des souris invalidées pour le gène *Spata22* ont le même phénotype que les souris *Meiob^{-/-}* (La Salle *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Souquet *et al.*, 2013; Ishishita *et al.*, 2014; Hays *et al.*, 2017).

ii. Crossing-over versus Non crossing-over

Comme évoqué précédemment, pendant la progression de la méiose, la majorité des CDBs de l'ADN sont réparées sans échange de chromatine (non-croisement (NCO pour non-crossing over)) (Börner *et al.*, 2004). Une petite partie des CDBs engendre des crossing-overs (CO), nécessitant un échange réciproque de matériel génétique entre les chromosomes homologues.

Après résection 5'-3' (dégradation des extrémités des CDBs), une extrémité d'ADN envahit l'homologue pour former une boucle de déplacement (nommée boucle D), représentant la dernière étape intermédiaire commune à toutes les voies de la réparation. Après la formation de la boucle D, les ADN polymérase synthétisent l'ADN, étendant la molécule simple brin en utilisant le brin invasif comme matrice (**figure 19**). A partir de cette étape de synthèse d'ADN, plusieurs mécanismes différents peuvent être utilisés pour compléter la réparation (**figure 19**) :

- une élongation de l'ADN simple-brin permettant une réparation "classique" de l'ADN, sans CO,
- il y a formation d'intermédiaires de recombinaison appelées doubles jonctions de Holliday (dHJ). Elles permettent la réalisation des CO qui aboutiront à l'obtention de chromosomes recombinés au stade pachytène.

Les crossing-overs sont indispensables pour le bon déroulement de la méiose par la création des chiasmata. Ces chiasmata sont la persistance d'un lien physique entre les chromatides des chromosomes homologues après le CO. Ils sont indispensables pour l'alignement correct des chromosomes homologues le long de la plaque métaphasique et indispensable pour la diversité génétique. Enfin, les crossing-overs permettent l'échange d'information génétique entre les chromosomes homologues

maternels et paternels. Ces étapes nécessitent, là encore, un ensemble de protéines différentes intervenant lors de la réparation des CDBs et que nous détaillerons dans le prochain paragraphe.

iii. Protéines de la recombinaison méiotique

Au cours du stade zygotène, les nodules sont dits intermédiaires (ou nodules transformés). Lors de l'appariement des chromosomes homologues, les foyers de protéines RAD51-DMC1 sont perdus au profit de foyers composés en partie de protéines nécessaires à la réparation des mésappariements de l'ADN (MMR, pour *DNA mismatch repair*). Ces protéines assurent une réparation efficace des CDBs. Chez les mammifères, les foyers des nodules intermédiaires sont composés principalement de MSH4 (*mutS homolog 4*), MSH5 (*mutS homolog 5*), et PMS2 (*PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component*) (Moens *et al.*, 2002 ; Moens *et al.*, 2007). MSH4 et MSH5 stabilisent les dHJ (Hollingsworth *et al.*, 1995; de los Santos *et al.*, 2003).

L'étude des gènes *Msh4* et *Msh5*, par suppression génique chez la souris, a mis en évidence leurs rôles primordiaux dès le stade zygotène. Les souris *Msh4*^{-/-} ou *Msh5*^{-/-} mâles et femelles sont stériles. Dans ces deux lignées mutantes, les spermatocytes sont bloqués au stade zygotène avec un défaut de formation du CS, présentant des synapses anormales (Kneitz *et al.*, 2000; Vries *et al.*, 1999). De la même façon, l'invalidation du gène *Pms2* chez la souris provoque une stérilité mâle avec un défaut d'appariement des chromosomes (Baker *et al.*, 1995). En parallèle de la formation du CS, ce complexe de protéines (MSH4, MSH5 et PMS2) est essentiel à l'appariement tardif des chromosomes homologues afin d'éviter des échanges "illégitimes" entre régions d'ADN non homologues lors des CO. Par ailleurs, la protéine TEX11 (*Testis expressed 11* ou ZIP4H) (largement détaillée dans le chapitre IV), qui colocalise avec les foyers MSH4, entre également dans la composition des nodules méiotiques intermédiaires (Yang *et al.*, 2008).

Le complexe protéique précédemment décrit lors de la réparation va également interagir avec les protéines MLH avec MLH1 (*MutL Homolog 1*) et MLH3 (*MutL Homolog 3*). Les crossing-overs se forment au niveau des nodules alors appelées nodules tardifs ou nodules de recombinaisons et font alors intervenir d'autres systèmes protéiques. En début de pachytène, la protéine MLH3 se colocalise au niveau de ces nodules dès le stade de nodules intermédiaires, chez l'homme et la souris (Lipkin *et al.*, 2002; Oliver-Bonet *et al.*, 2005). Au stade pachytène intermédiaire, MLH1 colocalise avec MLH3 pour former des hétérodimères MLH1-MLH3 (Kolas *et al.*, 2005). Ces deux dernières ne se lient pas sur tous les foyers antérieurement constitués de MSH4-MSH5 : ils sélectionnent certains foyers qui deviendront les crossing-overs. Les foyers MSH4-MSH5 qui ne lient pas MLH1-MLH3 sont réparés selon la voie classique sans produire de chiasmas. Le nombre de nodules pachytène tardifs est plus faible que le nombre de nodules pachytène précoces (Morelli and Cohen, 2005). Les souris invalidées pour *Mlh3* sont infertiles. Les spermatocytes *Mlh3*^{-/-} entrent en métaphase I de méiose mais présentent des défauts de ségrégation des paires de chromosomes, ce qui aboutit à l'apoptose des cellules germinales (Lipkin *et al.*, 2002). Chez ces mutants, on ne trouve aucun foyer MLH1, et les nodules de recombinaison ne se forment pas. Cela suggère que MLH3 serait donc nécessaire pour le recrutement de MLH1 au niveau des crossing-overs. Les souris mâles et femelles invalidées pour *Mlh1* sont également stériles. Chez les mâles, une séparation précoce des paires de chromosomes est observée, entraînant un blocage de la méiose. Les spermatocytes *Mlh1*^{-/-} représentent une réduction par 10 du nombre des foyers de chiasmas. MLH1, recruté par MLH3 au niveau des crossing-overs, est impliquée donc dans la formation des chiasmas (Baker *et al.*, 1996).

d. Attachement des télomères aux membranes nucléaires

Pendant le stade leptotène, les chromosomes se condensent, et les télomères subissent une réorganisation en se fixant à la membrane nucléaire interne en parallèle à l'appariement initial des chromosomes homologues. Ces télomères s'organisent en clusters dans une région limitée de l'enveloppe nucléaire selon une configuration appelée le stade de « bouquet » (**figure 20**). Cette configuration est visible en immunofluorescence dès la transition leptotène/zygotène chez l'homme et la souris (Alleva and Smolikove, 2017). Cet accrochage facilite l'appariement des chromosomes homologues (Horn *et al.*, 2013).

Les télomères sont reliés à la membrane nucléaire grâce à un complexe ubiquitaire nommé LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*). Deux protéines essentielles constituent ce complexe chez la souris : la protéine spécifique de la méiose KASH5 (*KASH Domain Containing 5*), située au niveau de la membrane nucléaire externe (Ding *et al.*, 2007; Morimoto *et al.*, 2012), et SUN1 (*Sad1 And UNC84 Domain Containing 1*) située au niveau de l'enveloppe nucléaire interne. Les souris *Sun1*^{-/-} sont infertiles dans les deux sexes. Une accumulation de "spermatocytes-like" anormaux bloqués en prophase I et qui dégénèrent par apoptose est observée chez les mâles mutants. De plus, en absence de SUN1, les télomères ne se fixent pas à la membrane nucléaire, ce qui altère l'appariement des chromosomes homologues (Ding *et al.*, 2007). L'absence de la seconde protéine du complexe LINC « KASH5 », induit un phénotype similaire chez les souris (Horn *et al.*, 2013). KASH5 interagit avec SUN1 et le cytosquelette via des dynéines (Horn *et al.*, 2013; Morimoto *et al.*, 2012). Ainsi, KASH5 relie les télomères à la membrane nucléaire par l'intermédiaire des dynéines, qui sont associées aux microtubules du cytosquelette des spermatocytes I. A la fin du leptotène, de part cette organisation des chromosomes en "bouquet", le CS peut se mettre en place plus facilement.

Il a été montré que, chez divers mutants méiotiques défectueux dans la réparation et la synapse des CDBs, la dynamique des télomères méiotiques est affectée (Adelfalk *et al.*, 2009; Liebe *et al.*, 2004; Liebe *et al.*, 2006). Chez les souris déficientes en *Atm*, *Spo11*, γ H2AX, *Sycp3* ou *Mlh1*, la longueur de la phase "en bouquet" est considérablement allongée, indiquant que la sortie de ce stade est médiée par des processus surveillant la progression de la réparation des CDBs, suggérant un lien étroit entre les événements méiotiques et la dynamique des télomères.

e. Asynapsis et mise en place du MSCI

Lorsque les chromosomes sont complètement appariés, le spermatocyte est alors en phase pachytène. Cependant, à ce stade, seuls les autosomes sont appariés dans les spermatocytes. Les gonosomes X et Y ne sont appariés qu'au niveau de la région pseudo-autosomique (PAR), seule région permettant des recombinaisons entre les chromosomes X et Y. L'absence d'appariement complet des gonosomes entraîne un remodelage de la chromatine permettant l'inactivation transcriptionnelle de ces gonosomes au début du stade pachytène. Ils sont alors localisés dans un domaine de coloration dense, en périphérie nucléaire, appelé vésicule sexuelle (ou XY-body ou sex-body). Là sont également situées plusieurs protéines qui participent au MSCI (*Meiotic sex chromosomes silencing*) ou inactivation transcriptionnelle des chromosomes X et Y. Cette inactivation est réalisée par un remodelage important des chromosomes sexuels. On retrouve un MSCI dans la lignée germinale de nombreux organismes possédant des chromosomes sexuels différenciés. Il persiste pendant tout le stade pachytène puis diplotène. Au niveau de la vésicule sexuelle, se localise également plusieurs protéines comme BRCA1 (*breast tumor suppressor gene 1*) et la protéine de réparation de l'ADN ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*). De plus, l'un des acteurs clé du MSCI est le variant d'histone H2AX. La protéine de réparation de l'ADN, ATR, phosphoryle l'histone H2AX en γ H2AX (seconde vague de phosphorylation de H2AX, la première ayant eu lieu dès le stade leptotène suite aux cassures de l'ADN),

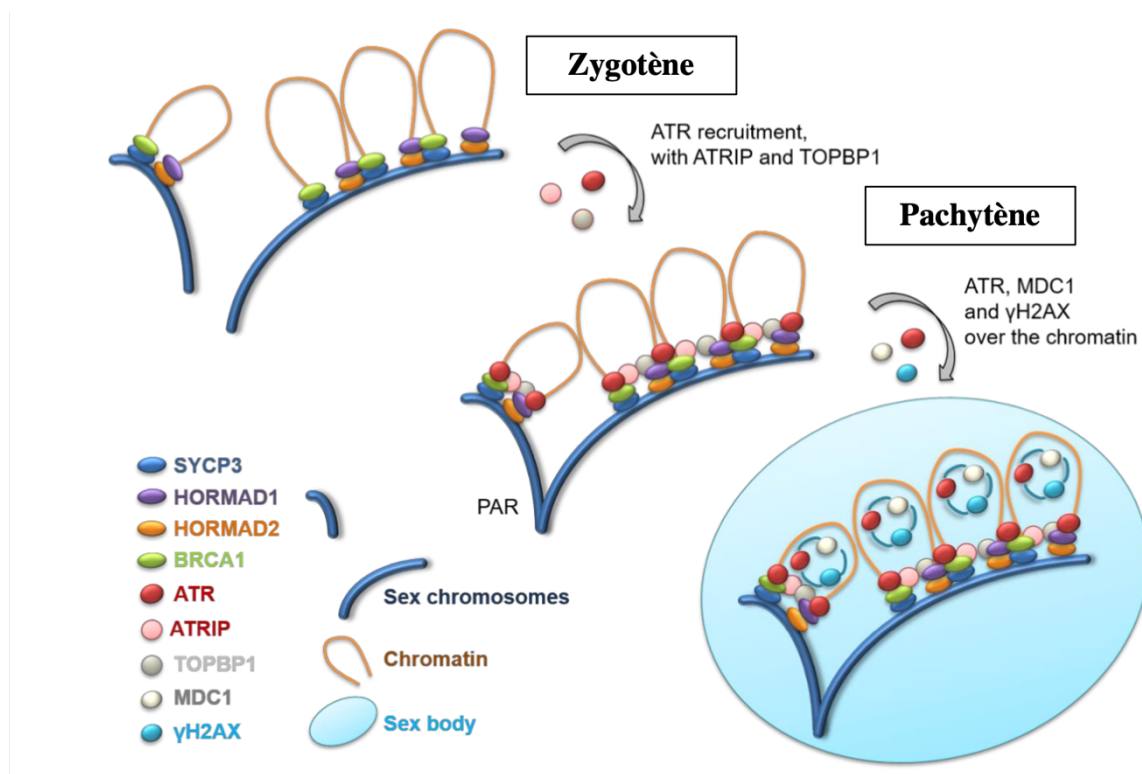


Figure 21 : Inactivation des chromosomes sexuels méiotiques (MSCI).

Au zygotène, la protéine BRCA1 est recrutée au niveau des régions asynaptiques des axes chromosomiques (marquées par SYCP3, HORMAD1 et HORMAD2). A la transition du stade zygotène-pachytène précoce, les facteurs de détection d'asynapsie favorisent le recrutement d'ATR et de ses cofacteurs TOPBP1 et ATRIP sur les axes chromosomiques non appariés. Au stade pachytène, MDC1 aide l'ATR à se déplacer dans les boucles de chromatine, favorisant ainsi la phosphorylation de H2AX, permettant ainsi l'inactivation transcriptionnelle de la région de chromatine non appariée (MSCI) pour former la vésicule sexuelle.

(Adaptée de Royo *et al.*, 2010)

indispensable pour la condensation de la chromatine des chromosomes X et Y et à la mise en place du MSCI (**figure 21**) (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003; Mahadevaiah *et al.*, 2001; Bellani *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2004). Les souris femelles H2AX^{-/-} sont fertiles (Celeste *et al.*, 2002). En revanche, les souris mâles invalidées pour H2AX sont stériles, présentent des défauts d'appariement des chromosomes et un échec de réalisation du MSCI, d'où l'absence de la formation de la vésicule sexuelle (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). Cette deuxième vague de phosphorylation de H2AX est contrôlée par la protéine MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*) (**figure 21**), partenaire de liaison γ H2AX (Ichijima *et al.*, 2011). Comme pour le phénotype des souris H2AX^{-/-}, les souris mâles *Mdc1*^{-/-} sont stériles, et les femelles ont une fertilité réduite. (Lou *et al.*, 2006). Les spermatocytes *Mdc1*^{-/-} sont bloqués au stade pachytène et ne parviennent pas à réaliser le MSCI, et donc la formation de la vésicule sexuelle est abolie (Ahmed *et al.*, 2007; Ichijima *et al.*, 2011). Seule la deuxième vague de phosphorylation de H2AX sur les gonosomes est impactée dans ces spermatocytes. Ces résultats soulignent l'importance de la protéine MDC1 lors de la deuxième vague de phosphorylation de H2AX. BRCA1 est également nécessaire pour la seconde vague de phosphorylation de H2AX et la localisation de la protéine ATR. BRCA1 interagit avec ATR chez la souris (Turner *et al.*, 2004). Les souris *Brca1*^{-/-} sont stériles dû à un arrêt méiotique (Broering *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2003). De plus, un mauvais recrutement de la protéine ATR et un défaut de localisation de γ H2AX et de la mise en place du MSCI sont observés dans les spermatocytes *Brca1*^{-/-}. Chez l'homme, BRCA1 est exprimée dès le stade zygotène au niveau des axes chromosomiques non appariés, puis au niveau de la PAR au stade pachytène (Scully *et al.*, 1997).

L'inactivation transcriptionnelle des gonosomes par le MSCI est un processus indispensable pour une progression méiotique correcte. L'étude de souris XYY montre que les 2 chromosomes YY s'apparient, échappent au MSCI, entraînant un arrêt de méiose au stade pachytène et l'apoptose de ces spermatocytes (Royo *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2006). L'absence du MSCI va entraîner l'expression des gènes du chromosome Y, qui, en condition normale sont transcriptionnellement réprimés.

Certains d'entre eux sont responsables de l'arrêt de la méiose (Royo *et al.*, 2010), comme le facteur de transcription ZFY (*zinc finger protein Y-linked*), (Koopman *et al.*, 1991). La souris possède deux gènes paralogues *Zfy1* et *Zfy2*, alors que chez l'homme, ZFY est un gène qui code pour 2 transcrits (Koopman *et al.*, 1991). L'expression ectopique des gènes *Zfy* (*Zyf1* et *Zyf2*) dans les testicules murins provoque une apoptose des spermatocytes qui restent bloqués au stade pachytène intermédiaire (Royo *et al.*, 2010). Le MSCI doit donc être établi afin d'empêcher l'expression des gènes *Zfy*. De plus, étant donné que les gènes *Zfy* sont nécessaires pour la mise en place du MSCI, leur expression est finement régulée (Vernet *et al.*, 2016). Après l'initiation du MSCI, les gonosomes subissent également d'autres modifications post-transcriptionnelles comme l'ubiquitylation de H2A, la déacétylation des histones H3 et H4, la diméthylation de H3 (qui devient H3K9me2) et la sumoylation de différentes protéines. Le rôle de ces modifications post-transcriptionnelles est de maintenir le MSCI (Turner, 2007). Au cours des phases suivantes (diplotène à diacinèse), les gonosomes migrent au centre du noyau. Les protéines BRCA1, ATR et γ H2AX se détachent de ces gonosomes. Les modifications post-transcriptionnelles de ces chromosomes perdurent, maintenant le MSCI pendant les deux divisions méiotiques jusqu'à l'obtention de spermatides. Il prend alors l'appellation de PSCR (Postmeiotic sex chromosome repression). On ne parle plus alors de XY inactif mais réprimé.

Cependant, après la méiose, plusieurs gènes liés aux chromosomes X et Y seront exprimés, dont le gène *Zfy* qui sera impliqué dans les étapes tardives de la spermatogenèse (Vernet *et al.*, 2016).

Un autre évènement étroitement lié au MSCI, est le MSUC (pour meiotic silencing of unsynapsed chromatin) (Schimenti, 2005). MSUC est activé en cas d'asynapsis anormale de toute région chromosomique au cours de la méiose murine des deux sexes, et peut induire à une apoptose des cellules germinales (Burgoyne *et al.*, 2009).

B. Fin de la première division méiotique

À la suite des évènements de réparation des CDBs, de la formation des crossing-overs et de la mise en place du MSCI, la cellule germinale se dirige vers la fin de la prophase I de la première division méiotique. Ces différents évènements clés de la méiose précoce sont sous le contrôle du point de contrôle « pachytène » (**figure 22**). Ce point de contrôle empêche la progression méiotique en présence d'anomalies de ces étapes, comme le montre les différents modèles de souris invalidées pour des gènes essentielles à ces processus (précédemment détaillés) présentant un blocage méiotique précoce et une apoptose des spermatocytes. Les acteurs majeurs de ce point de contrôle sont les kinases ATM et ATR (MacQueen et Hochwagen 2011) déjà décrits précédemment. En cas d'anomalies de la synapsis ou de la réparation des CDBs, les kinases ATR ou ATM seront activées par phosphorylation, respectivement, afin d'empêcher la progression méiotique et arrêter la prophase, ce qui induit une mort cellulaire des spermatocytes (**figure 22**).

La fin de la première division méiotique se manifeste par la dissociation du complexe synaptonémal, caractéristique du stade **diplotène**. Chez la souris, les protéines PLK1 (*Polo Kinase 1*), Aurora B et CDK1 (*Cyclin Dependant Kinase 1*) sont impliquées dans le processus de la dissociation du complexe synaptonémal. Au stade pachytène, la protéine HSP70-2 (*Heat Shock Protein*) se localise au niveau du CS pour recruter CDK1, qui à son tour va cibler des composants du CS qui contiennent des sites de phosphorylation CDK1, tels que SYCP1, entraînant le désassemblage du CS (Bonnycastle *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1996). L'invalidation de *Hsp70-2* induit une stérilité des souris mâles uniquement, due à une absence de dissociation du CS et par conséquent une apoptose des spermatocytes à la fin du stade pachytène (Dix *et al.*, 1996).

A ce stade, l'élément central du CS est donc éliminé progressivement, comme la protéine SYCP1, alors que la protéine SYCP3 des éléments latéraux est redistribuée vers les centromères et entre les chromatides sœurs (Bisig *et al.*, 2012). Les protéines spécifiques de la méiose précédemment localisés au niveau des CDBs (nodules méiotiques) disparaissent et les chiasmas sont bien visibles avec un rôle important de cohésines telles que *Rec8* et *Smc1b* précédemment décrites. Les chromosomes restent donc unis au niveau des chiasmas entre paires de chromosomes homologues, et se condensent au maximum.

Chez les femelles, le stade diplotène est l'un des stades méiotiques où l'ovocyte reste bloqué dans l'ovaire fœtal. La reprise de la méiose se fera à l'ovulation.

Chez le mâle, dans la continuité du stade diplotène, a lieu le stade de **diacinèse**, caractérisé par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire des cellules germinales. La conséquence de cette fragmentation est une réorganisation des fuseaux méiotiques à partir des deux MTOCs (centres organisateurs des microtubules) des pôles opposés du noyau. Un 2^{ème} point de contrôle méiotique intervient en fin de prophase I juste avant la métaphase I pour réguler l'entrée des cellules en métaphase I. Cela dépend de l'activation du facteur MPF (*Maturation/Mitosis promoting factor*) composé de CCNB1

(cycline B1) et de l'enzyme catalytique CDK1. Toute anomalie empêchant l'activation de ce facteur induit un blocage de la transition entre la prophase et la métaphase. Toutefois, d'autres facteurs autre que le MPF sont nécessaires afin d'assurer cette transition, comme la cycline A1 et EMI2 (*Early Meiotic Inhibitor 2*) (Sweeney *et al.*, 1996). L'invalidation de *Emi2* chez la souris induit une stérilité des deux sexes due à un blocage méiotique au stade prophase I (Gopinathan *et al.*, 2017). Ce blocage de transition entre la prophase et la métaphase a été associé d'une diminution de l'activité de l'enzyme CDK1, et a été sauvé partiellement par un modèle murin knock-in d'induction de l'activité de CDK1 (Gopinathan *et al.*, 2017). Contrairement à *Emi2*, les souris femelles invalidées pour la cycline A1 (codée par le gène *Ccna1*) sont fertiles (Liu *et al.*, 1998). Les spermatocytes *Ccna1*^{-/-} dégénèrent par apoptose après leur blocage au stade diplotène tardif, au second point de contrôle méiotique. Une réduction d'environ 80% de l'activité de CDK1 a été également observée dans les testicules *Ccna1*^{-/-} (Liu *et al.*, 1998). La cycline A et EMI2 sont donc essentielles pour la progression méiotique et la transition des spermatocytes entre le stade diplotène et métaphase.

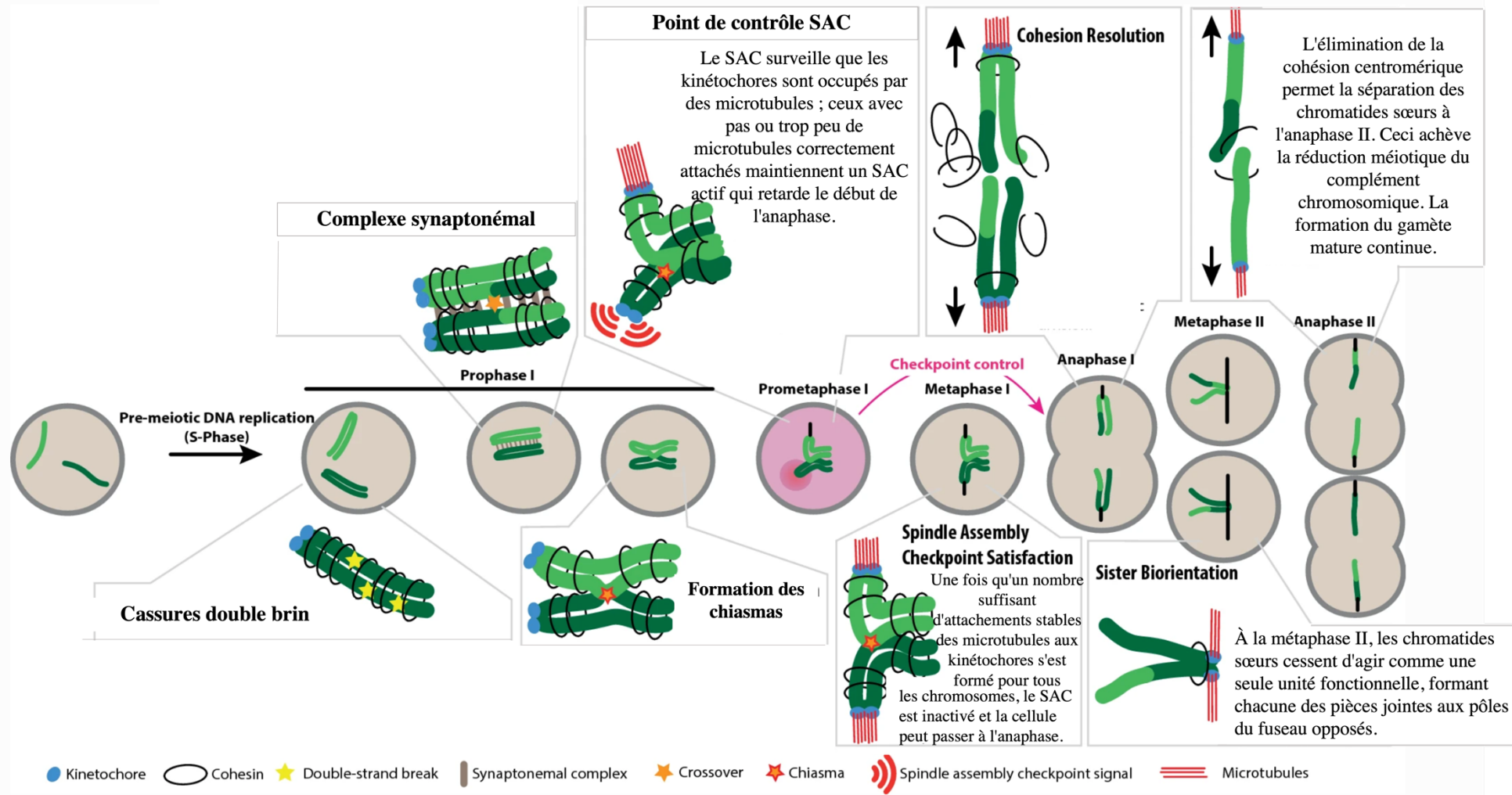


Figure 23 : Le point de contrôle SAC au cours de la méiose. (Modifiée de Lane and Kauppi, 2019)

Cette transition diplotène-métaphase est accompagnée d'une disparition de γ H2AX avec la dispersion de la vésicule sexuelle, pour permettre une conformation chromosomique appropriée pour la métaphase I (Mahadevaiah *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003).

Au stade métaphase I, les paires de chromosomes homologues migrent vers le plan équatorial de la cellule. Les fuseaux se forment entièrement et s'attachent aux centromères. Seuls les chiasmas sont alignés sur la plaque équatoriale, l'alignement déterminant le mixage des chromosomes d'origine maternelle et paternelle dans les futures cellules de la descendance.

Lorsque tous les chromosomes sont attachés aux microtubules au niveau des kinétochores (situés au niveau des centromères), la métaphase I va évoluer vers l'anaphase I. La métaphase I des spermatocytes est globalement une étape plutôt rapide. Un troisième point de contrôle méiotique est activé lors de la métaphase I. Il s'agit du point de contrôle SAC (*spindle assembly checkpoint*) qui surveille l'attachement microtubules-kinétochores, permettant à la cellule germinale de parvenir au stade d'anaphase ou pas (**figure 23**).

Le SAC est constitué des plusieurs protéines, dont MPS1 (*Monopolar spindle 1*). MPS1 est une kinase conservée de la levure à l'homme qui joue un rôle essentiel dans la prévention d'erreurs de la ségrégation des chromosomes via le complexe SAC (Liu and Winey, 2012; Manic *et al.*, 2017; Pachis and Kops, 2018). Au cours de la mitose, MPS1 se lie directement aux kinétochores non attachés pour phosphoryler et recruter d'autres protéines SAC telles que BUB3 (*Budding uninhibited by benomyl*), BUBR1 et MAD2 (*Mitotic arrest deficient 2*) aux kinétochores (Hiruma *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2015; Maciejowski *et al.*, 2010; Sudakin *et al.*, 2001). Ce processus inhibe l'activation du complexe APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) jusqu'à ce que tous les microtubules se fixent de manière stable aux kinétochores au début de l'anaphase (Izawa and Pines, 2012). L'activité du complexe APC/C dépend de son activateur Ccdc20. Afin de bloquer la transition précoce métaphase-anaphase, le point de

contrôle SAC empêche APC/C-Ccdc20 de cibler les deux protéines clés : la sécurine et la cycline B. La sécurine inhibe la séparase, une endopeptidase qui clive les cohésines qui attachent les paires de chromosomes entre elles pendant l'anaphase.

MPS1 a des fonctions importantes non seulement dans la mitose mais dans la méiose aussi (Marston and Wassmann, 2017). La délétion de 107 acides aminés de l'extrémité N-terminale de MPS1, impliquée dans la liaison aux kinétochores induit l'activation précoce du complexe APC/C et des erreurs de ségrégation ou de non-disjonction dans les ovocytes des souris suite à l'échec du point de contrôle SAC et de l'alignement des chromosomes dans la méiose I (Wang *et al.*, 2009; Hached *et al.*, 2011). Les ovocytes mutants présentaient un taux élevé d'aneuploidie et progressaient donc plus rapidement vers le stade anaphase I par rapport aux ovocytes contrôles.

Récemment, la fonction de *Mps1* dans la spermatogenèse murine a été étudiée (Fang *et al.*, 2021). L'invalidation de *Mps1* a provoqué une apoptose des spermatocytes, ainsi qu'une réduction des spermatocytes en stade métaphase et anaphase, ce qui suggère que *Mps1* est impliquée dans cette transition métaphase-anaphase durant la méiose mâle également (Fang *et al.*, 2021).

Finalement, si les chromosomes homologues sont correctement attachés et alignés au niveau de la plaque métaphasique, le point de contrôle SAC sera inactivé et les spermatocytes progressent au stade anaphase de la première division méiotique. Cela s'accompagne par l'activation du complexe APC/C, qui va inactiver la cycline B et la sécurine et par conséquent activer la séparase. Au cours de l'anaphase I, les chromosomes homologues - chacun constitué de deux chromatides sœurs maintenues ensemble au niveau du centromère - se séparent vers les pôles opposés de la cellule germinale grâce à la séparase. La cohésion entre les deux bras homologues est donc levée.

En télophase I, le mouvement des chromosomes homologues vers les pôles est terminé. Le fuseau méiotique disparaît. La cytokinèse, ou division cellulaire, se produit,

produisant deux cellules filles chacune avec un seul jeu de chromosomes à 2 chromatides. Ces cellules filles obtenues sont appelées spermatocytes secondaires (II).

C. La deuxième division méiotique

Après une courte interphase, sans réplication d'ADN, les spermatocytes secondaires ont une durée de vie très courte et vont rentrer en deuxième division méiotique. Cette deuxième division, appelée division équationnelle, est très rapide et ressemble davantage à une division mitotique. Chaque chromatide sœur des chromosomes est accrochée au fuseau méiotique et est ségrégée dans une cellule fille différente. Cependant, contrairement à une division mitotique, qui aboutit à la formation de deux cellules filles diploïdes identiques, le résultat final de la méiose est l'obtention de cellules filles haploïdes présentant des combinaisons chromosomiques différentes. Ainsi, le bilan des deux étapes de division de la méiose est qu'à partir d'un spermatocyte primaire possédant $4n$ chromosomes, la méiose a permis d'obtenir 4 spermatides rondes haploïdes et génétiquement différentes.

III. La spermiogénèse

La spermiogénèse, dernière étape de la spermatogénèse, est le processus par lequel les spermatides rondes se différencient en spermatozoïdes. Ce processus dure 23 jours chez l'homme et environ 14 jours chez la souris et peut être subdivisé en différentes étapes qui varient en nombre selon les espèces : 16 chez la souris et 6 chez l'homme. Ces différentes étapes, ou phases, de la spermiogénèse sont composées par :

- la biogenèse de l'acrosome,
- la compaction de la chromatine,
- l'assemblage du flagelle et la réorganisation du cytoplasme de la cellule germinale.

Cette cytodifférenciation complexe aboutit à la formation des spermatozoïdes comportant 3 régions distinguées : la tête, la pièce intermédiaire et la queue. Ces spermatozoïdes seront finalement libérés de l'épithélium séminifère via un processus appelé spermiation. Les cellules de Sertoli jouent également un rôle dans la différenciation finale de ces cellules germinales mâles, en acheminant les spermatides vers la lumière des tubes séminifères via un réseau de jonctions, d'actine et de microtubules (Wen *et al.*, 2016).

A. Développement de l'acrosome

L'acrosome est un organite lié à la membrane nucléaire et qui participe à la fécondation. En effet, l'acrosome va libérer des enzymes hydrolytiques et protéolytiques pour faciliter la pénétration du spermatozoïde à travers la zone pellucide entourant l'ovocyte. L'acrosome peut être marqué sur les coupes histologiques par une coloration Period Acid Schiff's (PAS). L'analyse de la structure de l'acrosome est cependant mieux visualisée par microscopie électronique. L'acrosome commence à se développer dans les spermatides rondes (début au stade 2 chez la souris). L'initiation de ce développement débute par l'apparition de vésicules pro-acrosomales bourgeonnant à partir du réseau trans-Golgien (phase de Golgi : étapes 2-4 de la spermiogénèse). L'appareil de Golgi trie et transporte ces vésicules vers le pôle supérieur de la surface nucléaire, au fur et à mesure que l'acrosome s'étend progressivement sur la membrane nucléaire. L'attachement de l'acrosome en développement à la surface nucléaire semble être médié par la thèque périnucléaire, fine couche d'éléments cytosquelettiques entre les membranes acrosomique et nucléaire. Cette structure possède diverses fonctions, dont l'une est, au cours de la spermiogénèse, de faciliter la fixation de l'acrosome à la membrane nucléaire sous-jacente et à la membrane plasmique sus-jacente. Une autre structure impliquée dans le développement de l'acrosome est l'acroplaxome, une structure contenant de l'actine

Spermiogénèse

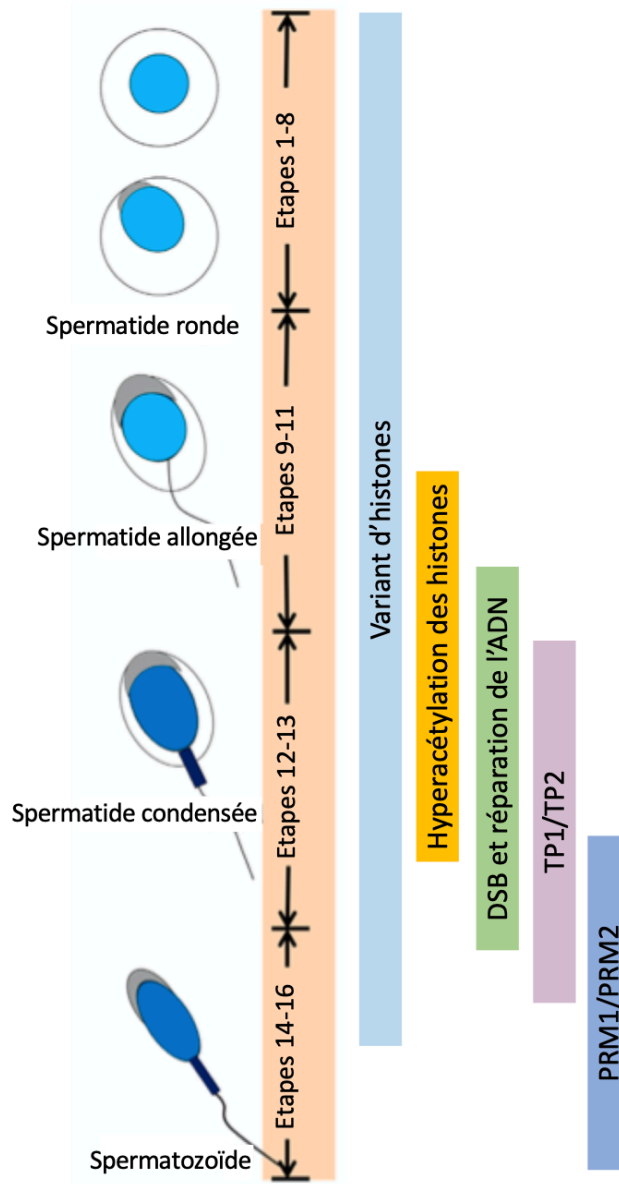


Figure 24: Les étapes clés de la compaction du noyau durant la spermiogénèse murine.
(Modifiée de Hao *et al.*, 2019)

F, de la myosine et de la kératine qui est attachée à la lame nucléaire de la spermatide en développement. Cette structure semble faciliter l'agrégation et la fixation des vésicules pro-acrosomales au cours de la biogenèse de l'acrosome, ancrant ainsi l'acrosome en développement au noyau. La membrane qui entoure l'acrosome est divisée de deux parties : la membrane de l'acrosome interne et la membrane de l'acrosome externe (phase acrosomique : étapes 5-12 de la spermiogénèse). Finalement, l'acrosome prend sa forme définitive durant la phase de maturation qui se déroule en parallèle de la phase de condensation du noyau.

B. Condensation du noyau et remodelage de la chromatine

Le noyau du spermatozoïde est caractérisé par une compaction importante de l'ADN. Dans la plupart des cellules eucaryotes, les unités de compaction de la chromatine sont appelées les nucléosomes. Ils sont formés par des octamères d'histones entourés de 147pb d'ADN. Ces octamères d'histones contiennent les histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4. Le nucléosome forme le premier niveau de compaction de la chromatine. Ensuite, la répétition des nucléosomes constituera la fibre chromatinienne (de 30nm de diamètre), qui représente le niveau le plus élevé de compaction.

Dans le spermatozoïde, le remodelage de la chromatine coïncide avec la formation de la manchette à la base du noyau et la mise en forme du noyau des spermatides au milieu de la spermiogénèse. La compaction de la chromatine du spermatozoïde est nécessaire pour réduire considérablement le volume nucléaire, afin de ne pas entraver la motilité des spermatozoïdes, mais également pour protéger le génome paternel des dommages lors de sa progression dans le tractus génital masculin puis féminin. Au cours de la spermiogénèse, le noyau de la spermatide ronde se polarise d'un côté de la cellule puis commence à s'écarter de la forme asphérique au fur et à mesure que la condensation nucléaire et que la formation de la tête des spermatozoïdes commence. Cette réorganisation chromatinienne (étape 12-13 de la spermiogénèse) s'articule en plusieurs temps (**figure 24**) :

- Dans un premier temps, la structure de la chromatine s'ouvre à la suite de modifications épigénétiques comme la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination de certains résidus d'histones et notamment les résidus de lysine.
- Cette ouverture chromatiniennne va permettre, dans un second temps, le remplacement des octamères d'histones canoniques par des variants d'histones spécifiques du testicule (Gaucher *et al.*, 2010), tels que les variants de l'histone de liaison H1 : H1T (*testicular H1 histone variant*), H1T2 (ou HANP1, *haploid germ cell-specific nuclear protein 1*) et HILS1 (*spermatid specific linker histone H1-like protein*), spécifiques des spermatocytes et/ou spermatides. L'incorporation de ces variants, moins stables que les histones canoniques, va déstabiliser les nucléosomes.
- Cette déstabilisation va permettre, dans un troisième temps, le remplacement de plus de 90% des variants d'histones par des protéines de transition comme TP1 et TP2 (Zhao *et al.*, 2004). En plus de constituer un intermédiaire pour le remplacement des histones par les protamines, ces protéines de transition participent à la réparation des CDBs de l'ADN, qui ont lieu durant le processus de compaction de la chromatine (Boissonneault, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Montellier *et al.*, 2013). Le remplacement des histones par des protéines de transition est contrôlé par une hyperacétylation globale de la chromatine, via la protéine BRDT (*BRomoDomaine Testis-specific*) (Gaucher *et al.*, 2012; Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Cette dernière joue un double rôle au cours de la spermatogénèse. BRDT contrôle l'expression de nombreux gènes pendant la phase méiotique, et est essentielle pour l'organisation de l'ADN spermatique (Berkovits and Wolgemuth, 2013).
- Les protéines de transition sont ensuite remplacées par des protéines plus basiques, riches en arginine et cystéine, appelées protamines. Il existe deux protamines chez l'homme et la souris : PRM1 et PRM2 (Cho *et al.*, 2001). PRM1 et PRM2 sont indispensables pour assurer une compaction correcte de la chromatine des spermatozoïdes. Cela a été démontré dans les spermatozoïdes des souris *Prm1*^{-/-} ou *Prm2*^{-/-} qui présentent des anomalies morphologiques

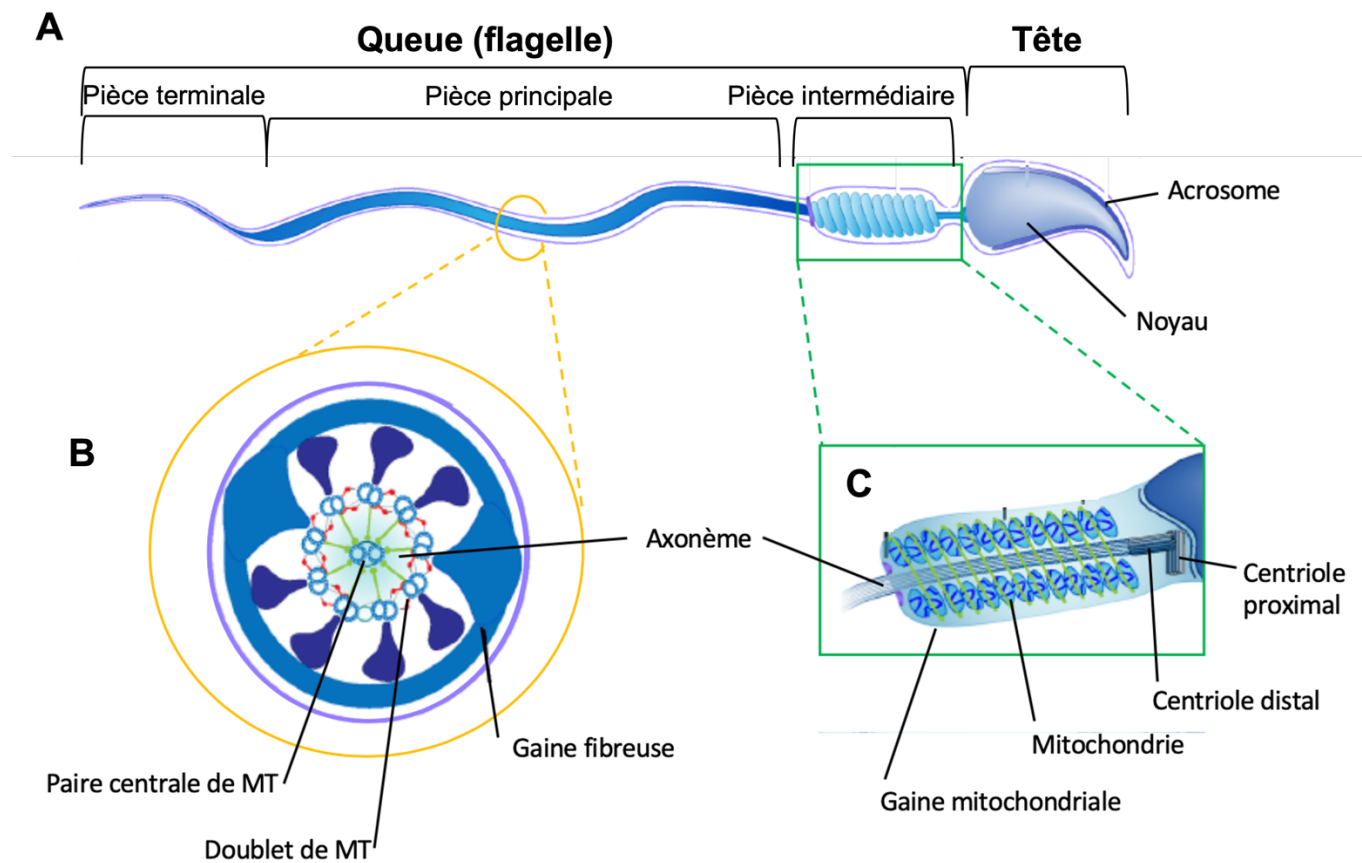


Figure 25 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de souris.

(A) Le spermatozoïde est composé de deux régions principales, la tête et le flagelle. La partie antérieure de la tête est recouverte par la calotte acrosomique et la tête est reliée au flagelle par la pièce de connexion. Le flagelle est divisé en trois régions : la pièce intermédiaire ; pièce principale ; et la pièce terminale. **(B)** L'axonème constitue l'élément principal du flagelle du spermatozoïde. Il est composé d'une paire de centriole de microtubule (MT) entouré de 9 doublets de MT (cercles bleu clair) assemblés par des bras de Dynéines et des liens de Nexine (rouge). **(C)** La pièce intermédiaire comprend une gaine mitochondriale composée de mitochondries assemblées sous une forme hélicoïdale autour de l'axonème.

(Adaptée de Dunleavy *et al.*, 2019)

et des anomalies de condensation de la chromatine (Cho *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2016). Il faut noter que la compaction de la chromatine dépend non seulement des variants d'histone, des protéines de transition et des protamines, mais aussi du bon déroulement de la spermiogénèse. Par exemple si le processus de biogenèse de l'acrosome est défectueux, une mauvaise compaction de l'ADN sera systématiquement associée (De Vries *et al.*, 2012).

Parallèlement à la condensation chromatinienne, les spermatides allongées cessent la transcription génique active au fur et à mesure que les nucléosomes disparaissent et que la chromatine est remodelée et compactée (Kierszenbaum and Tres, 1978). Une synthèse protéique reste cependant active grâce à l'accumulation d'ARN messagers, dès le stade pachytène, au niveau des corps chromatoïdes. Ces ARNm ont une demi-vie importante (environ 15 jours chez la souris) et sont donc traduits au cours de la spermiogénèse (Stern *et al.*, 1983). L'inactivation transcriptionnelle dans le noyau des spermatozoïdes est réversible suite à la fécondation de l'ovocyte.

C. Développement du flagelle

Le flagelle est l'unité fonctionnelle du spermatozoïde et est responsable de sa mobilité, notamment pour lui permettre d'atteindre l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Ce flagelle est composé de trois parties (**figure 25**) :

- la pièce intermédiaire, composée de trois structures : la gaine mitochondriale (qui produit une partie non négligeable de l'énergie nécessaire au battement flagellaire), l'axonème, et un ensemble de faisceaux de fibres denses,
- la pièce principale,
- et la pièce terminale située au niveau de l'extrémité distale du flagelle, et composée uniquement par l'axonème (Inaba, 2003).

La formation du flagelle est initiée au début de la spermiogénèse, et se poursuit par son élongation aux étapes 8 à 14 de la spermiogénèse de la souris.

Après la fin de la méiose, les premières spermatides rondes commencent à assembler le composant central des flagelles, connu sous le nom d'axonème. L'axonème (ou filament axial) se compose d'une paire centrale de microtubules entourés de 9 doublets externes de microtubules (arrangement dit en « 9C2 »). Chaque doublet est relié à son voisin par un bras de nexine et présente des bras de dynéines sur les doublets externes. Ceux-ci contiennent des ATPases libérant de l'énergie nécessaire aux mouvements de forme d'onde du flagelle. L'intégrité des bras de dynéine est indispensable à la motilité du flagelle. Chez les mammifères, la protéine Tektin-t assure la formation de ces bras de dynéine dans le flagelle en formant les protofilaments de tubuline α et β localisés dans les axonèmes. Les souris mâles *Tektin-t^{-/-}* sont infertiles et présentent des spermatozoïdes avec une motilité altérée ainsi qu'une formation des bras de dynéines défectueuse (Tanaka *et al.*, 2004).

L'acrosome commence à se former sur un pôle du noyau, et la paire de centrioles de la cellule germinale mâle se déplace vers le pôle opposé pour initier la formation de l'axonème. Le centriole proximal (dit fille) se lie à la membrane nucléaire grâce à la protéine SUN5 (*Sad1 And UNC84 Domain Containing 5*) (Shang *et al.*, 2017). Le centriole distal (dit mère) va permettre l'assemblage de l'axonème et va s'étendre progressivement dans le cytoplasme. L'axonème est la seule structure présente sur toute la longueur du flagelle du spermatozoïde.

Après l'initiation de la formation des axonèmes au début de la spermiogénèse, les structures secondaires nécessaires à la fonction des flagelles sont assemblées pendant la phase d'élongation de la spermiogénèse. Ces structures, spécifiques aux spermatozoïdes, comprennent la gaine mitochondriale, les fibres denses externes et la gaine fibreuse.

Enfin, une structure nommée « manchette » se met en place au niveau de la base du noyau aux étapes 7 à 14 (Kierszenbaum and Tres, 2004). L'organisation des microtubules de la manchette et du flagelle est nécessaire pour assurer la liaison de la tête avec le reste du spermatozoïde. Ces microtubules entourent également le noyau et lui donne sa forme caractéristique. Plusieurs protéines sont impliquées dans la

connexion de la manchette et du flagelle au niveau de la tête des spermatozoïdes, dont la protéine HOOK1 (*Hook Microtubule Tethering Protein 1*) (Mendoza-Lujambio *et al.*, 2002). Cette connexion est perturbée en cas de mutation de *Hook1*, ce qui entraîne un positionnement anormal des microtubules et des anomalies de la tête des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes présentant des morphologies flagellaires telles que des flagelles absents, courts, courbés ou enroulés sont responsables d'une infertilité chez l'homme (Touré *et al.*, 2021; Lehti and Sironen, 2017).

L'extension de l'axonème et l'assemblage des structures secondaires du spermatozoïde reposent sur des voies de trafic médiées par des protéines et des vésicules. En effet, le transport intraflagellaire (IFT), retrouvé aussi dans les cils primaires, permet le transport des éléments structuraux de l'axonème pour permettre son élongation. Ainsi des molécules appelées « cargos » du corps basal sont transportés le long de l'axonème en développement (antérograde) et inversement (rétrograde) via les protéines motrices associées aux microtubules, les kinésines et la dynéine. Le manque de transport de protéines vers l'axonème entraîne l'absence de formation du flagelle et des anomalies d'assemblage des microtubules de la paire centrale, ce qui provoque une instabilité de l'axonème et des flagelles courtes ou absentes.

La deuxième voie est spécifique au développement du spermatozoïde et est appelée voie de transport intra-manchette (IMT). Cette voie implique la livraison de protéines dérivées de Golgi destinées aux flagelles en développement.

Au dernier stade, le stade 16, la queue des spermatozoïdes est mature, la manchette disparaît et les structures secondaires se sont organisées autour de l'axonème. De plus, pendant ce stade, l'excédent de cytoplasme est enlevé par les complexes tubulo-bulbaires (protrusions cytoplasmiques de la tête de la spermatide dans des invaginations de la cellule de Sertoli, alignées avec des filaments d'actine-F). Cet ensemble permet la rétention du cytoplasme et la formation du corps résiduels relâchés au cours de la phase suivante : la spermiation.

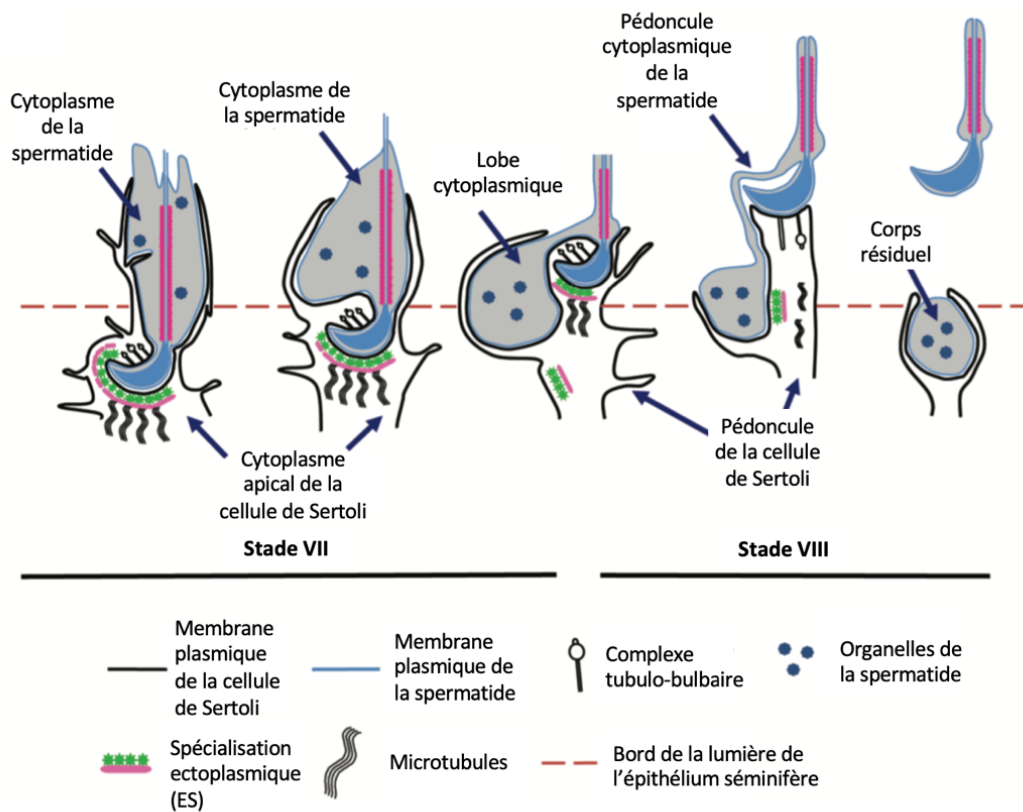


Figure 26 : Processus de la spermiation.

(Modifiée de O'Donnell *et al.*, 2011)

D. Spermiation

La spermiation est le processus par lequel les spermatides allongées matures subissent leur remodelage final puis sont libérées de l'épithélium séminifère dans la lumière du tubule. La spermiation se produit aux stades spermatogéniques VII-VIII chez la souris et le rat, et stade II chez l'homme. Elle est initiée lorsque les spermatides allongées sont situées vers le bord luminal de l'épithélium (au début du stade VII chez les rongeurs). Au cours des étapes précédentes, la spermatide en différenciation est nourrie et protégée par la cellule de Sertoli. Cette cellule somatique établit un contact étroit avec la cellule germinale en maturation, et l'entoure d'une structure de maintien complexe et unique nommée la spécialisation ectoplasmique (ES) (potentiellement impliquée dans la morphogenèse de la tête des spermatozoïdes). Lors de l'initiation de la spermiation, le flagelle des spermatides contient un cytoplasme abondant. Ces spermatides sont enveloppées dans les projections du pôle apical des cellules de Sertoli (**figure 26**). La masse cytoplasmique des spermatides progresse au cours de la spermiogénèse jusqu'à être en contact avec la tête spermatique au stade VIII. Les complexes tubulo-bulbaires (TBC) présents sur la tête des spermatides, aux endroits dépourvus de spécialisations ectoplasmiques (ES), participent à la réduction cytoplasmique grâce aux filaments d'actine-F et à la protéine CAPZA3 (*Capping Actin Protein Of Muscle Z Line Subunit Alpha 3*) ; Geyer *et al.*, 2009). Le pédoncule de la cellule de Sertoli pousse les spermatides vers la lumière du tube séminifère. Le cytoplasme des spermatides se condense et reste dans l'épithélium séminifère. Au cours de la progression du stade VII vers le stade VIII, les ES à proximité de la tête de la spermatide disparaissent. Les TBC sont alors visibles au niveau de la face dorsale au stade VIII. Le désengagement de la tête de la spermatide de la cellule de Sertoli marque la fin de la spermiation. Le cytoplasme capturé au niveau de la cellule de Sertoli est appelé le corps résiduel et est phagocyté par les cellules de Sertoli.

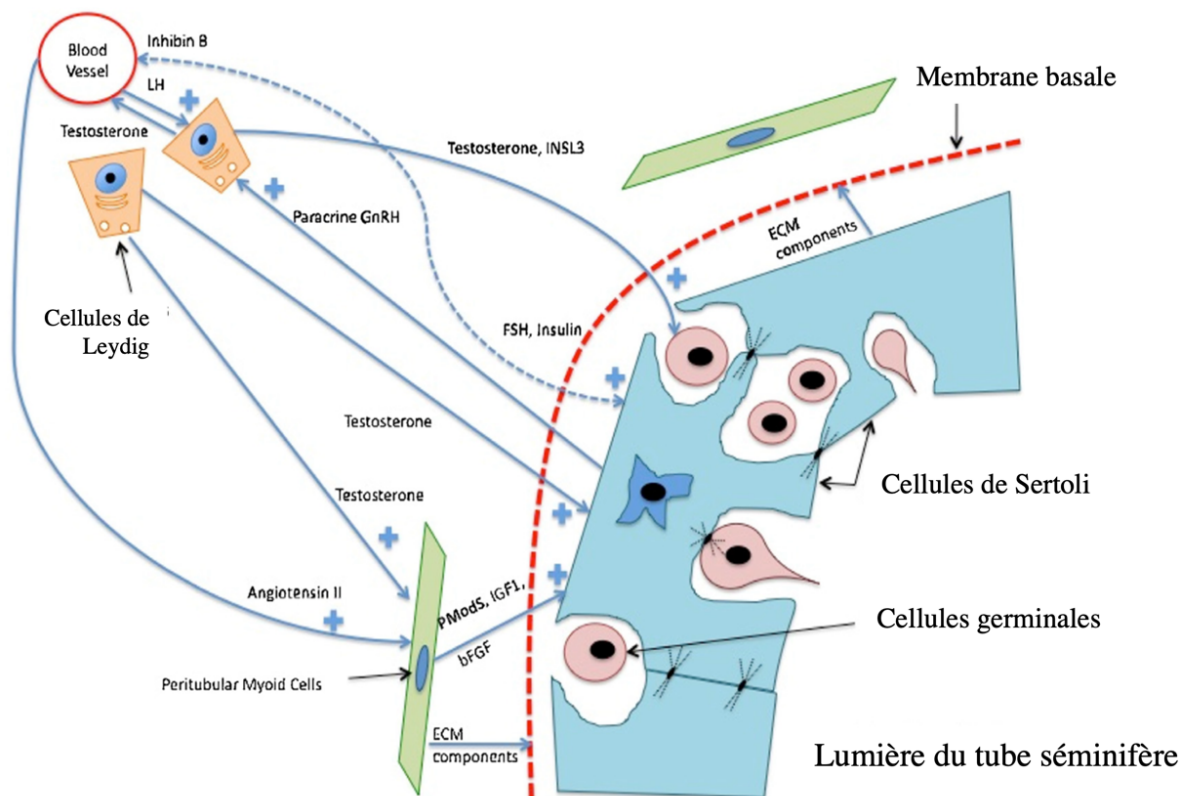


Figure 27 : Contrôle hormonal et paracrine de la spermatogénèse
 (Adaptée de Neto *et al.*, 2016)

Ces processus sont accomplis par la « machinerie de spermiation », les différentes structures au sein de la cellule de Sertoli et par des contacts entre la spermatide et la cellule de Sertoli. L'ensemble contribue à une spermiation réussie et est essentiel à la fertilité des individus mâles. Les cellules germinales ainsi libérés dans la lumière des tubes séminifères sont des spermatozoïdes, ils ne sont pas matures. Ils n'ont pas encore acquis toutes leurs motilités. En effet, leurs mitochondries ne sont pas encore aptes à permettre des déplacements de leur flagelle. De plus, ces spermatozoïdes ne sont pas capables de féconder un ovule. Leur pouvoir fécondant sera acquis lors de la maturation épидидymaire et lors de la capacitation dans les voies génitales femelles, processus non abordé dans ce rapport.

IV. Régulation de la spermatogenèse

A. Régulation hormonale

La spermatogenèse nécessite la participation de plusieurs types cellulaires, de facteurs endocrines, paracrines et juxtacrines, de régulations géniques et des régulateurs épигénétiques.

Pendant la période fœtale, nous avons vu précédemment que la mise en place du sexe phénotypique XY dépend de la présence d'hormones testiculaires, à savoir la testostérone et l'AMH.

La spermatogenèse est, en fonction de l'âge de l'individu, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (**figure 27**). Pendant la vie fœtale, le développement des pro-spermatogonies n'est pas sous le contrôle de l'axe puisque la formation et la maturation de l'hypophyse a lieu plus tard. De plus, les cellules de Leydig fœtales produisent des androgènes après la formation du testicule soit vers 13 jpc chez la souris (O'Shaughnessy *et al.*, 2006b). Après la naissance, et notamment chez

les souris, il a été montré que la prolifération post-natale des spermatogonies et leur survie dépendent d'un contrôle hormonal (Baker and O'Shaughnessy, 2001).

L'hypophyse secrète deux hormones : la LH (*Luteinizing Hormone*) et la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) sous l'action stimulatrice de l'hypothalamus via la GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*). Les gonadotrophines LH et FSH sont nécessaires à l'initiation et au maintien d'une spermatogenèse quantitativement normale.

La LH cible les cellules de Leydig adultes, et par l'intermédiaire de ses récepteurs (LHR), stimule la biosynthèse des androgènes. Chez la souris, les androgènes, et la FSH, semblent jouer un rôle important dans la maintenance de la fonction des cellules de Leydig (O'Shaughnessy *et al.*, 2006b). Des études ont mis en évidence que les cellules de Leydig répondaient *in vivo* à la FSH (Abel *et al.*, 2009) alors que ces cellules n'expriment pas de récepteur à la FSH (FSHR). Seules les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs FSHR, on peut donc supposer une régulation endogène, via les cellules de Sertoli.

Les synthèses des androgènes par les cellules de Leydig (la testostérone et ses métabolites androgènes) agissent sur les récepteurs de l'épithélium séminifère, donc des cellules de Sertoli, pour stimuler et soutenir les cellules germinales. Comme ces cellules ne possèdent pas de récepteurs pour la testostérone, les cellules de Sertoli et les cellules péri-tubulaires vont produire et sécréter, sous l'action de la FSH, l'ABP (*androgen-binding protein*), une protéine de liaison aux androgènes (notamment à forte affinité pour la Testostérone). Cette sécrétion d'ABP va permettre de maintenir et de concentrer la testostérone dans les tubes séminifères (Heinlein and Chang, 2002; Hansson *et al.*, 1976). La production de testostérone est une exigence absolue également pour le développement des caractères sexuels secondaires masculins, et sa synthèse augmente considérablement à la puberté. La testostérone est nécessaire pour l'initiation, le maintien et la restauration de la spermatogenèse (revue (Ruwanpura *et al.*, 2010)).

La FSH cible donc directement les récepteurs des cellules de Sertoli pour soutenir la spermatogenèse. Ces cellules de Sertoli produisent aussi, sous l'action de la FSH, une

hormone peptidique, l'activine A, qui pourrait stimuler directement la production de FSH (de Winter *et al.*, 1993; Meehan *et al.*, 2000). Il existe également des preuves que l'action de la FSH est importante pour la croissance, l'activité et la survie des cellules de Leydig (Chen *et al.*, 1976; van Beurden *et al.*, 1976; Kerr and Sharpe, 1985; Vihko *et al.*, 1991).

La synthèse des androgènes et, par extension, la production de spermatozoïdes sont également contrôlées par une boucle de rétroaction impliquant les testicules, l'hypothalamus et l'hypophyse. L'hypophyse contrôle la fonction testiculaire en produisant des gonadotrophines, à savoir la FSH et la LH. La production hypophysaire de ces hormones, à son tour, dépend de la sécrétion de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) par l'hypothalamus. Des niveaux élevés de GnRH initient la puberté. Le contrôle de la libération des gonadotrophines implique un rétrocontrôle négatif. En effet, les cellules de Sertoli produisent également, sous contrôle de la FSH, une glycoprotéine, l'inhibine B, (de Kretser *et al.*, 2004). Cette molécule inhibe la sécrétion de FSH (et également de l'ABP, qui concentre la testostérone). De plus, la testostérone, produite par les cellules de Leydig sous contrôle de la LH, va en retour inhiber la sécrétion de LH hypophysaire.

La spermatogenèse repose également sur la production locale de facteurs de croissance, de molécules de signalisation et d'autres mécanismes intrinsèques. On trouve notamment les facteurs de croissance sécrétés par les cellules testiculaires, tels que TGF alpha et beta (*testicular growth factors alpha and beta*), EGF (*epidermal growth factor*), FGF2 (*fibroblast growth factor 2*), IL1A (*interleukin 1 alpha*), IGF1 et IGFII (*insulin growth factor*), GDNF, et GH (*growth hormone*) (Niederberger *et al.*, 1993 ; Gao and Lui, 2013 ; Loveland *et al.*, 2007 ; Sofikitis *et al.*, 2008 ; Chen and Liu, 2015 ; Dimitriadis *et al.*, 2015).

La spermatogenèse est donc sous la dépendance de multiples voies hormonales et paracrines. Une des cellules centrales dans la régulation de la spermatogenèse est la cellule de Sertoli, étant en relation avec quasiment tous les autres types cellulaires du

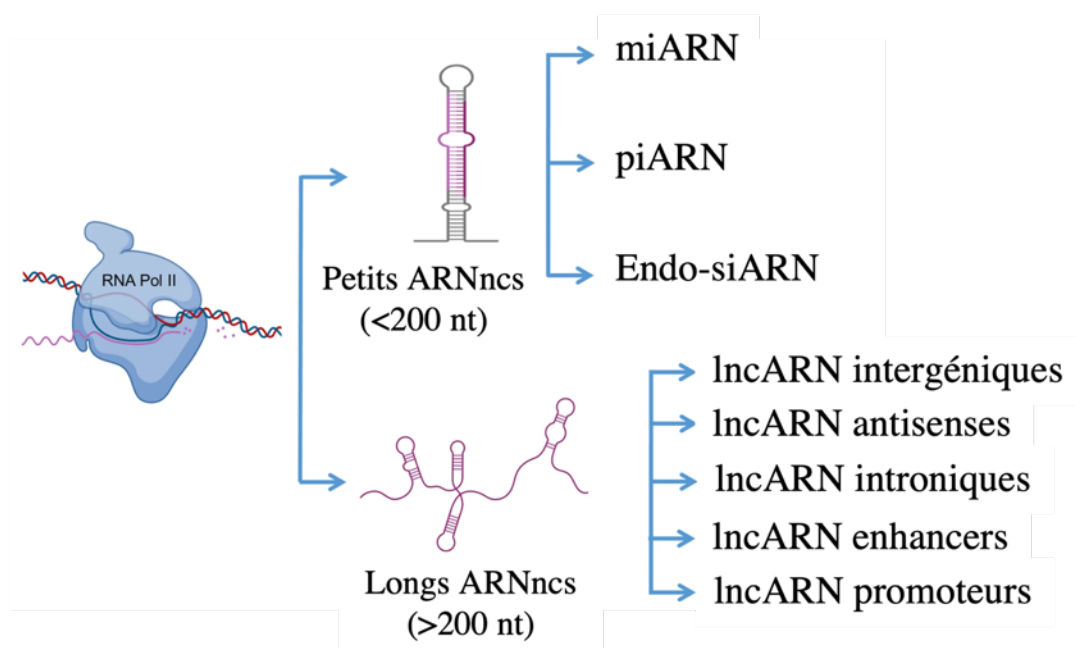


Figure 28 : Classification des ARNnc.
 (Adaptée de Joshi and Rajender, 2020)

testicule. C'est pourquoi cette cellule a été appelé le chef d'orchestre de la spermatogenèse (Dimitriadis *et al.*, 2015 ; Mikuz, 2019).

B. Régulation épigénétique de la différenciation des cellules germinales

1. Les ARNs non codants (ARNnc)

Selon le dogme central de la biologie moléculaire, l'ADN génomique est transcrit en ARNm qui est ensuite traduit en protéine. Avec le développement technologique du séquençage (et depuis le séquençage complet du génome humain), il a été découvert que la majorité du génome chez l'Homme est transcrit et dépasse les annotations génétiques actuelles qui ne comporte qu'environ 25 000 gènes codants. La majorité des transcrits ne seront donc jamais traduits en protéines : ce sont des ARN non-codants (ARNnc). Les ARNnc sont présents chez une grande diversité d'organismes, notamment les procaryotes, les eucaryotes, les plantes, les champignons, les animaux et les hommes (Zhang *et al.*, 2016).

En fonction de leurs taille, les ARNncs ont été divisés en deux catégories principales (**figure 28**):

- Les petits ARNnc avec une taille comprise entre 18 et 200 nucléotides,
- les longs ARNs non-codant (lncARN) de une taille supérieure à 200 nucléotides.

Ces deux groupes principaux sont subdivisés en sous-groupes (**figure 28**). Les longs ARNs non-codant ne seront pas décrits dans ce rapport.

Parmi les petits ARNnc, on trouve les ARNs régulateurs et les ARNs de ménage ou structurels. Les ARNs structurels jouent des rôles dans des processus essentiels comme l'épissage et la traduction. Ils comprennent : les ARNs ribosomiaux (ARNr), les ARNs de transfert (ARNt), les petits ARNs nucléaires (*snRNA pour small nuclear RNA*) et les petits

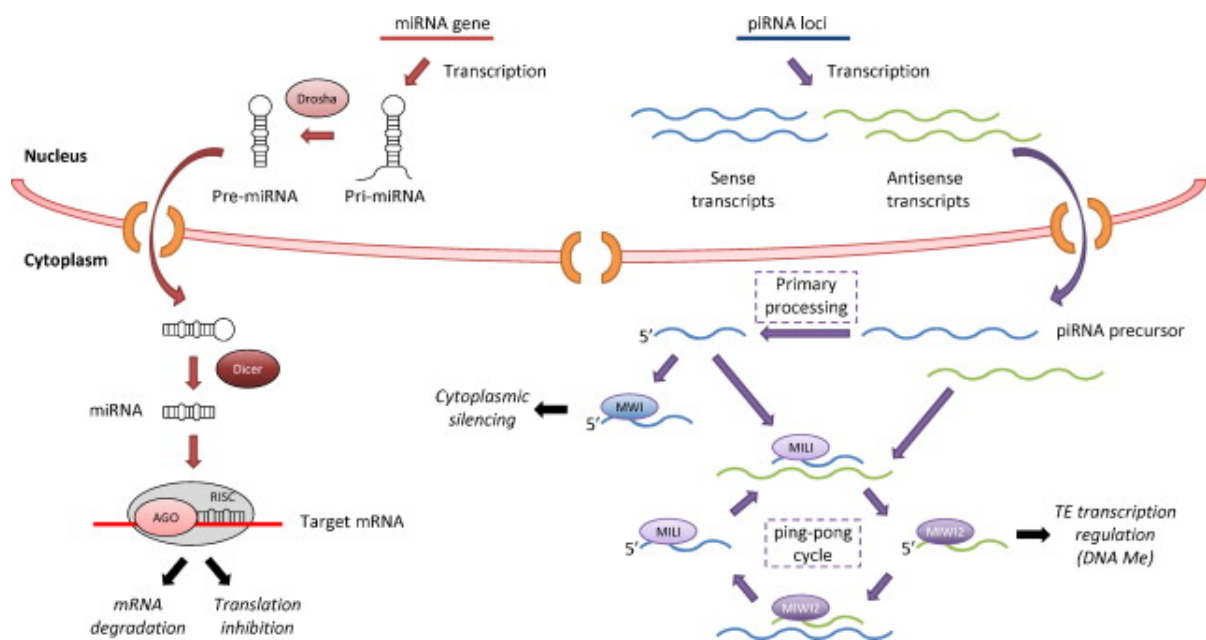


Figure 29 : Biogenèse des miARN et piARN.

À gauche : Les gènes codant pour les miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARN Pol II). L'ARN synthétisé, pri-miARN (précurseur primaire des miARNs), possède une structure en épingle à cheveux. Le pri-miARN est pris en charge et clivé par l'ARN Pol III (Drosha) et devient un pré-miARN (précurseur des miARN). Les pré-miARNs sont exportés du noyau. L'ensemble se dissocie dans le cytoplasme et le pré-miARN est pris en charge et clivé par Dicer avant d'être relâché sous forme de duplex de miARNs. Le complexe RISC (composé de la protéine AGO) prend en charge les duplex de miARNs et dégrade le brin passager. Le miARN est alors mature.

À droite : La biogenèse des piARN se fait par deux mécanismes : la voie de traitement primaire des piARN et la voie d'amplification dite "ping-pong". Tout d'abord, les longs précurseurs d'ARN sont transcrits dans le noyau et exportés dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, les précurseurs de piARN sont ensuite maturés pour générer des piARN matures qui s'associent avec les protéines Piwi.

(Adaptée de de Mateo and Sassone-Corsi, 2014)

ARNs nucléolaires (*snoRNAs pour small nucleolar RNAs*). Ces ARNs ne seront pas décrits dans ce rapport. Les ARNs régulateurs sont impliqués dans la régulation de l'expression génique dans des processus physiologiques essentiels, mais peuvent être retrouvés dans des processus pathologiques également. Cette catégorie d'ARNnc comprend : les microARNs (miARNs), les ARNs interagissant avec les PIWI (*P-element induced wimpy testis in Drosophila*) (piARNs) et les petits ARN interférents endogènes endo-siARNs (Endogenous short interfering RNAs).

En reproduction, il est acquis que les piRNA et miRNA ont un rôle important lors de la différenciation de la lignée germinale (Garcia *et al.*, 2011; Girard *et al.*, 2006) et dans la spermatogenèse (Chen *et al.*, 2017; Yadav and Kotaja, 2014). Je ne parlerai donc dans ce rapport que de ces petits ARNs non-codants. La biogenèse des miARNs et pi-ARNs est différente, ce sont des processus complexes détaillés dans la **figure 29**. Brièvement, les miRNAs sont maturés à partir de structures en épingle à cheveux et sont dépendants de Dicer; les piRNAs sont issus de longs précurseurs d'ARN simple-brin et leur synthèse est indépendante de Dicer (Vagin *et al.*, 2006). La biogenèse de ces piARNs suit deux voies: la voie de synthèse primaire des piARNs et une voie d'amplification permettant d'accroître le nombre de ces petits ARNs ciblant les rétrotransposons (Czech *et al.*, 2018).

La spermatogenèse postnatale est caractérisée par des réarrangements drastiques de la chromatine au cours de la recombinaison méiotique, de l'inactivation des chromosomes sexuels et de la compaction des noyaux des spermatozoïdes, qui est accomplie en remplaçant presque toutes les histones par des protamines spécifiques aux spermatozoïdes (vu précédemment). Les petits ARNs, y compris les miARN, les petits ARN interférents endogènes (endo-siARN) et les piARN sont également impliqués dans le contrôle de la production de gamètes mâles.

a. Les miARNs

Les miARNs, très conservés dans les cellules eucaryotes, ont une taille comprise entre 18 et 25 nucléotides. Le rôle essentiel de ces petits ARNs lors du développement et la différenciation des cellules germinales a été mis en évidence par l'invalidation de la machinerie de production des miARNs. Chez la souris, la suppression conditionnelle de *Dicer*, spécifiquement dans les cellules germinales à partir de 10 *jpc*, entraîne une diminution du nombre de CGP dans les gonades mâles à 13,5 *jpc* par rapport au WT (Hayashi *et al.*, 2008). Par conséquent, ces souris deviennent infertiles à l'âge adulte. Seuls quelques tubes séminifères des testicules mutants présentent des cellules germinales développés jusqu'au stade spermatides allongés ayant une morphologie et une motilité anormales (Hayashi *et al.*, 2008; Maatouk *et al.*, 2008). Ces résultats montrent l'implication de l'enzyme DICER, intervenant dans la production des miARNs mature, dans le bon déroulement de la spermatogenèse et la fertilité des individus.

De plus, il a été montré que la machinerie de production des miARNs est liée aux corps chromatoides qui se forment dans les spermatides rondes pendant la spermatogenèse (Kotaja *et al.*, 2006). Plus précisément, DICER interagit avec MVH (DDX4 (*DEAD-Box Helicase 4*), homologue de VASA) située dans les corps chromatoides (Kotaja *et al.*, 2006), ce qui appuie le rôle des miARNs dans la différenciation des spermatides rondes.

b. Les piARNs

Les piARNs, autre classe de petits ARNnc, ont une taille comprise entre 26 et 31 nucléotides et sont très conservés. Ils interagissent avec les protéines PIWI de la lignée germinale (détaillés plus tard). Les piARN sont très abondants dans les testicules des mammifères (centaines de milliers) (Aravin *et al.*, 2007).

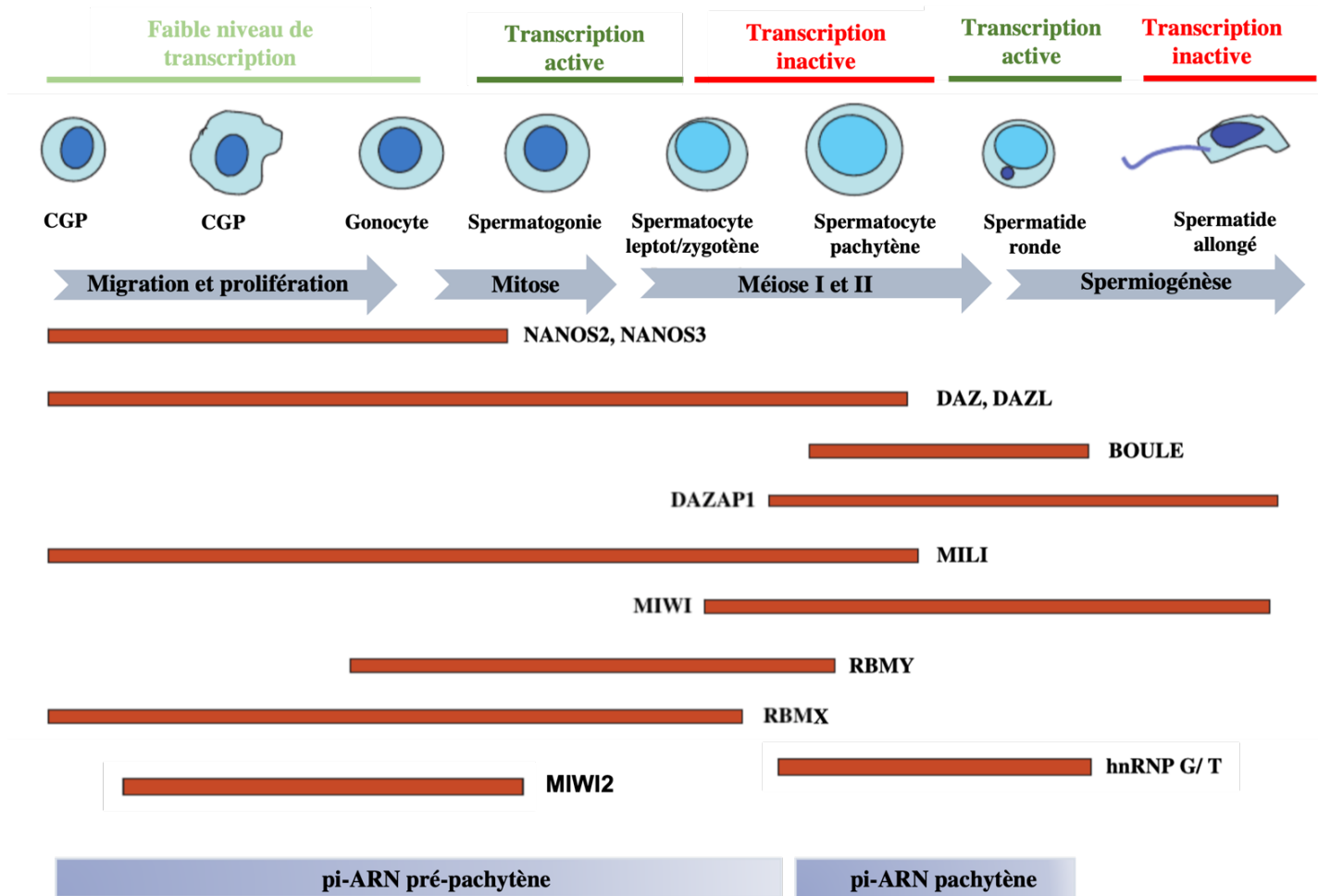


Figure 30 : Régulation épigénétique par les petits ARNs des différentes étapes de la spermatogénèse. (Modifiée de Paronetto and Sette, 2010)

Une analyse minutieuse des piARNs a révélé au moins deux classes distinctes de piARNs dans les testicules de mammifères selon le stade de développement de la cellule germinale : les piARNs dit pré-pachytène fœtaux/prénataux et les piARNs pré-pachytènes/pachytène (Meikar *et al.*, 2011) (**figure 25**). Bien que similaires au niveau moléculaire, ils ont des fonctions et des mécanismes d'action différents. Les piARNs s'associent aux différentes protéines PIWI afin de contrôler les rétrotransposons (détaillés plus tard) au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel au cours du développement de la lignée germinale.

1. Rôle des protéines de liaison à l'ARN (RBP) dans la spermatogénèse

Le processus complexe de différenciation des cellules germinales mâles nécessite des protéines spécifiques. Les cellules germinales testiculaires expriment des gènes spécifiques, en particulier dans la prophase méiotique et le stade précoce de la spermatide ronde. De plus, les cellules germinales codent également pour des isoformes spécifiques de plusieurs gènes grâce à l'utilisation de promoteurs alternatifs, d'événements d'épissage alternatif ou de sites de polyadénylation (Kleene, 2001). Une couche supplémentaire de complexité est ajoutée par les deux vagues d'inactivation de la transcription à deux stades de la spermatogénèse (**figure 25**) : pendant la recombinaison homologe dans les spermatocytes I, et pendant les étapes tardives de la spermiogénèse, lorsque les chromosomes sont fortement compactés par la substitution d'histones par des protéines de transition et des protamines (vu précédemment). Pour compenser l'absence de synthèse d'ARNm *de novo* au cours de ces phases de la spermatogénèse, les spermatocytes précoces et les spermatides rondes, transcriptionnellement actives, stockent les ARNm dans des particules ribonucléoprotéiques (RNP). Ces RNP protègent les ARNm jusqu'à ce que leur traduction soit requise (Geremia *et al.*, 1977; Kleene, 2001). Plus de 700 ARNm sont régulés dans les testicules en développement (Iguchi *et al.*, 2006a), et de nombreuses

protéines de liaison à l'ARN (RBP pour RNA binding protein) sont fortement ou exclusivement exprimées dans les cellules germinales mâles (Venables and Eperon, 1999; Paronetto and Sette, 2010). Ceci suggère ainsi le rôle central de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes au cours de la différenciation de ces cellules germinales. Comme de nombreux modèles de souris mutantes pour des gènes codants ces RBP sont infertiles (Venables and Cooke, 2000), il est supposé que ces protéines jouent un rôle essentiel au cours de la spermatogenèse. Les principales RBP impliquées dans la spermatogenèse des mammifères incluent les familles NANOS, PIWI, RBM, STAR, DAZ, TIA-1/TIAR, et d'autres protéines individuelles n'appartient pas à une famille connue. Dans ce rapport, je m'attacherai à décrire plus spécifiquement les familles RBM et PIWI (**figure 30**).

a. La famille RBM

Les gènes *RBMX* et *RBMX*, situés sur les chromosomes sexuels, codent pour des protéines de liaison à l'ARN impliquées dans le contrôle de l'épissage. Ces gènes se sont différenciés et ont évolué séparément sur les chromosomes X et Y.

Alors que les gènes *RBMX* (*RNA Binding Motif protein, lié à l'X*) sont exprimés de manière ubiquitaire, les gènes *RBMX* (*RNA Binding Motif protein, lié à l'Y*) sont spécifiquement exprimés dans les cellules germinales. *RBMX* a acquis une fonction spécifique et a été le premier gène du chromosome Y humain identifié pour être lié à une infertilité mâle. La famille de gènes *RBMX* est composée d'environ 30 copies sur le chromosome Y mais peu sont fonctionnels (Ma *et al.*, 1993; Elliott *et al.*, 1997).

La protéine *RBMX*, initialement appelée hnRNP G (*ribonucléoprotéine G nucléaire hétérogène*) a été identifiée à l'origine comme faisant partie d'un groupe de protéines nucléaires liant des ARNs polyadénylés, appelé hnRNP (*ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes*) (Geuens *et al.*, 2016). Les gènes *RBMX* et *RBMX* sont transcriptionnellement inactivés au sein du XY-body lors du MSCI (Wang, 2004), et le contrôle de l'épissage pourrait ne plus être exercé.

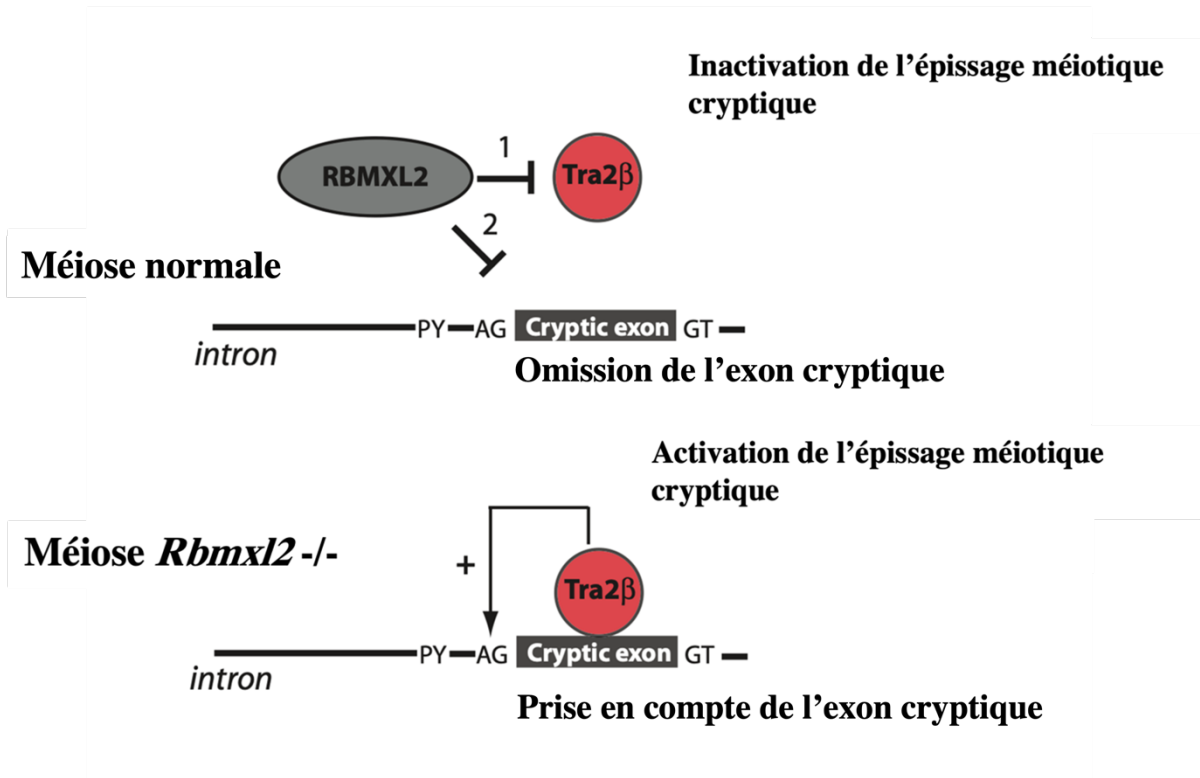


Figure 31 : Modèle du mode de fonctionnement de la protéine RBMXL2 au cours de la méiose murine.

(Adaptée de Ehrmann *et al.*, 2019)

Or, les duplications des gènes *RBMX* ont créé une petite famille de rétrogènes *RBMXL*. Dans cette famille, *RBMXL2* (*RBMX Like 2*) (aussi appelée HNRNPGT) est exprimée exclusivement dans les testicules, pendant la méiose mâle et immédiatement après, soit au moment où les gènes *RBMX* et *RBMY* sont inactivés (Ehrmann *et al.*, 2019).

Les protéines *RBMXL2*, *RBMX* et *RBMY* interagissent et modulent l'activité d'épissage de *Tra2β* (*Transformer 2 Beta Homolog*), un activateur de l'épissage pré-ARNm fortement exprimé dans les testicules (Cléry *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2012) suggérant un rôle dans le contrôle de l'épissage.

L'inactivation du gène *Rbmxl2* entraîne, chez la souris, un blocage complet de la méiose et une apoptose cellulaire après le stade diplotène (Ehrmann *et al.*, 2019). Ce phénotype d'infertilité est dû à un épissage aberrant des transcrits de gènes méiotiques clés comme *Meioc* (*meiosis specific gene with coiled coil domain*) (Abby *et al.*, 2016). L'analyse de souris KO pour *Rbmxl2* montre que la protéine *RBMXL2* est importante pour protéger le transcriptome méiotique de potentiels défauts d'épissage. L'apparition de sites cryptiques d'épissage serait fortement délétère pour l'expression des gènes (Marquez *et al.*, 2015; Sibley *et al.*, 2016).

Un modèle (**figure 31**) a été proposé sur le mode de fonctionnement de *RBMXL2* au cours de la méiose. Chez les souris normales, la protéine *RBMXL2* peut bloquer l'épissage d'exons cryptiques soit par (1) l'inhibition des protéines régulatrices d'épissage, comme la protéine *Tra2β* via des interactions protéine-protéine (Venables *et al.*, 2000) ; soit (2) en interagissant directement avec les séquences régulatrices d'épissage dans le pré-ARNm. Chez les souris *Rbmxl2*^{-/-}, *Tra2β* est dé-réprimée et active l'épissage méiotique cryptique. Cette étude montre donc que *RBMXL2* joue un rôle clé dans le contrôle du transcriptome méiotique. La perte ou une mutation délétère de *RBMXL2*, ou même de son paralogue *RBMY*, pourrait induire une infertilité masculine.

b. La famille PIWI

Les protéines PIWI, sous famille des protéines de la famille ARGONAUTE, sont exprimées dans les gonades mâles et s'associent avec les piARNs pour réprimer l'expression des séquences répétées (aussi appelées éléments transposables ou rétrotransposons) (Aravin *et al.*, 2006). Ces séquences répétées peuvent créer des mutations dans le génome et altérer son organisation ainsi que son fonctionnement. La voie des Piwi est conservée au cours de l'évolution et les interactions des piARNs avec les protéines PIWI jouent un rôle primordial dans les cellules germinales pour reconnaître et réprimer les éléments transposables (Grimson *et al.*, 2008).

Les protéines PIWI exprimées dans les cellules germinales murines incluent : MIWI (homologue humain : PIWIL1), MILI (PIWIL2) et MIWI2 (PIWIL4) (**figure 30**). Chez l'Homme (et plusieurs autres mammifères), une autre protéine est présente : PIWIL3. Chaque protéine PIWI est exprimée à des stades de développement différents dans les cellules germinales et se lie à des piARNs spécifiques. Chez les souris mâles :

- l'expression de *Mili* commence dans les pro-spermatogonies fœtales, au moment de la différenciation du sexe et de la réorganisation du niveau de méthylation de l'ADN (Aravin *et al.*, 2008). L'expression de *Mili* est présente jusqu'au stade spermatocytes précoces.
- *Miwi2* montre une expression plus restreinte, des spermatogonies jusqu'en périnatal (15,5 *jpc-3 jpp* chez la souris) soit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la méthylation de novo des CGPs (Carmell *et al.*, 2007).
- *Miwi* est exprimé le plus tardivement, avec une expression des spermatocytes en pachytène jusqu'aux spermatides rondes (Deng and Lin, 2002). Chez la souris, la protéine MIWI apparaît dès 14*jpp* au stade pachytène jusqu'aux spermatides rondes des stades V-VII de l'épithélium séminifère et abondantes en diplotène (Stade XI du cycle séminifère) (Deng and Lin, 2002).

Au stade de pro-spermatogonies, MILI (PIWIL2) et MIWI2 (PIWIL4) se lient aux piARN fœtaux, MILI préférentiellement aux piARNs sens des rétrotransposons, MIWI2 aux

piARNs antisenses (Aravin *et al.*, 2008; Carmell *et al.*, 2007; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Les piARNs pré-pachytènes post-nataux, aux caractéristiques semblables aux piARNs foëtaux, ne peuvent être liés qu'à MILI, seule protéine présente entre la naissance et la méiose. Pendant la méiose et notamment au stade pachytène (vers 14 *jpp* dans les cellules germinales mâles murines), les niveaux de piARNs pachytènes augmentent fortement, culminent dans les spermatides rondes haploïdes et disparaissent au cours des étapes tardives de la spermiogenèse. Ces piARNs dits pachytènes se lient avec les protéines MILI (PIWIL2) et MIWI (PIWIL1).

Ces différentes protéines PIWI sont nécessaires pour la spermatogenèse et la fertilité des souris mâles (Deng and Lin, 2002 ; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004; Carmell *et al.*, 2007). L'invalidation de *Mili* (*piwil2*) ou *Miwi2* (*piwil4*) entraîne un blocage des cellules germinales en prophase I méiotique, suggérant leur implication précoce durant la méiose des spermatocytes. Un blocage plus tardif de la spermatogenèse apparaît chez les souris invalidées pour *Miwi* (*piwil1*), avec un arrêt de maturation dans les spermatides rondes. Les phénotypes d'infertilité observés dans ces études en absence des protéines PIWI sont dues à l'activation des éléments transposables, qui entraînent une instabilité du génome et par conséquent un blocage méiotique des cellules germinales puis une perte de ces cellules.

Le rôle des protéines PIWI chez l'homme est moins connu. PIWIL1 est exprimé dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides allongés (Hempfling *et al.*, 2017). Dans la même étude, une réduction de l'expression de PIWIL1, PIWIL2 et PIWIL4 a été observée sur les biopsies testiculaires des hommes infertiles (Hempfling *et al.*, 2017). De plus, il a été observé une diminution significative de l'expression des transposons dans les biopsies testiculaires des hommes ayant une expression normale des protéines PIWIL2 et PIWIL4 en comparant avec des échantillons ne présentant pas une expression des protéines PIWI (Hempfling *et al.*, 2017). Une seconde étude a montré une association entre l'augmentation significative de l'expression de l'ARNm de PIWIL1

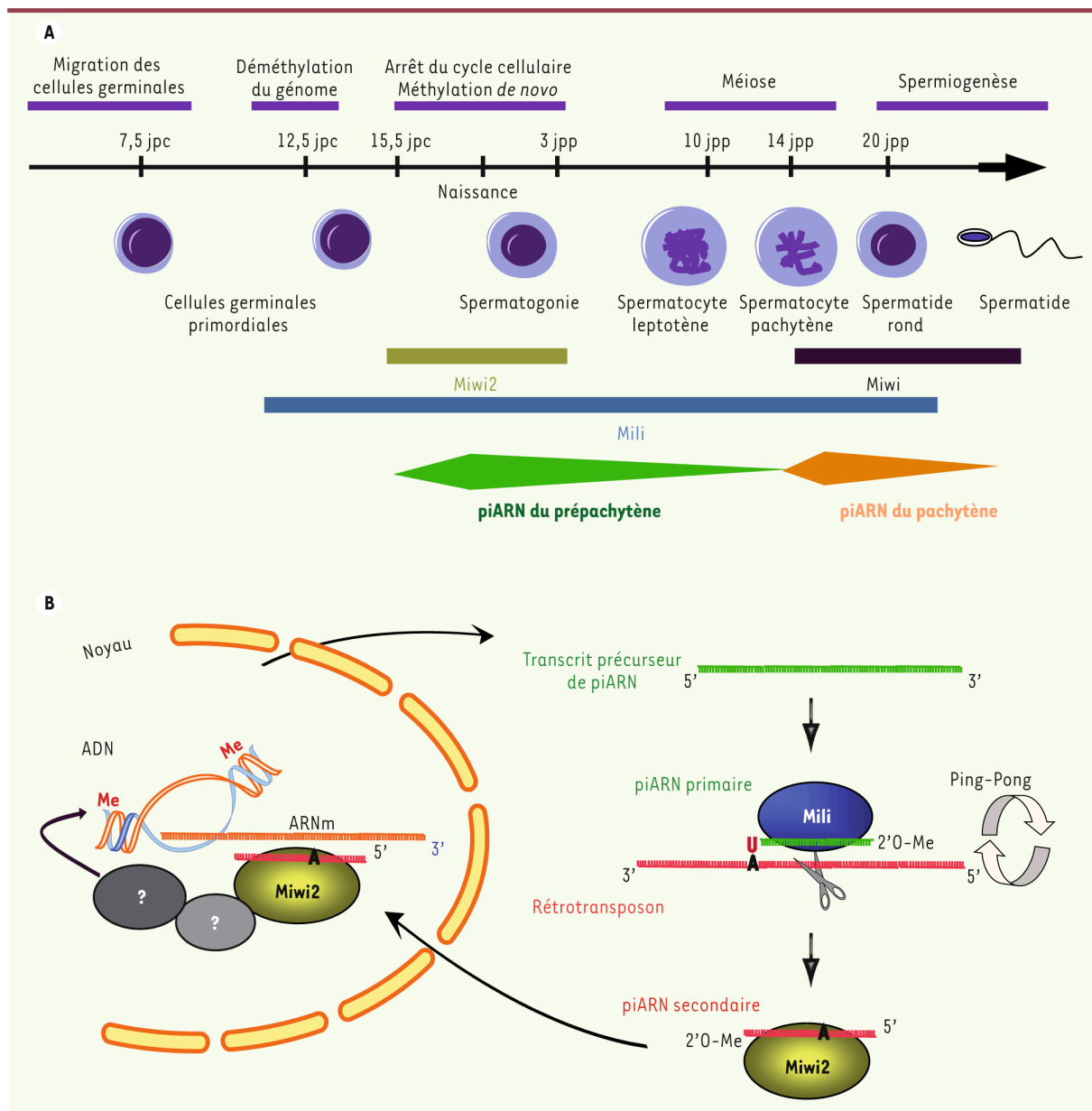


Figure 32: Biogenèse et fonction des piARNs pendant la spermatogenèse murine.

A : Chronologie d'expression des protéines PIWI et des piARN au cours de la spermatogenèse murine.

B : Une fois le transcrite précurseur de piARN est exporté du noyau, il génère des piARN primaires s'associant avec la protéine MILI. Cette dernière clive sa cible grâce à son activité endonucléase, pour donner naissance à un piARN secondaire. La production des piARNs secondaires peut-être amplifiée à la suite d'un cycle ping-pong. Le piARN secondaire associé à MIWI2 peut entrer dans le noyau et guider la méthylation de l'ADN des rétrotransposons en s'appariant à un transcrite en cours d'élongation.

(Adaptée de Muller *et al.*, 2013)

et la diminution de la mobilité progressive des spermatozoïdes, ainsi qu'entre la diminution de l'expression de l'ARNm de PIWIL2 et celle de la numération spermatique (Giebler *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que la voie piARN murine est conservée chez l'homme aussi. L'ubiquitination des histones et la transition histones-protamines ont été altérées, ce qui suggère que *PIWIL1* intervient dans les étapes tardives de la spermatogenèse chez l'homme comme chez la souris (Gou *et al.*, 2017).

Chez la souris, les ovocytes expriment les protéines PIWI mais des quantités mineures de piARNs ont été détectés (Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008). Cela suggère que les protéines PIWI ne sont pas indispensables pendant l'ovogenèse, du moins chez la souris. Dans les ovaires foetaux humaines, *PIWIL1*, 2 et 4 sont exprimés dans les ovocytes, mais *PIWIL3* est la seule protéine PIWI exprimée dans les ovocytes des follicules antraux adultes (Roovers *et al.*, 2015; Gomes Fernandes *et al.*, 2018). Cette expression est absente dans les testicules.

Les piARNs interagissent donc fortement avec les protéines PIWI, le complexe étant recruté sur les ARNm cibles (rétrotransposons) par complémentarité pour les réprimer (**figure 32**). Ces régulations par les piARNs ont été bien décrites chez différentes espèces, dont la drosophile, (Brennecke *et al.*, 2007) puis chez les mammifères, notamment les rongeurs.

Les piARNs dits pré-pachytènes sont formés à partir d'un transcrite précurseur, puis maturés en pré-piARNs. Ces intermédiaires vont se lier à MILI et sont maturés notamment avec un groupement 2'O-methyl en 3', protecteur du piARN (Saito *et al.*, 2007). Ces piARNs fonctionnels sont alors dit piARNs primaires et vont s'engager dans un cycle d'amplification dit "ping-pong". Le piARN dirige le clivage de l'ARNm d'un rétrotransposon cible par complémentarité de séquence (**figure 32**), clivage réalisé par l'activité endonucléase de la protéine MILI. Une nouvelle extrémité 5' est ainsi générée sur l'ARNm du rétrotransposon qu'on appelle alors pré-piARN secondaire.

Cette extrémité du pré-piARN secondaire peut alors être reconnue par une protéine PIWI :

- Lorsque le piARN secondaire est lié à MILI (14 *jpp*-20 *jpp* chez la souris), il dirige MILI sur le transcrit précurseur de piARN, génèrent un nouveau piARN secondaire à la séquence identique au piARN primaire. A son tour, ce piARN secondaire permet le clivage d'un autre rétrotransposon cible et ainsi de suite, ce qui constitue l'amplification "ping-pong" (De Fazio *et al.*, 2011).
- Lorsque le piARN secondaire est lié à MIWI2 (15,5 *jpc*-3 *jpp* chez la souris), pas d'amplification "ping-pong", mais l'ensemble piARN-MIWI2 migre au noyau pour guider la méthylation de l'ADN des rétrotransposons en s'appariant à un transcrit en cours d'élongation et permettre la modification des histones et la méthylation de l'ADN.

A ces stades précoces, dits pré-pachytène foetaux, il existe donc une répression post-transcriptionnelle rapide des rétrotransposons par MILI et une répression épigénétique à long terme par MIWI2.

Les piARNs dits pachytènes (post-nataux, pendant la prophase I de méiose), s'associent à MIWI (PIWIL1) et MILI (PIWIL2) (**figure 31**). Ceci permet la répression des rétrotransposons qui n'aurait pas été effective lors de la première vague de répression.

Chez la souris, les complexes PIWI-piARN, comprenant les protéines MILI et MIWI2, ciblent les îlots CpG afin de les méthyler et réprimer des rétrotransposons (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Ainsi, les piARN servent comme guide pour cibler les séquences génomique à méthyler.

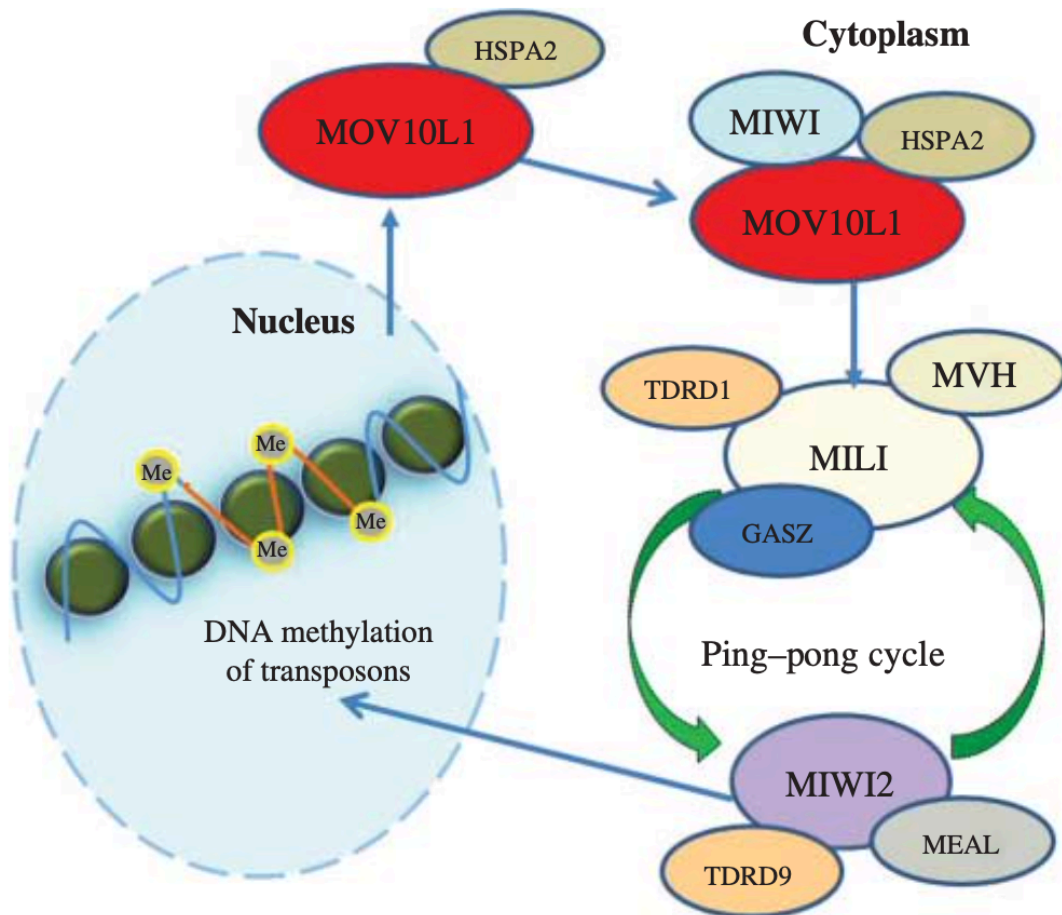


Figure 33 : Rôle potentiel de MOV10L1 et ses interactions avec les protéines de la machinerie des piRNAs au cours de la spermatogenèse murine.

HSPA2 couplée avec MOV10L1 interagissent avec la protéine PIWI (MILI), ce qui peut aider les pré-piARN à se charger sur une protéine PIWI. Après l'association de pré-piARN à une protéine PIWI (MILI), les ARN cibles sont clivés pour générer des piARN secondaires. MIWI2, TDRD9 et MEAL agissent ensemble et génèrent des composants pi-body. Le MIWI2 lié au PiARN pénètre dans le noyau pour réguler la méthylation de l'ADN des loci de transposon. Les flèches circulaires vertes indiquent le ping-pong intra-Piwi.

(Adaptée de Zhu *et al.*, 2015)

Les piARNs et les protéines PIWI ne sont pas les seuls composants de la machinerie piARNs. De nombreux autres éléments interviennent pour former un gros complexe ribonucléoprotéique nommé le piRISC (comparable au complexe RISC des miARNs).

Citons notamment :

- Une protéine comme MOV10L1 (*Moloney Leukemia virus 10-like 1*), hélicase à ARN, joue un rôle majeur dans le processus de biogenèse des piARN durant la spermatogenèse en interagissant avec les protéines MILI et MIWI (**figure 33**) (Zheng *et al.*, 2010; Frost *et al.*, 2010). Le profil d'expression de MOV10L1 est similaire à celui de MILI, principalement dans les spermatocytes pachytènes (Frost *et al.*, 2010). Si les souris femelles mutantes dépourvues du gène *Mov10l1* sont fertiles, les mâles mutants sont stériles, et permettent de conclure que *Mov10l1* est indispensable à la spermatogenèse, à l'inhibition des rétrotransposons lors de la spermatogenèse et donc à la fertilité mâle (Zheng *et al.*, 2010).
- MAEL (*Maelstrom homolog*) est une protéine à HMG-box nécessaire à la répression de certaines classes de rétrotransposons. Sa perte de fonction provoque un défaut dans le profil d'expression des piARNs et une hypométhylation transitoire des spermatogonies précoces (Soper *et al.*, 2008).
- Le gène *Gasz* code pour une protéine avec notamment un domaine ankyrin repeat qui réprime certaines classes de rétrotransposons, peut-être en stabilisant MILI et d'autres facteurs de la voie (Ma *et al.*, 2009).

Globalement, chez la souris, les mutations, avec perte de fonction, des différents éléments de la machinerie des piARNs conduisent toujours à une stérilité mâle dû à un arrêt de la spermatogenèse. Deux phénotypes différents apparaissent :

- Arrêt au stade zygotène de méiose (cas des invalidations de *Mili*, *Miwi2*, *Tdrd1*, *Tdrd9*, *Mvh*, *Mov10L1*, *Mael*, *Gasz* et *Mitopld*) avec un échec d'appariement des chromosomes homologues, une augmentation des cassures double brins et une forte activité des rétrotransposons. De plus, une méthylation *de novo*

incorrecte des loci des rétrotransposons est observée (Ma *et al.*, 2009; Soper *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2000; Shoji *et al.*, 2009; Chuma *et al.*, 2006; Carmell *et al.*, 2007; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004).

- Arrêt de la spermiogenèse (cas des invalidations de *Miwi*, *Tdrd1* et *Tdrd5*) (Hsieh *et al.*, 2020; Deng and Lin, 2002; Chuma *et al.*, 2006; Yabuta *et al.*, 2011), avec un phénotype moins bien caractérisé.

En conclusion, les études génétiques chez la souris ont permis de montrer que la voie des PIWIs est essentielle à la fertilité mâle chez cette espèce. Chaque protéine de cette voie agit à des étapes distinctes de la spermatogenèse et leurs fonctions ne sont pas redondantes. Les corps chromatoïdes, périnucléaires et sans membrane, hébergent la majorité des acteurs de la machinerie des piARNs. Ces structures pourraient intervenir sur la dégradation des piARNs et des protéines impliquées ou avoir un rôle de stockage des protéines de la voie des piARN afin de limiter leur action à une fenêtre temporelle précise.

Paramètres	Valeur de référence
Volume	>1.5 mL
pH	>7.2
Nombre de spermatozoïdes / mL	>15 M / mL
Nombre de spermatozoïdes / éjaculat	>39 M
Mobilité progressive	>32 %
Mobilité totale	>40 %
Vitalité	>58 %
Formes normales	>3 % (Kruger), >23% (David)
Leucocytes	<1.0 M / mL
Auto-Ac anti-spermatozoïdes MAR-Test IgG ou IgA	<50%

Table 1 : Normes et valeurs de référence des paramètres spermatiques selon l'OMS en 2010.

Chapitre III : Infertilité masculine

I. Définition

L'infertilité se définit comme l'incapacité d'obtenir une grossesse après 12 mois de rapports sexuels sans protection. Elle touche au moins 15% des couples en âge de procréer (Thonneau *et al.*, 1991). Dans plus de la moitié des cas, l'infertilité du couple est d'origine masculine, en relation avec une altération **quantitative** et/ou **qualitative** de la spermatogenèse, d'origine congénitale ou acquise.

Une diminution importante de la qualité et du nombre de spermatozoïdes a été observée chez l'homme ces dernières décennies. Selon plusieurs méta-analyses réalisées dans le monde entier, la concentration des spermatozoïdes et le volume séminal auraient diminué de plus de 50% depuis 50 ans (Carlsen *et al.*, 1992; Rolland *et al.*, 2013; Sengupta *et al.*, 2018).

II. L'analyse du sperme

Chez l'homme, le spermogramme, associé au spermocytogramme, constituent l'un des premiers tests à réaliser pour explorer la fertilité d'un couple. D'autres examens pourront être réalisés en seconde intention. La réalisation du spermocytogramme devra être associée à un interrogatoire et un examen clinique afin d'identifier des étiologies à l'altération de la qualité du sperme.

Au spermogramme, différents paramètres seront analysés et comparés aux valeurs de référence définies par le manuel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (cf dernière référentiel <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>). Les normes pour les caractéristiques du sperme sont résumées dans le **tableau 1**.






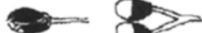










Morphologiquement normal		Tête de forme ovale très régulière, 4,0-5,0 μm de long, 2,5-3,0 μm de large, région acrosomique bien définie, homogène, de contour net et représentant 40-70% de la surface, pièce intermédiaire représentant 1,5-2 fois la longueur de la tête, dans l'axe de la tête, pièce principale mesurant environ 45 μm , dans l'axe de la pièce intermédiaire, de contour régulier et d'aspect homogène	
Anomalies de la tête	Allongé		Longueur plus grande que la normale et largeur normale
	Aminci		Largeur plus petite que la normale et longueur normale
	Microcéphale		Longueur et largeur plus petites que la normale; dans cette catégorie entrent les têtes rondes
	Macrocéphale		Longueur et largeur plus grandes que la normale
	Multiple		>1 tête / spermatozoïde, accolées ou dissociées
	Base anormale		Anomalies de contour ou de texture de la région postacrosomique
	Acrosome anormal ou absent		Anomalies de contour, de taille ou inhomogénéité de la région acrosomique - absence d'acrosome
Anomalies de la pièce intermédiaire	Reste cytoplasmique		Prise en compte uniquement des restes cytoplasmiques ayant une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale
	Amincie		Diamètre de la pièce intermédiaire inférieur ou égal à celui de la pièce principale dans sa partie initiale
	Angulée		Axe de la pièce intermédiaire et axe de la tête ou axe de la pièce principale formant un angle net ou flagelle non implanté dans l'axe de la tête
Anomalies du flagelle	Absent		Têtes isolées comptées dans cette catégorie (on ne recense pas conjointement les flagelles isolés dans la grille)
	Ecourté		Flagelle significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête), souvent épaissi
	Irrégulier		Diamètre de la pièce principale variable, présentant des rétrécissements ou des élargissements
	Enroulé		Flagelle enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête
	Multiple		>1 flagelle / spermatozoïde, pièce intermédiaire commune ou multiple

Table 2 : Anomalies morphologiques du spermatozoïde selon la classification modifiée de David. (Adapté de Auger et al., 2000)

Le spermocytogramme permettra une analyse de la morphologie des spermatozoïdes en utilisant la classification de DAVID modifiée (Auger *et al.*, 2000), ou celle de Kruger. En général, l'observation est réalisée sur 100 spermatozoïdes. Les différentes anomalies morphologiques qui peuvent être identifiées sont classés dans le **tableau 2**, selon la classification de David modifiée (Auger *et al.*, 2000).

Cette classification répertorie :

1. Des anomalies de la tête (allongée, microcéphale, macrocéphale, multiple, amincie, présentant un acrosome anormal ou absent, présentant une base anormale).
2. Des anomalies de la pièce intermédiaire (angulée, grêle, présence de restes cytoplasmiques).
3. Des anomalies de la pièce principale (absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée, multiple).

Au total, les paramètres spermatiques analysés permettront une définition des déficits qui seront soit qualitatifs (**Asthénozoospermie, Tératozoospermie, Nécrozoospermie**), soit quantitatifs (**Oligozoospermie, Azoospermie**).

- **Oligozoospermie** : l'oligozoospermie est définie, par une diminution de la numération de spermatozoïdes jusqu'à < 15 millions par ml (WHO, 2010).
- **Azoospermie** : l'azoospermie est définie par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat, après centrifugation, sur deux examens successifs de spermogramme pratiqués dans des conditions optimales à 3 mois d'intervalle (WHO, 2010).
- **Asthénozoospermie** : définie par une mobilité totale des spermatozoïdes inférieure à 40%, et une mobilité progressive (a+b) inférieure à 32% (WHO, 2010).
- **Tératozoospermie** : définie par une altération de la morphologie des spermatozoïdes, avec un pourcentage de spermatozoïdes typiques inférieur à 4% (WHO, 2010). Les tératozoospermies seront polymorphes, avec des spermatozoïdes ayant des anomalies multiples et variables, ou monomorphes,

avec des spermatozoïdes ayant tous la même anomalie touchant une seule partie du spermatozoïde.

- **Nécrospermie** : la nécrospermie est définie par une diminution du pourcentage de spermatozoïdes vivants inférieur à 58% (WHO, 2010).

III. Les techniques d'assistance médicale à la procréation

Bien que diverses définitions aient été utilisées, à l'origine, les technologies de procréation assistée (ART) font référence à une gamme de techniques et de services pour contourner l'infertilité humaine. Il y a trois étapes d'intervention progressive : (i) l'induction de l'ovulation avec des rapports sexuels programmés, (ii) l'induction de l'ovulation combinée à l'insémination artificielle des spermatozoïdes, (iii) la fécondation *in vitro* avec ou sans micro-injection de spermatozoïdes.

Le processus d'assistance médicale à la procréation (AMP) implique une hyperstimulation ovarienne contrôlée pour favoriser la maturation de multiples ovocytes et la préparation du sperme afin de l'utiliser ultérieurement.

A. Hyperstimulation ovarienne contrôlée

Bien que les techniques d'AMP puissent être réalisées durant le cycle menstruel non stimulé, il est devenu courant d'effectuer une hyperstimulation hormonale afin d'obtenir plusieurs ovocytes disponibles ou lieu d'un seul. Le protocole le plus couramment utilisé consiste en une hyperstimulation ovarienne contrôlée avec des injections quotidiennes de FSH humaine recombinante (r-FSH) pour induire la croissance de plusieurs follicules dans les ovaires (Raju *et al.*, 2013). Les follicules sont surveillés à l'aide des taux sériques d'œstradiol et d'une échographie transvaginale. Lorsque les follicules atteignent une taille suffisante, de la gonadotrophine

chorionique humaine (HCG) est administrée pour induire la maturation des ovocytes, (Wang *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2011).

B. Prélèvement et préparation du sperme

La préparation du sperme permet d'éliminer le plasma séminal pouvant exercer des effets toxiques à la fois sur le sperme lui-même, ainsi que sur les ovocytes (Kanwar *et al.*, 1979), et de sélectionner les spermatozoïdes fonctionnels mobiles et capables de féconder. Différentes techniques de séparation sont disponibles sur la base de principes tels que la migration, la filtration ou la centrifugation à gradient de densité. Les spermatozoïdes préparés sont incubés dans un milieu spécialisé jusqu'à la fécondation. En cas d'azoospermie, les spermatozoïdes sont récupérés après biopsie testiculaire. Les grands principes de la biopsie testiculaire sont expliqués ultérieurement.

C. Fécondation

Les spermatozoïdes préparés seront soit inséminés, soit directement mis en contact de l'ovocyte, soit micro-injectés dans ceux-ci. Le choix de la technique est fonction des paramètres spermatiques, de la durée de l'infertilité et de l'âge de la patiente.

1. Insémination intra-utérine (IIU)

Le sperme est préparé pour être inséminé directement dans l'utérus. Cette technique nécessite au minimum un million de spermatozoïdes mobiles, après sélection pour avoir des chances de succès suffisantes. En cas d'altération majeure de la morphologie des spermatozoïdes, cette technique n'est pas privilégiée.

2. Fécondation *in-vitro* (FIV)

La FIV a été introduite à l'origine pour le traitement de l'infertilité tubaire par l'occlusion des trompes de Fallope (Edwards *et al.*, 1981). Elle est également proposée en cas d'échec des IUI. En FIV, les ovocytes collectés sont co-incubés avec un nombre défini de spermatozoïdes mobiles (150.000 par ovocyte) dans un milieu de culture, conçu pour imiter le milieu fluide tubaire. Après une culture de 2 ou 3 jours dans la plupart des cas, 1 à 2 embryons sont transférés dans l'utérus de la patiente.

Cette technique n'est pas adaptée en cas de faible nombre de spermatozoïdes et de mauvaise qualité du sperme.

3. Fécondation *in-vitro* avec micro-injection du spermatozoïde (ICSI)

Il s'agit d'une FIV réalisée en injectant directement le spermatozoïde dans l'ovocyte. Elle est proposée si les caractéristiques spermatiques ne permettent pas de pratiquer une FIV classique ou après échec inexplicé de celle-ci. Les spermatozoïdes utilisés peuvent être issus soit du sperme éjaculé, soit d'un prélèvement épидидymaire ou testiculaire. Les ovocytes sont débarrassés du cumulus oophorus et de la corona radiata avant toute mise en fécondation, ce qui permet de vérifier leur maturité et leur morphologie avant l'injection.

Il existe une variante de cette technique qui s'appelle l'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection) (Bartoov *et al.*, 2002). Les spermatozoïdes seront sélectionnés grâce à un grossissement variant de x6300 à plus de x10000 (MSOME, pour high magnification *Motile Sperm Oganelle Morphology Examination*), ce qui permet une meilleure observation des spermatozoïdes.

IV. L'azoospermie

A. Définition

L'azoospermie concerne environ 1 % des hommes de la population générale (environ 10% des cas d'infertilité masculine) (Willott, 1982; Jarow *et al.*, 1989). Il existe trois grandes étiologies : (i) le dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire, (ii) le trouble de la spermatogenèse, et (iii) l'obstruction du canal urogénital. D'un point de vue clinique, l'azoospermie est divisée en deux grandes catégories : l'azoospermie obstructive (AO) et l'azoospermie non-obstructive (ANO).

L'**AO**, encore appelée "excrétoire", dont la fréquence se situe entre 30 et 40% des cas d'azoospermie, est caractérisée par une obstruction des voies génitales bloquant le passage des spermatozoïdes. L'obstruction peut être congénitale ou acquise et peut inclure un ou plusieurs segments de l'appareil reproducteur masculin : épидидyme, canal déférent et canaux éjaculateurs. Les causes congénitales d'azoospermie obstructive comprennent l'absence congénitale bilatérale du canal déférent (ABCD) et l'obstruction épидидymaire idiopathique. Les causes acquises d'azoospermie obstructive comprennent la vasectomie, une infection, un traumatisme ou une lésion iatrogène.

À l'inverse, l'**ANO** ou "sécrétoire", se définit par un échec de la spermatogenèse avec une absence ou une forte diminution de production de spermatozoïdes matures et représente environ 60% des cas d'azoospermie. L'origine peut être centrale avec un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire, non abordé dans le manuscrit, ou périphérique avec atteinte testiculaire.

Dans le cadre de la prise en charge, que cela soit l'AO ou l'ANO périphérique, ceci passera par la réalisation d'un prélèvement des spermatozoïdes testiculaire et/ou épидидymaire.

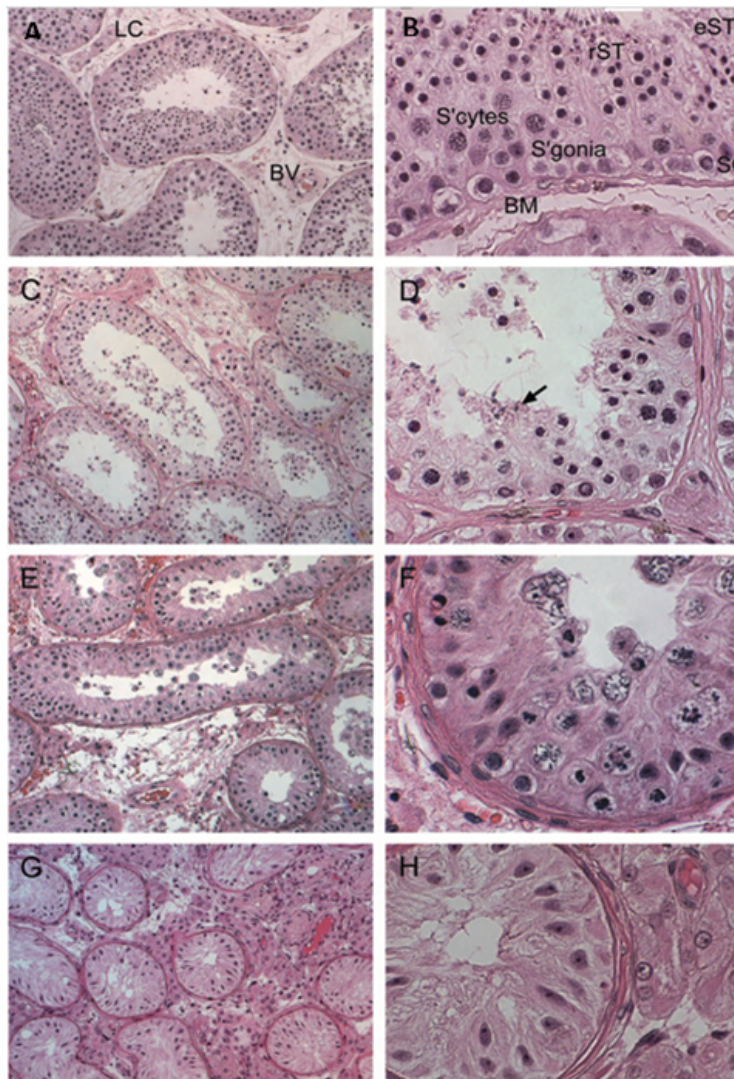


Figure 34 : Classification des différents phénotypes histologiques de la spermatogénèse humaine normale et pathologique.

Spermatogénèse normale A (x10) et B (x40) : tous les stades de maturation des cellules germinales sont présents dans les tubes séminifères : spermatogonies, spermatocytes, spermatides rondes et allongées.

Hypospermatogénèses C (x10) et D (x40) : réduction du diamètre des tubes séminifères et du nombre des cellules germinales, mais présence de tous les stades, incluant les spermatides (flèches).

Arrêt de maturation E (x10) et F (x40) : réduction du diamètre des tubes séminifères avec un blocage à un stade : spermatocytes dans cet exemple.

Syndrome de cellules de Sertoli seules G (x10) et H (x40) : absence de cellules germinales, présence uniquement de larges cellules de Sertoli matures, réduction du diamètre des tubes et une agrégation des cellules de Leydig.

(SC) cellules de Sertoli, (S'gonia) spermatogonies, (S'cytes) spermatocytes, (rST) spermatides rondes, spermatides allongées (eST), (LC) cellules de Leydig, (BM) membrane basale, (BV) vaisseaux sanguins. (Adaptée McLachlan *et al.*, 2007).

B. La biopsie testiculaire

Les spermatozoïdes testiculaires sont isolés à partir de biopsie testiculaire ou TESE (*testicular sperm extraction*) obtenus par chirurgie ouverte sous anesthésie générale ou locale de patients. 2 alternatives ont été développées :

- L'aspiration par aiguille, ou FNA (*Fine Needle Aspiration*). Elle a été initialement utilisée à des fins de diagnostic et est une méthode de récupération de sperme moins invasive par rapport à la biopsie. La plupart des études ont montré des taux de récupération de sperme (SRR, pour *sperm retrieval rates*) significativement plus faibles avec la FNA que la TESE (Salihu and Aliyu, 2003; Tournaye, 1999).

- la micro-TESE avec extraction de spermatozoïdes testiculaires par microdissection. Cette technique permet d'identifier les zones focales de production de spermatozoïdes dans les testicules, en fonction de la taille et de l'apparence des tubes séminifères, à l'aide d'un microscope opératoire (Schlegel, 1999a). La micro-TESE est offerte comme une meilleure alternative à la TESE en raison de l'augmentation des chances de récupération du sperme testiculaire, diminuant la taille de l'élimination des tissus, minimisant ainsi les dommages testiculaires (Esteves, 2015).

Dans l'AO, la spermatogenèse étant normale (**figure 34 A et B**), le recours à une biopsie testiculaire n'est pas obligatoire, un prélèvement épидидymaire peut s'avérer suffisant. À noter cependant, lorsque l'obstruction est ancienne, une diminution des cellules germinales (hypospermatogenèse) peut être observée. Au total, des spermatozoïdes sont retrouvés chirurgicalement dans plus de 95% des cas d'AO.

Chez les patients avec ANO, le taux d'extraction des spermatozoïdes est de 43 à 63 % (Schlegel, 1999b; Okubo *et al.*, 2002; Hibi *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, ni les dosages d'hormones sériques, tels que la FSH et l'inhibine B, ni les évaluations non invasives, telles que le volume testiculaire, ni les marqueurs séminaux, n'ont pu prédire suffisamment la probabilité de récupération des spermatozoïdes (Amer *et al.*, 1999; Kolb *et al.*, 2000; Carpi *et al.*, 2009). Il existe donc une forte demande pour identifier

de nouveaux marqueurs permettant de mieux prédire les chances de succès d'une biopsie testiculaire, afin d'éviter un geste chirurgical inutile.

C. Phénotypes histologiques testiculaires dans les azoospermies non-obstructives

L'étude histologique du tissu testiculaire permet l'évaluation de deux compartiments : les tubes séminifères et le tissu interstitiel. La classification se fera majoritairement sur l'analyse du premier et permet de définir trois phénotypes histologiques chez les patient ayant une ANO : les hypospermatogénèses, le syndrome des cellules de Sertoli seules (SCOS) et les arrêts de maturation des cellules germinales (germ cell arrest, GCA) (**figure 34**) (McLachlan *et al.*, 2007; Robin *et al.*, 2010).

Les différents aspects histologiques testiculaires peuvent être soit uniformes (forme pure) où tous les tubes séminifères représentent le même phénotype histologique, soit mixtes où les phénotypes histologiques sont variables d'un tube à un autre (Robin *et al.*, 2010).

1. Les hypospermatogénèses

En général, tous les stades de la spermatogénèse sont présents jusqu'au spermatozoïde (**figure 34 C et D**), mais avec une diminution du nombre des cellules germinales dans les tubes séminifères (Robin *et al.*, 2010). Les hypospermatogénèses représentent environ 32% des cas d'ANO (McLachlan *et al.*, 2007). La probabilité d'extraction de spermatozoïdes est élevée dans ce cas.

2. Le syndrome des cellules de Sertoli seules (SCOS)

La prévalence de SCOS dans l'ANO varie entre 27 et 68% selon les études (Tournaye *et al.*, 1997; Tsujimura *et al.*, 2002). C'est le phénotype histologique testiculaire dans lequel on ne retrouve dans les tubes séminifères que des cellules de Sertoli, sans aucune cellule germinale (**figure 34 G et H**). Le SCOS est caractérisé par un faible volume testiculaire et une FSH élevée. La littérature rapporte un taux d'extraction de spermatozoïdes variant de 16 à 33% pour les phénotypes mixtes (Amer *et al.*, 1999; Jezek *et al.*, 1998; Seo and Ko, 2001).

3. Les arrêts de maturation testiculaire (AM)

Les AM sont caractérisés par une spermatogénèse incomplète, avec la présence de cellules germinales jusqu'à un stade de développement donné : précoce (spermatogonie, spermatocyte (**figure 34 E et F**) ou tardif (plus rarement spermatide ronde). L'AM pure est un phénotype histologique rare représentant environ 5% ces cas. L'AM est souvent associée à un volume testiculaire normal et à des taux normaux de gonadotrophine (LH, FSH), qui pourraient imiter une azoospermie obstructive.

V. Les étiologies génétiques de l'azoospermie

Trois arguments principaux sont en faveur d'une composante génétique en cas d'infertilité masculine et en particulier en cas d'azoospermie :

- L'augmentation de la fréquence des réarrangements chromosomiques qui peuvent être responsables d'un défaut de la méiose ou d'un dysfonctionnement d'un gène crucial pour la spermatogénèse chez les hommes infertiles (De Braekeleer and Dao, 1991).

- La fréquence des infertilités d'origine familiale avec plusieurs individus infertiles de la même famille, suggérant une transmission de l'infertilité sur un mode autosomique récessive.
- Les modèles animaux montrant que de nombreuses mutations géniques provoquent une infertilité.

A. Anomalies chromosomiques et azoospermie

La fréquence des anomalies chromosomiques est d'environ 15% chez les patients atteints d'ANO contre 0.5% dans la population générale. Elles correspondent à des anomalies du nombre ou de la structure des chromosomes, avec des anomalies touchant majoritairement les gonosomes (chromosomes X et Y).

1. Syndrome de Klinefelter (47,XXY)

La maladie génétique la plus courante à l'origine de l'ANO est le syndrome de Klinefelter (SK), caractérisé par la présence d'un chromosome X supplémentaire (Jacobs and Strong, 1959). Bien que la première description de cette pathologie remonte à près de 80 ans (KLINEFELTER *et al.*, 1942), le SK continue de poser des défis importants, principalement lié au fait que la grande majorité des patients (plus de 50%) ne sont pas diagnostiqués.

Sa prévalence est estimée à 1 sur 600 (0,1-0,2 %) chez les nouveau-nés, 3 à 4 % chez les hommes infertiles et 10 à 12 % chez les patients azoospermes (Van Assche *et al.*, 1996) (Vloeberghs *et al.*, 2018). Dans 90% des cas, le caryotype est 47,XXY homogène, concernant toutes les cellules. Dans les 10% des cas, il existe une mosaïque associant des cellules 46,XY à des cellules 47,XXY, parfois un chromosome X structurellement anormale (47,iXq,Y) est identifié et exceptionnellement une aneuploidie de grade supérieur (48,XXX,Y, 48,XXYY, voir plus) est diagnostiquée associant, au phénotype

classique, un retard des acquisitions (Al-Awadi *et al.*, 1986; Garcia-Quevedo *et al.*, 2011; Bojesen *et al.*, 2003). En cas de mosaïque, le phénotype clinique sera plus modéré, en fonction de la proportion de cellules normales 46,XY. À la différence des autres aneuploïdes majoritairement d'origine maternelle, le SK est d'origine paternelle ou maternelle, même si une augmentation de l'âge maternelle est observée (Carothers and Filippi, 1988; Bojesen *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2005 ; Gruchy *et al.*, 2011).

Parmi les caractéristiques typiques, citons l'infertilité, la grande taille, due à la présence de 3 copies du gène *SHOX* (*Short Stature Homeobox*) dans la région pseudo-autosomique 1 (PAR1), impliqué dans la croissance osseuse (Ottesen *et al.*, 2010), et parfois une morphologie dite gynoïde avec une gynécomastie.

Concernant le potentiel de fertilité du SK, ceux-ci sont dans leur très grande majorité azoospermes. Cependant, la spermatogenèse peut avoir lieu dans certains tubes séminifères par la présence de cellules 46,XY. Des études, basées sur l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) ont démontré que seules les spermatogonies euploïdes (46, XY) sont capables de compléter le processus spermatogénique conduisant à des gamètes haploïdes normaux (Sciurano *et al.*, 2009; Vialard *et al.*, 2012) . Ainsi, chez environ 34 à 44 % des patients atteints de SK, des spermatozoïdes sont retrouvés par TESE, qui pourront être utilisés pour l'ICSI, avec un taux moyen de naissances vivantes par cycle de 29 à 43 % (Yarali *et al.*, 2009; Fullerton *et al.*, 2010).

Étant donné qu'avec le vieillissement, une perte progressive de cellules germinales se produit, le moment optimal de la TESE/cryoconservation préventive et les facteurs prédictifs influençant le taux de récupération des spermatozoïdes a été étudié (Rohayem *et al.*, 2015). La fenêtre optimale pour un taux de succès de récupération des spermatozoïdes plus élevé se situait entre la fin de l'adolescence et le début de l'âge adulte ($\geq 15-19$ ans), avec une LH $\leq 17,5$ U/L et un niveau de testostérone $\geq 7,5$ nmol/L. Néanmoins, une méta-analyse récente n'a pas trouvé d'effet lié à l'âge sur le taux de récupération des spermatozoïdes, et cette question reste encore débattue (Corona *et al.*, 2017).

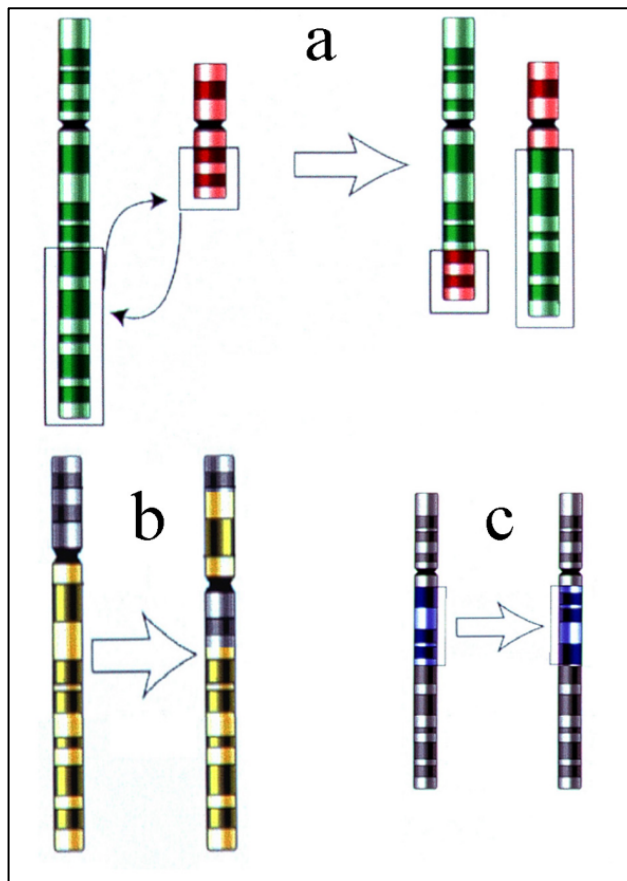


Figure 35 : Schéma d'obtention des différentes anomalies chromosomiques
 (a) Translocation, (b) Inversion péricentrique, (c) Inversion paracentrique.

2. Les remaniements chromosomiques

Les anomalies structurelles chromosomiques incluent : les translocations réciproques, les translocations robertsoniennes, et les inversions péricentriques ou paracentriques (**figure 35**). Leur fréquence varie entre 2 et 20% selon la population étudiée et augmente avec la sévérité de l'atteinte spermatique, la numération étant le paramètre le plus prédictif d'un risque d'anomalie chromosomique. Pour schématiser, il semble que les anomalies équilibrées touchant les gonosomes entraînent le plus souvent des azoospermies, les anomalies équilibrées touchant les autosomes plutôt des oligozoospermies. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer le lien entre altération de la spermatogénèse et translocation :

- La 1^{ère} est celle de l'interaction entre le quadrivalent, le trivalent ou la boucle d'inversion, issue de l'appariement des chromosomes homologues, avec la vésicule sexuelle.
- La 2^{ème} hypothèse pourrait être une extension de l'inactivation précoce du chromosome X aux autosomes impliqués dans les remaniements chromosomiques.
- La 3^{ème} pourrait être une perturbation des complexes synaptonémaux entre les homologues.
- La 4^{ème}, une cassure au niveau d'un gène majeur de la spermatogénèse. Cette hypothèse a depuis été abandonnée suite à différents travaux (Bache *et al.*, 2004).

En plus de la difficulté de prédire les chances de succès de la TESE pour les patients azoospermes ayant un remaniement chromosomique, il y a la nécessité d'évaluer le risque chromosomique pour le conceptus, lié à la présence d'un tel remaniement. De nombreuses études en spermFISH (Goldman and Hultén, 1993a; Goldman and Hultén, 1993b; Shi and Martin, 2001; Hummelen *et al.*, 1997) montrent un type de ségrégation variable selon les chromosomes impliqués.

Il est à noter, qu'en cas de remaniement du chromosome Y, entraînant une délétion du bras long, comme les isochromosomes du bras court, ont permis d'identifier des régions majeures impliquées dans la spermatogénèse (cf paragraphe suivant).

3. Le syndrome des hommes « 46,XX »

Une autre anomalie du caryotype provoquant une azoospermie est le trouble testiculaire/ovo-testiculaire du développement sexuel (DSD) 46,XX, également connu sous le nom de syndrome masculin 46,XX. Il a été décrit pour la première fois par De la Chapelle et ses collègues en 1964 (de la Chapelle *et al.*, 1964), faisant référence à une affection clinique rare et hétérogène avec une incidence d'environ 1: 20 000 à 25 000 nouveau-nés de sexe masculin (Vorona *et al.*, 2007; Kousta *et al.*, 2010).

Dans plus de 80% des cas, le syndrome est dû à une translocation entre les bras court des chromosomes X et Y, suite à une extension au zone non homologue du crossing-over obligatoire dans la PAR1 afin de compléter la méiose. Le caryotype est en général : 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2). Le gène *SRY* situé normalement sur le bras court du chromosome Y (Yp), gène de la détermination du sexe masculin, se retrouve donc sur le 2^{ème} chromosome X. Si ces patients présentent un phénotype masculin normal, pour la minorité des « 46,XX » sans *SRY* (*SRY*-), les organes génitaux sont parfois ambigus avec une mauvaise virilisation et un DSD ovo-testiculaire (McElreavey *et al.*, 1993; Vorona *et al.*, 2007). Il s'agit de mutations/surexpressions de gènes autosomiques du déterminisme du sexe masculin comme la duplication du gène *SRY*-Box 9 (*SOX9*), *SOX3* ou *SOX10* (Sutton *et al.*, 2011).

Pour tous ces patients, l'azoospermie est constante, suite à l'absence du chromosome Y et des gènes essentiels pour la spermatogenèse physiologique. Les chances de trouver des spermatozoïdes dans leurs testicules sont, pour ces patients, nulle. Il s'agit d'une contre-indication absolue à la réalisation d'une biopsie testiculaire.

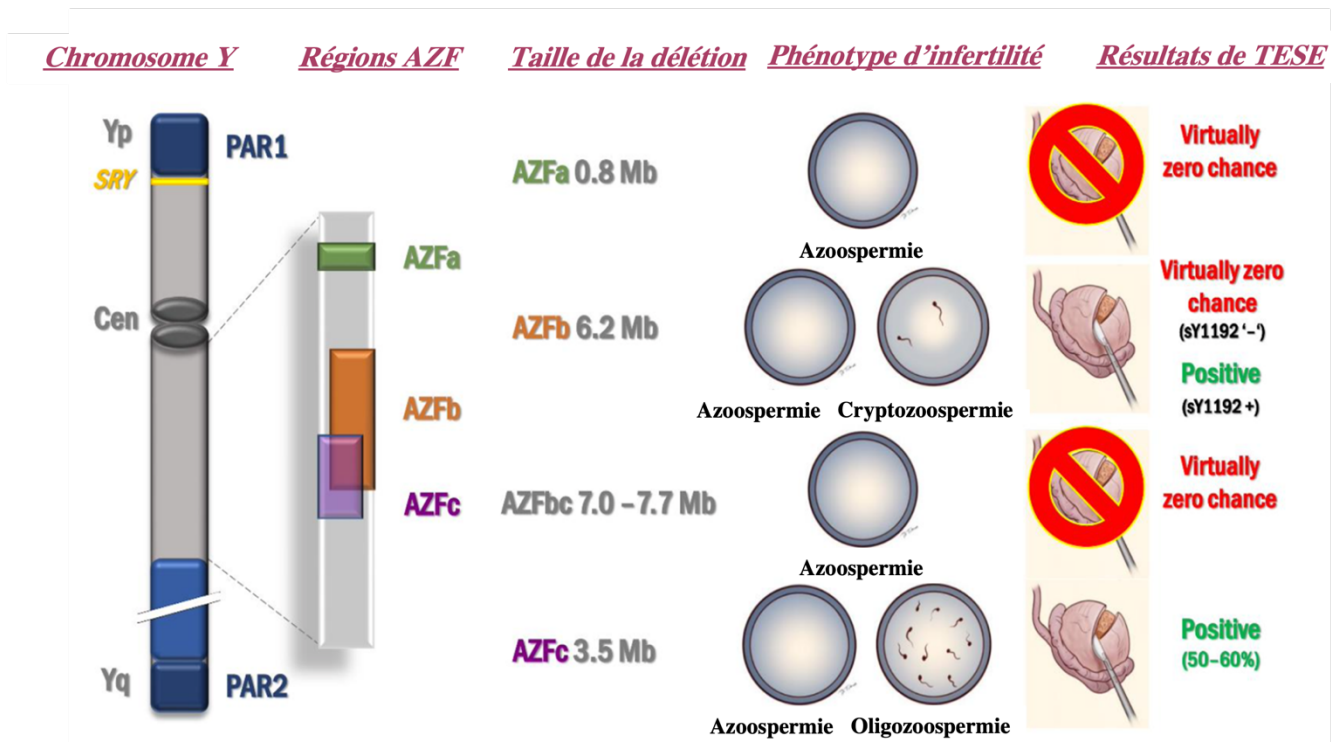


Figure 36 : Les anomalies spermatiques et les résultats de TESE des microdélétions d'AZF.

AZF : Azoospermia Factor, Cen : Centromère, PAR1: Pseudoautosoma Region 1, PAR2 : Pseudoautosomal Region 2, SRY : Sex determining Region Y gene, TESE: Testicular Sperm Extraction.

(Adaptée de Cioppi *et al.*, 2021)

1. Le double Y 47,XYY

Le double Y ou 47,XYY est caractérisé par une aneuploïdie avec présence d'un chromosome Y surnuméraire. L'altération est variable en fonction des individus, variant d'une spermatogénèse normale à une azoospermie (Moretti *et al.*, 2007). L'achèvement de la spermatogénèse est lié à la faculté ou non des cellules 47, XYY de permettre la ségrégation des chromosomes sexuels, variable d'un individu à l'autre. Il n'existe aucun critère permettant de définir, comme pour le SK, les chances de réussite d'une TESE.

2. Les microdélétions du chromosome Y (Yq)

L'observation de larges délétions du chromosome Y, visible sur un caryotype standard, chez des individus azoospermes, a suggéré l'existence d'un facteur AZF (azoospermia factor) sur le chromosome Y (Tiepolo and Zuffardi, 1976). Grâce à des sondes moléculaires, la présence de microdélétions interstitielles sur le chromosome Y a pu être démontrée (Vogt *et al.*, 1992; Vog *et al.*, 1996). Avec le développement de la PCR, l'identification de 3 régions impliquées dans ces remaniements : AZFa, b et c a été possible (Vog *et al.*, 1996). La fréquence de ces délétions est, comme pour les translocations, d'autant plus importante que les caractéristiques spermatiques et surtout la numération sont altérées. La fréquence des délétions varie entre 3 et 28% chez les individus oligozoospermes sévères et azoospermes (Reijo *et al.*, 1996; Simoni *et al.*, 1997).

Le chromosome Y est particulier pour sa taille, sa structure génomique, son contenu et sa trajectoire évolutive (Skaletsky *et al.*, 2003; Navarro-Costa, 2012). Il contient des duplications segmentaires disposées en répétitions directes ou inversées, et des palindromes, ne se recombinent pas à l'inverse du chromosome X qui peut le faire lors de la méiose chez la femme. L'existence de ces séquences dupliquées permet un

mécanisme appelé recombinaison homologue non-allélique (NAHR) à l'origine des délétions/duplications récurrentes affectant le dosage des gènes sur le chromosome Y.

Ces délétions concernent la région AZFc dans environ 80 %, AZFa dans 0,5 à 4 %, de l'AZFb dans 1 à 5 %, et les 2 régions AZFb et c dans 1 à 3 % (Krausz and Casamonti, 2017). Les phénotypes de délétion pour chaque région sont rapportés sur la **figure 36**. En raison de la présence de plusieurs gènes et de leur nature multicopie dans ces régions, il est difficile de comprendre quels gènes causent le phénotype associé.

La région AZFa a une longueur de 792 kb et contient deux gènes à copie unique exprimés de manière ubiquitaire, *USP9Y* (*Ubiquitin Specific Peptidase 9 Y-Linked*) et *DDX3Y* (*DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked, ancien DBY*). *USP9Y* code pour une protéine à activité hydrolase C-terminale ubiquitine, qui pourrait jouer un rôle régulateur important au niveau du renouvellement des protéines. L'absence isolée de ce gène est associée à un large spectre de phénotypes testiculaires, allant de l'azoospermie avec hypospermatogenèse à la normozoospermie (Ginalski *et al.*, 2004; Tyler-Smith and Krausz, 2009). *DDX3Y* code pour une hélicase à ARN dépendante de l'ATP qui fait partie de la famille bien conservée des hélicases DDX3 DEAD Box (Mohr *et al.*, 2002). La protéine DDX3Y a été trouvée principalement dans les spermatogonies, tandis que son homologue du chromosome X, DDX3X (DEAD-Box Helicase 3 X-Linked), s'est avérée exprimée après la méiose dans les spermatides. Au total, la délétion de la région AZFa est associée à un SCOS.

La suppression complète de l'AZFb supprime un segment d'ADN de 6,2 Mb, comprenant 32 copies de gènes et d'unités de transcription. Ces gènes sont susceptibles d'être impliqués dans la maturation des cellules germinales puisque leur élimination provoque un AM entraînant une azoospermie.

La région AZFc implique 12 gènes et unités de transcription, chacun présent dans un nombre variable de copies résultant en un total de 32 copies. La manifestation clinique chez les porteurs complets de la délétion AZFc est largement variable. Des spermatozoïdes peuvent être détectés dans l'éjaculat des patients mais généralement

à moins de 2 millions/ml (Lo Giacco *et al.*, 2014). Étant donné qu'une baisse progressive du nombre de spermatozoïdes a été observée chez ces sujets, la cryoconservation des spermatozoïdes devrait être proposée. Chez les patients qui présentent une azoospermie avec des délétions de la région AZFc, le phénotype testiculaire va du SCOS à l'oligozoospermie.

Chez les patients azoospermes, le dépistage des délétions AZF est essentiel car si elle inclut l'ensemble des régions AZFa et/ou b, aucun spermatozoïde ne peut être retrouvé à la TESE (**figure 36**). Concernant les porteurs de microdélétions AZFc, les spermatozoïdes peuvent être récupérés par m-TESE à partir des testicules avec un taux de réussite de 50 à 60 % (Flannigan and Schlegel, 2017; Miraghazadeh *et al.*, 2019).

B. Azoospermie obstructive et anomalies du gène CFTR

L'ABCD est une maladie congénitale du développement (1:1000 hommes) caractérisée par l'absence des deux canaux déférents. Elle peut se manifester par des signes cliniques variés selon l'association ou non à d'autres anomalies du tractus urogénital masculin, principalement des vésicules séminales (50 % des cas) et des reins (agénésie rénale survenant chez 5 à 10 % des patients ABCD) (Bieth *et al.*, 2021). La prévalence du ABCD chez les hommes avec AO est estimée à environ 25% (Oates and Amos, 1994; Tournaye *et al.*, 2017). L'ABCD associé à l'agénésie des vésicules séminales est caractérisé par un phénotype typique du sperme, consistant en une azoospermie, un faible volume de sperme (<1 mL), un pH acide (<7). La contribution génétique du ABCD sans anomalies rénales est limitée, encore aujourd'hui, à l'étude d'un gène ; *CFTR* (*CF Transmembrane Conductance Regulator*). Ce gène s'étend sur 250 kb sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2), comprenant 27 exons, et code pour une protéine fonctionnelle de 1480 acides aminés. La protéine CFTR est impliquée dans la régulation de plusieurs transporteurs d'ions, dont les canaux sodiques, les échangeurs chlorure/bicarbonate, les échangeurs de protons et les canaux aqueux. Son absence est responsable du phénotype de la mucoviscidose. À ce jour, plus de 2000 mutations

ont été rapportées dans ce gène (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). Les mutations peuvent affecter non seulement les régions codantes, mais aussi le promoteur et les régions introniques profondes (Feng *et al.*, 2019; Bergougnoux *et al.*, 2019). Les allèles responsables de la maladie CFTR peuvent être classés en deux types principaux : (i) les mutations « sévères », qui sont toujours associées à la mucoviscidose à l'état homozygote ; (ii) les mutations « modérées » ou non responsables de la mucoviscidose, qui n'ont jamais été observées chez les patients atteints de mucoviscidose. La présence de deux mutations "modérée" ou d'un allèle "sévère" plus un allèle "modérée" est à l'origine d'une CFTRopathie, groupe de pathologie incluant, entre autres, l'ABCD, la pancréatite, etc. L'hypothèse d'un lien entre anomalie du gène *CFTR* et ABCD a été possible suite à l'observation de cette atteinte chez l'ensemble des patients avec mucoviscidose (Chillón *et al.*, 1995). D'un point de vue physiopathologique, la viscosité des liquides biologiques est associée à une obstruction des canaux excréteurs, celle-ci engendrant une dégénérescence des canaux de petit calibre comme les canaux déférents.

Étant donné que la fonction testiculaire des patients ABCD est généralement normale, la conception d'un enfant biologique est possible grâce au TESE combiné à l'ICSI. Il est donc recommandé de séquencer le gène *CFTR* chez les partenaires féminines afin de s'assurer l'absence d'un risque de 25% de transmission de la mucoviscidose. Si une mutation est détectée, un DPI (PreImplantation Genetic Diagnosis) doit être conseillé au couple.

Depuis, les analyses pangénomiques ont permis de démontrer, comme pour d'autres anomalies spermatiques homogènes, l'impact des anomalies monogéniques dans la survenue d'azoospermie, AO et ANO.

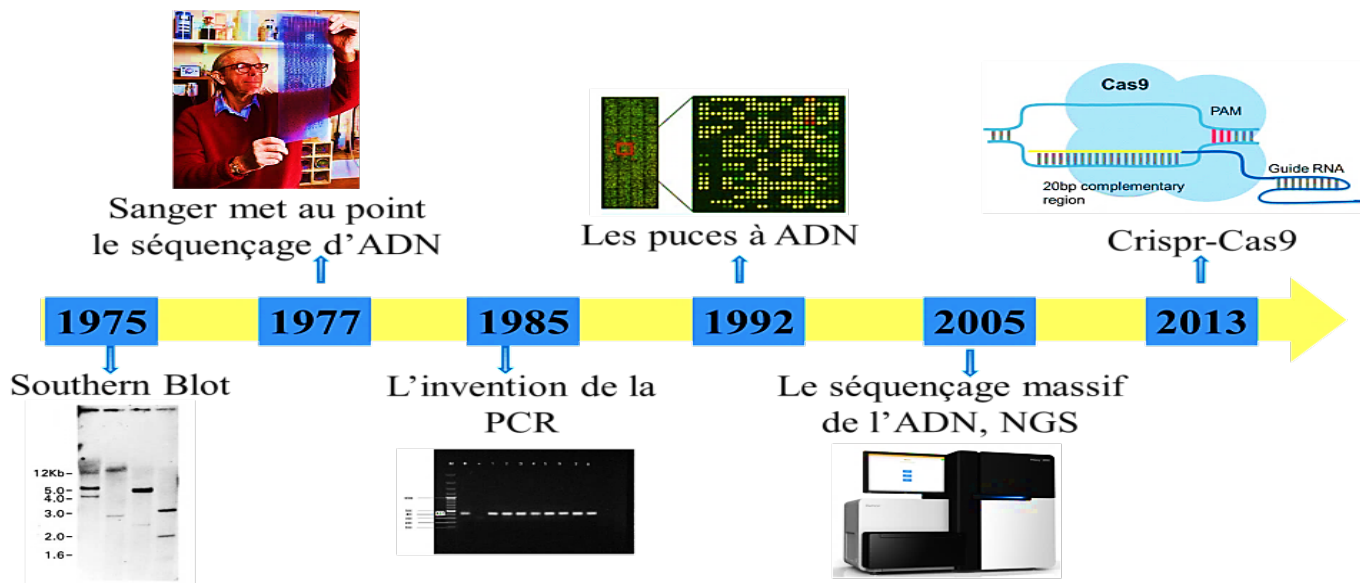


Figure 37 : Évolution des techniques cytogénétiques et génétiques moléculaires.

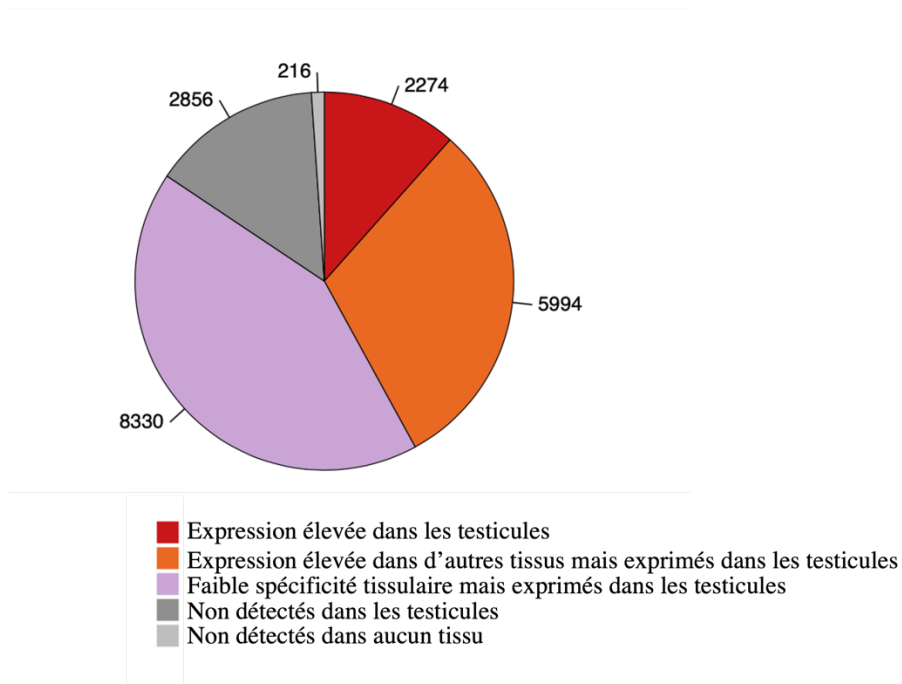


Figure 38 : La distribution des gènes en fonction de la spécificité du transcrit dans les testicules ainsi que dans tous les autres tissus. (Adaptée du site « The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org>).

Chapitre IV : À la recherche de nouveaux variants génétiques impliqués dans les azoospermies

I. Stratégies d'identification de nouveaux variants

L'amélioration rapide des nouvelles technologies d'analyse génétique (**figure 37**) a permis une augmentation substantielle de notre compréhension de l'étiologie de l'infertilité masculine. Cependant, l'impact de ces connaissances dans le bilan génétique actuel des hommes azoospermes est encore limité. De plus en plus de preuves indiquent que l'ANO idiopathique est une condition complexe et hautement polygénique. Plus de 2000 gènes étant directement impliqués dans le processus spermatogénique, avec plus de 600 d'entre eux montrant une expression spécifique dans les cellules germinales mâles (**figure 38**). Il existe deux approches principales afin d'identifier de nouveaux gènes dans le cadre de l'infertilité : (I) l'approche des gènes candidats, et (II) les approches du génome entier (whole-genome).

A. Approche des « gènes candidats »

Cette première approche consiste à chercher des mutations chez des patients dans un ou plusieurs gènes cibles. Ces gènes sont sélectionnés à partir de modèles animaux (décrits plus tard), notamment de modèles murins ayant un phénotype proche de celui étudié. Les mutations seront cherchées par séquençage du gène orthologue humain (Jamsai and O'Bryan, 2011), en supposant que la fonction du gène cible est conservée pendant l'évolution. Une autre possibilité est de rechercher des mutations dans des paralogues à un gène précédemment identifié supposant que leur structure proche implique une fonction similaire.

Du fait de l'hétérogénéité génétique des phénotypes étudiés et au nombre souvent limité de patients disponibles pour cette approche longue de génétique classique, celle-ci est remplacée par l'approche dite "inverse" possible grâce à l'émergence des nouvelles technologies à haut débit comme les puces à ADN et le NGS (*Next-Generation Sequencing*) détaillés dans le paragraphe qui suit. Dans ces approches à haut débit, aucune hypothèse génique n'est avancée dès lors que le phénotype est bien décrit.

1. Résultats obtenus avec l'approche des « gènes candidats »

Ces dernières années ont vu l'explosion du nombre de publications présentant des études d'association entre différents variants ou polymorphismes et certains phénotypes d'infertilité masculine (Nutti and Krausz, 2008; Carrell and Aston, 2011). Ces études concernent des variants de différentes natures comprenant à la fois les variations nucléotidiques (SNP pour single nucleotide polymorphism) ou chromosomiques (CNVs pour variations de nombre de copies chromosomiques (décrits dans le paragraphe suivant)) (Aston, 2014).

Peu de résultats probants ont été obtenus, ces études présentent souvent de nombreuses faiblesses : **(1)** la plupart des variants retrouvés sont généralement à l'état hétérozygote, **(2)** l'échantillonnage des patients et des contrôles est souvent faible, **(3)** la méthodologie de l'étude parfois approximative (ethnies, âges, et phénotypes différents entre les groupes), et **(4)** il n'y a pas de validation par des tests fonctionnels des variants identifiés.

Ainsi, différents variants hétérozygotes ont été rapportés dans la littérature comme impliqué dans l'azoospermie, sans que des études ultérieures aient confirmées un réel impact, ou que l'impact réel de la mutation étudiée. Ceci a été le cas pour :

- *SYCP3* où une délétion hétérozygote de 1pb (643delA) chez deux de ces patients (Miyamoto et al, 2003), non retrouvée ultérieurement (Stouffs *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007; Gurkan *et al.*, 2013).

- *NR5A1* (*Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1*), qui régule la transcription de gènes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et code pour le facteur stéroïdogénique (SF-1) pour lequel des mutations ont été préalablement identifiées dans les insuffisances ovariennes prématurées (IOP) et certaines anomalies de la différenciation (Lin and Achermann, 2008; Lourenço *et al.*, 2009). Si des mutations non synonymes hétérozygotes ont été rapportées dans plusieurs cohortes (Bashamboo *et al.*, 2010; Zare-Abdollahi *et al.*, 2015; Ferlin *et al.*, 2015), le niveau de preuve de pathogénicité de ces mutations demeure insuffisant.

- *PRM1* et *UTP14C* (*UTP14C Small Subunit Processome Component*) où des variants ont été rapportées (Iguchi *et al.*, 2006b; Rohozinski *et al.*, 2006), mais secondairement retrouvées dans une large cohorte de patients fertiles remettant fortement en question leur implications dans ces phénotypes (Kichine *et al.*, 2008).

Certaines méta-analyses de plusieurs de ces études d'association révèlent déjà que seule une infime fraction des variants hétérozygotes ou polymorphismes identifiés peuvent être considérés comme associés significativement à l'infertilité tout en ayant un impact toutefois très modéré (Sato *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014a; Aston *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012; Aston and Conrad, 2013).

Les résultats peu concluants de ces études, basées sur l'approche gènes candidats, suggèrent cependant que seules les mutations homozygotes ou hétérozygotes composite auraient dû être considérées, seules situations mimant le KO (Knock-out) murin d'inactivation génique.

Cependant, l'approche gène candidat peut être utilisée secondairement à une analyse pangénomique comme cela a été démontré pour le gène *TEX11* pour lequel il a été identifié initialement une délétion hémizygote de 3 exons par hybridation génomique comparative (CGH) (Yatsenko *et al.*, 2015) ou d'autres gènes altérant la spermatogenèse comme *AURKC* (Dieterich *et al.*, 2007) ou *DPY19L2* (Koscinski *et al.*,

2011). Plus de détails sur la fonction, l'expression et l'implication des altérations de ce gène sont retrouvées dans le paragraphe spécifique sur le gène *TEX11*.

B. Approches pangénomique (whole-genome)

1. Puces à ADN et cartographie par homozygotie

a. L'hybridation génomique comparative (CGH)

La technique de CGH, mise au point en 1992 (Kallioniemi *et al.*, 1992), repose sur la comparaison du nombre de copies de fragments d'ADN entre deux échantillons, en les marquant chacun par un fluorochrome différents, puis en les hybridant ensemble sur des métaphases d'un témoin normal. Les signaux générés par les deux fluorochromes sont ensuite numérisés et un rapport du nombre de molécule d'ADN du patient par rapport à celui du témoin est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. Si le nombre de molécules des deux génomes est identique au niveau de la bande observée, le ratio d'intensité des deux fluorochromes au niveau d'une bande aura une valeur théorique proche de 1. Technique très intéressante pour la caractérisation de remaniement chromosomique de grande taille, elle présente comme limite la résolution des métaphases utilisées 5–10 Mb. Ceci a néanmoins été la base, vers la fin des années 90 (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998) du développement de la CGH sur lames sur lesquelles sont fixés des

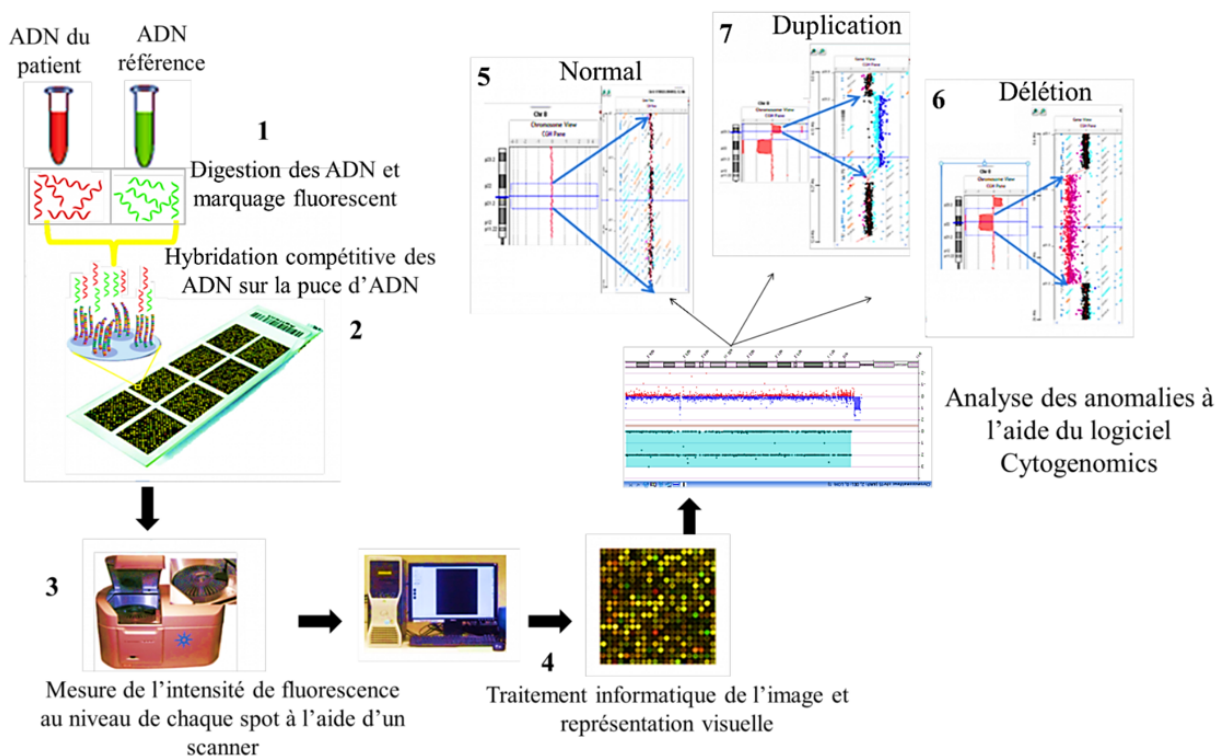


Figure 39 : Analyse chromosomique sur puces à ADN ou SNP-CGH array.

Les ADN du patient et du témoin sont fragmentés puis chacun est marqué par un fluorochrome de couleur différente (1). Un mélange d'une même quantité des deux ADN marqués est ensuite déposé sur une puce à ADN (2). Après l'étape d'hybridation (fixation des deux ADN marqués fluorescents sur leurs séquences ADN complémentaires fixées sur la lame), un scanner analyse les intensités de fluorescence au niveau de chacune des régions (3). Le résultat est exprimé sous forme visuelle pour chacun des chromosomes à la suite d'un traitement informatique (4). Les CNVs de l'ADN au niveau d'une région sont ensuite interprétés en utilisant différentes bases de données médicales disponibles. Ces CNVs sont alors classés en bénins (polymorphismes), pathogènes (responsables du phénotype) ou en VOUS (variants de signification inconnue) selon l'implication dans le phénotype.

fragments d'ADN dont la séquence est connue, appelés « sondes ». Il s'agit de la CGH sur réseau d'ADN, nommé CGH array.

b- L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH array

Comme pour la CGH sur métaphases, une déviation du rapport d'intensité de fluorescence au niveau des sondes fixées sur la lame sera utilisée pour montrer l'existence d'un déséquilibre génomique (**figure 39**). Cette technique permet la détection de déséquilibres chromosomiques (perte ou gain) dont la taille varie selon la résolution de la puce ou le nombre de sondes utilisées. Ceci a permis la mise en évidence des CNV pour « *Copy Number Variantion* » ou en français « Variation de Nombre de Copies ».

Il est également possible de fixer sur les lames, des oligonucléotides contenant des « *Single Nucleotide Polymorphisms* » ou SNPs. Ce sont des variations mineures du génome portant sur un seul nucléotide, qui sont fréquentes dans le génome humain. Ces puces dites puces à SNPs présentent l'avantage de pouvoir, en plus de la détection des CNVs, de détecter les pertes d'hétérozygotie (LOH, pour *Loss of heterozygosity*), de déterminer l'origine parentale d'un remaniement (avec l'étude des parents), et de calculer le coefficient de consanguinité.

Cette approche a été largement utilisée dans la compréhension des pathologies à transmission autosomique récessive, où l'on trouve plusieurs membres au sein d'une même fratrie consanguine atteints de la même maladie. Ces pathologies peuvent être étudiées par cartographie d'homozygotie, qui consiste à identifier des régions avec LOH communes à plusieurs patients et de localiser des gènes d'intérêt pouvant contenir la mutation responsable (**figure 40**).

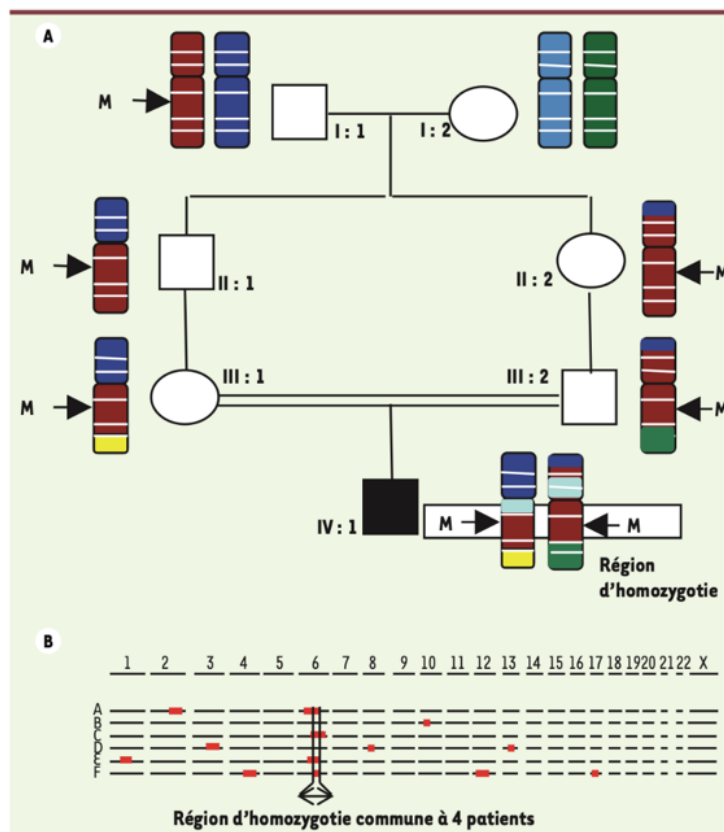


Figure 40: Cartographie d'homozygotie pour la localisation d'un gène pathogène. (Adaptée de Coutton *et al.*, 2012)

Dans le cadre de l'azoospermie, ceci a permis d'identifier différents gènes :

Ainsi, *TAF4B* (*TATA-Box Binding Protein Associated Factor 4b*) et *ZMYND15* (*Zinc Finger MYND-Type Containing 15*) ont été identifiés par cartographie d'homozygotie en étudiant deux familles consanguines Turques (Ayhan *et al.*, 2014). Les deux gènes sont connus pour jouer un rôle dans la spermatogenèse chez la souris, mais aucun n'a été étudié chez l'homme. Après la sélection des régions d'homozygotie communes entre les frères infertiles et le séquençage d'exome, des mutations délétères au niveau de *TAF4B* et *ZMYND15* ont expliqué le phénotype des patients.

2. Les technologies de séquençage de nouvelle génération

Contrairement au processus laborieux de criblage d'une mutation d'un seul gène par amplification exon par exon et séquençage de Sanger, le NGS permet le séquençage de plusieurs gènes, voir tout le génome, en une seule expérience avec un coût raisonnable (Metzker, 2010; Biesecker *et al.*, 2012).

Brièvement, le NGS se décompose en plusieurs étapes principales :

(1) la première consiste à digérer l'ADN génomique en fragments de petites tailles uniformes.

(2) la seconde étape, appelée « enrichissement » consiste à préparer les fragments fragmentés après fixation d'adaptateurs et amplification pour constituer une banque d'ADN appelée librairie. Cette étape n'est pas nécessaire en cas d'analyse de l'ensemble du génome.

(3) cette banque subit une étape d'amplification clonale spécifique à chaque fragment afin d'améliorer la qualité du signal obtenu.

(4) les fragments amplifiés seront séquencés, générant des signaux photoniques ou protoniques qui seront ensuite traduits en séquences nucléotidiques.

Ces quatre étapes sont presque identiques pour les différentes technologies NGS décrites ci-dessous.

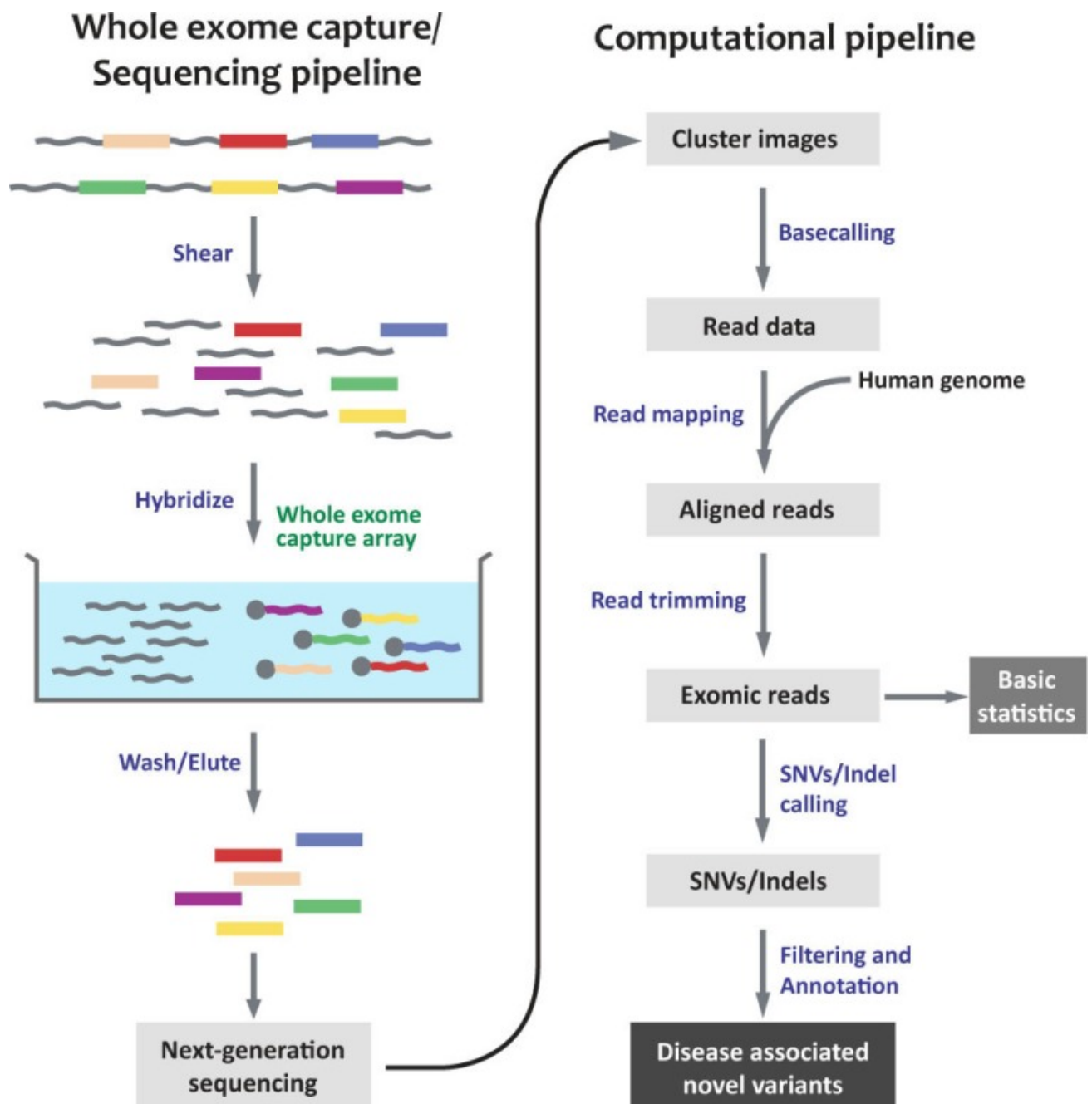


Figure 41 : Vue d'ensemble de la stratégie d'identification d'un variant candidat par séquençage exomique.

(Adaptée de Goh and Choi, 2012)

Les techniques de NGS peuvent être classées en deux grandes catégories : panels ciblés ou génome entier. Les méthodes ciblées (parfois également appelées « séquençage en panel ») comprennent l'étude d'un groupe de gènes. Le désavantage de cette stratégie est qu'elle exclut obligatoirement des gènes ayant des fonctions peu ou non connue, pourtant potentiellement susceptibles d'être associés à la pathologie étudiée. Cette approche ressemble à celle dite « gène candidat » mais avec un plus grand nombre de gènes. Néanmoins, l'utilisation de panel ciblé se justifie en diagnostic pour plusieurs raisons principales : (1) il permet une analyse des gènes dits actionnables ou pour lesquels une approche thérapeutique est possible, (2) il évite les découvertes fortuites sans rapport avec la pathologie, (3) la durée d'interprétation est plus simple et courte (Ghieh *et al.*, 2021).

Néanmoins, en génétique humaine, pour les pathologies avec grande hétérogénéité génétique, le séquençage de l'exome entier ou WES (*whole-exome sequencing*) constitue l'approche de première intention la plus largement utilisée, aujourd'hui, pour identifier de nouveaux gènes (**figure 41**) (Robinson *et al.*, 2011). Le WES permettrait d'identifier le gène « causal » dans plus de la moitié des cas (Gilissen *et al.*, 2012). Enfin, si l'exome représente environ 1.5% du génome humain, il contient 85% des mutations causant les maladies mendéliennes (Grada and Weinbrecht, 2013; Rabbani *et al.*, 2014). Au-delà du séquençage de l'exome entier, le séquençage du génome entier (WGS, pour *whole-genome sequencing*) est utilisé pour découvrir des variants dans l'ensemble du génome humain. Outre l'avantage de couvrir les régions non codantes et intergénomiques, le séquençage du génome entier ne nécessite pas d'enrichissement de la cible avant le séquençage. Un autre avantage important du séquençage du génome entier est la capacité de détecter des variants structuraux à l'échelle du génome (y compris les CNV) (Xi *et al.*, 2010; Koboldt *et al.*, 2013).

Les sous-types d'infertilité masculine les plus étudiés à l'aide du NGS sont les anomalies quantitatives : l'ANO et l'oligozoospermie (Robay *et al.*, 2018), avec la plus

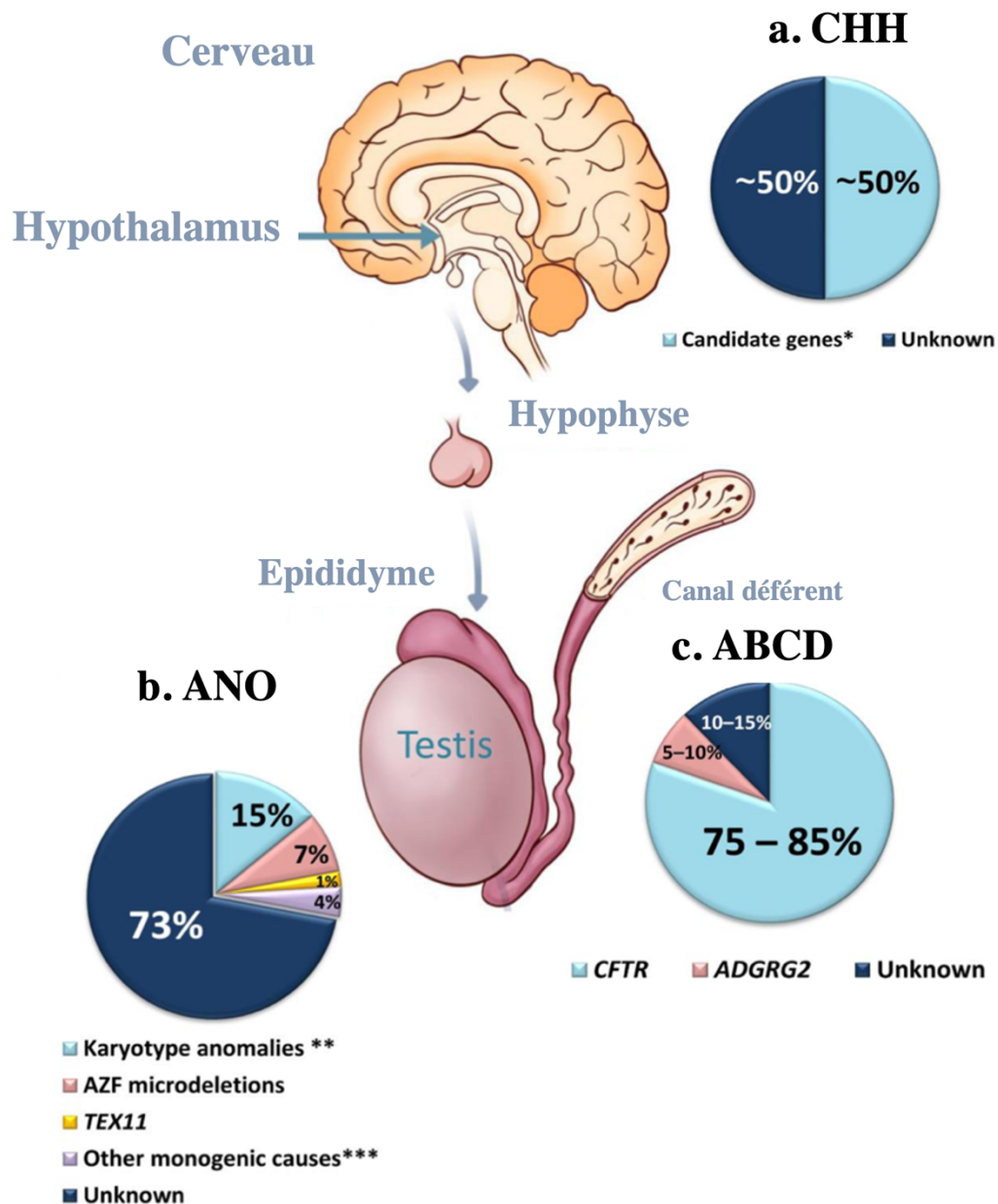


Figure 42 : Diagnostic des tests génétiques dans l'azoospermie.

(a) Hypogonadisme Hypogonadotrope Congénital (CHH) ; (b) ANO due à un échec testiculaire primaire après l'exclusion des causes acquises ; (c) ABCD. ** : syndrome de Klinefelter, 46, XX, microdélétions du chromosome Y. *** : (voir chapitre IV) (Adaptée de Cioppi *et al.*, 2021)

ancienne étude réalisée en 2013 (Lu *et al.*, 2014b) . Par la suite, plusieurs autres études ont utilisé le NGS et plus spécifiquement le WES pour évaluer les patients avec ANO, que ce soit dans des cohortes isolées ou dans des familles consanguines. Ces observations suggèrent un mode de transmission autosomique récessive du trait pathologique responsable de l'infertilité.

II. Résultats du séquençage de nouvelle génération dans l'azoospermie

Toutes les catégories étiologiques d'azoospermie comprennent des causes monogéniques. Certaines d'entre elles sont testées en routine comme l'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) et l'ABCD pour lesquels un panel de gènes doit être réalisé. Le rendement diagnostique des tests ci-dessus est différent dans les différentes catégories étiologiques, le plus élevé est dans l'ABCD et le plus faible en cas d'ANO périphérique (**figure 42**).

A. Azoospermie -obstructive

En 2016, Patat et ses collègues ont identifié 3 mutations tronquantes du gène *ADGRG2* chez 4 des 26 sujets ABCD sélectionnés avec des reins normaux et un gène *CFTR* de type sauvage non muté (Patat *et al.*, 2016). *ADGRG2* (*Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2*) est un gène du chromosome X codant pour un récepteur couplé à la protéine G de classe d'adhésion et est fortement exprimé dans les canaux efférents (Obermann *et al.*, 2003). Les souris mutantes *Adgrg2* développent une accumulation de liquide dans les canaux déférents, conduisant à un phénotype d'azoospermie obstructive, qui ressemble à celui observé chez les hommes porteurs de mutations *ADGRG2* (Davies *et al.*, 2004). Depuis, plusieurs cas ont été rapportés dans la littérature, (Yang *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2018; Pagin *et al.*, 2020), montrant que les mutations d'*ADGRG2* sont responsables du phénotype ABCD avec

des reins normaux, dans environ 20 % des cas inexplicés après une analyse complète du gène *CFTR*.

Malgré cette découverte ultérieure, 10 à 15 % des ABCD restent sans diagnostic génétique. Une partie de ces cas inexplicés de ABCD coexiste avec l'URA, suggérant un trouble de l'organogenèse précoce, situation différentes par rapport aux ABCD liées aux mutations de *CFTR* ou *ADGRG2*, résultant d'une dégénérescence progressive débutant dès la vie fœtale et se poursuivant probablement après la naissance (Bieth *et al.*, 2021). Le faible pourcentage de cas d'ABCD avec des reins normaux sans diagnostic génétique pourrait s'expliquer par des défauts dans des gènes supplémentaires. Par exemple, il a été proposé que le gène *SLC9A3* (*Solute Carrier Family 9 Member A3*) soit impliqué dans certains cas idiopathiques d'ABCD d'origine taïwanaise (Wu *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). De plus, des facteurs épigénétiques ou environnementaux pourraient contribuer au développement de cette maladie (Bieth *et al.*, 2021).

Aujourd'hui, il est admis que la prise en charge clinique des hommes atteints d'ABCD sans agénésie rénale doit inclure une analyse complète du gène *CFTR* (recommandations ANPGM : https://anpgm.fr/media/documents/ANPGM_074-v3-CFTR.pdf) et qu'en absence de mutations bialléliques, l'analyse de *ADGRG2* doit être réalisée (Ghieh *et al.*, 2021).

B. Azoospermie non-obstructive

La liste des défauts monogéniques dans les ANO est en augmentation constante, mais leur dépistage n'a pas encore été introduit dans le bilan diagnostique. Étant donné que le processus spermatogénique est intrinsèquement complexe et que plus de 2000 gènes y participent, une forte hétérogénéité génétique est observée. A l'heure actuelle, 45 gènes (Cioppi *et al.*, 2021 ; Houston *et al.*, 2021) ont été rapportés comme à l'origine d'une ANO en cas d'altération de leur séquence, et pour lesquels le phénotype reproducteur ressemble à celui observé chez la souris KO (sauf pour *WNK3* (*WNK Lysine Deficient Protein Kinase 3*) et *USP26* (*Ubiquitin Specific Peptidase 26*)) (**tableau**

3). Actuellement, seuls 20 d'entre eux ont atteint un niveau de preuve clinique « modéré » ou supérieur, selon les critères de classification proposés par Oud et ses collègues (Oud *et al.*, 2019) et ont été validés par plus d'une étude indépendante et seraient susceptibles d'être inclus dans un panel.

Ces gènes sont responsables soit d'une forme isolée d'ANO, soit de phénotypes complexes où l'azoospermie peut représenter l'un des symptômes cliniques. Il convient de noter que, pour certaines maladies congénitales, les caractéristiques syndromiques peuvent être non pénétrantes chez le patient, ainsi que dans la famille, ou peuvent ne devenir évidentes qu'avec l'âge. Par exemple, chez les patients mutés des gènes *FANCA* (*FA Complementation Group A*) ou *FANCM* (*FA Complementation Group M*) avec ANO, une surveillance devra être mise en place afin d'établir un diagnostic d'anémie de fanconi « occulte » à l'âge adulte. Ainsi, en cas de variants pathogènes dans ces gènes, une réévaluation clinique des patients et de leurs proches doit toujours faire partie du bilan diagnostique des hommes ANO.

À l'exception de *TEX11*, *USP26*, *AR* (*Androgen Receptor*) et *WNK3* qui sont liés à l'X, les gènes candidats restants sont mappés sur des autosomes. Hormis *DMRT1* (*Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1*), *NR5A1*, *PLK4* (Polo Kinase 4) et *WT1* (*WT1 Transcription Factor*) qui suivent le mode de transmission autosomique dominant avec des phénotypes souvent complexes et associant des malformations, seules les mutations récessives conduisent à des altérations quantitatives de la spermatogenèse (**tableau 3**).

Dans le tableau ci-dessous, nous présenterons les gènes rapportés en fonction des différents types histologies testiculaires associées. Jusqu'à présent, la catégorie histologique avec le plus grand nombre de défauts monogéniques est représentée par le phénotype d'AM, comprenant 27 gènes impliqués dans différents stades de la spermatogenèse (**tableau 3**), mais souvent décrits dans des familles consanguines, sans validation fonctionnelle, et donc avec un faible niveau de preuve, ne permettant pas d'avoir un impact sur la prise en charge des patients, principalement avant la réalisation d'une biopsie testiculaire.

Gène	Locus	Fonction	Phénotypes reproductifs murins	Ségrégation dans la famille	Plus qu'un patient non apparenté	Cohortes indépendantes
Phénotype testiculaire : SCOS						
FANCA	16q24.3	Réparation de croisement interbrin	Méiose mâle anormale, diminution du nombre de cellules germinales, diminution du nombre de follicules ovariens matures, absence de follicules ovariens	Oui	Oui	Non
PLK4	4q28.1	Duplication du centriole pendant le cycle cellulaire	Diminution du nombre de cellules germinales mâles	Non	Non	Non
USP26	Xq26.2	Régulation du renouvellement des protéines au cours de la spermatogenèse, et module le niveau d'ubiquitination du récepteur aux androgènes	Normal	Non	Non	Non
WNK3	Xp11.22	Régulation d'électrolytes, homéostasie, signalisation cellulaire, survie et prolifération	Normal	Oui	Non	Non
NANOS1	10q26.11	Maintenance des cellules souches germinales	Souris Nanos1 ^{-/-} : Développement et fertilité normaux	Non	Oui	Oui
Phénotype testiculaire : AM						
ADAD2	16q24.1	Protéine de liaison à l'ARNdb, édition d'ARN	Infertilité mâle et femelle	Oui	Oui	Oui
C14ORF39	14q23.1	Synapsis durant la recombinaison méiotique	Arrêt de la méiose mâle, formation anormale de chiasmas, synapse chromosomique anormale, synapse X-Y anormale pendant la méiose mâle, absence d'ovocytes	Oui	Oui	Non
DMC1	22q13.1	Réparation des CDBs pendant la recombinaison méiotique	Arrêt de la méiose mâle diminution du nombre d'ovocytes, absence d'ovocytes, absence de follicules ovariens, méiose femelle anormale	Oui	Non	Non
KASH5	19q13.33	Attachement des télomères méiotiques à l'enveloppe nucléaire dans la prophase de la méiose, appariement d'homologues pendant la prophase méiotique	Arrêt de méiose mâle, infertilité mâle et femelle	Oui	Non	Non

MAJIN	11q13.1	Attachement des télomères méiotiques à la membrane interne du noyau pendant l'appariement homologue et la synapse	Arrêt de méiose mâle, infertilité mâle et femelle	Non	Non	Non
MEI1	22q13.2	Synapsis chromosomique méiotique, formation de CDB	Arrêt de méiose mâle, infertilité mâle et femelle	Oui	Oui	Oui
MEIOB	16p13.3	Réparation de CDBs, formation de crossing-over et promotion pour compléter la synapsis	Arrêt de la spermatogenèse, diminution du nombre d'ovocytes, absence d'ovocyte	Oui	Oui	Oui
MSH4	1p31.1	Recombinaison des chromosomes homologues et ségrégation pendant la méiose I	Azoospermie, méiose mâle et femelle anormale	Non	Oui	Oui
RAD21L1	20p13	Composant méiose-spécifique d'un complexe de cohésines	Arrêt de la méiose mâle, absence d'ovocytes, diminution du nombre de follicules ovariens matures, absence de follicules ovariens primordiaux	Oui	Non	Non
RNF212	4p16.3	Régulateur de crossing-over pendant la méiose	Arrêt de méiose mâle, infertilité mâle et femelle	Oui	Non	Non
SETX	9q34.13	Traitement de l'ADN et de l'ARN	Arrêt de la méiose mâle, globozoospermie, réduction de la fertilité femelle	Non	Oui	Oui
SHOC1	9q31.3	Se lie à l'ADN simple brin et aux structures ramifiées d'ADN ; formation d'intermédiaires de crossing-over	Arrêt de méiose mâle	Oui	Oui	Oui
SPINK2	4q12	Inhibiteur de l'acrosine	Flagelle anormal du spermatozoïde, oligozoospermie, tératozoospermie, apoptose des cellules germinales mâles	Oui	Non	Non
SPO11	20q13.31	Initiation des CDBs	Arrêt de la méiose mâle, diminution du nombre d'ovocytes, dégénérescence des ovocytes, méiose femelle anormale	Oui	Non	Non
STAG3	7q22.1	Cohésion des chromatides sœurs, réparation des CDBs	Azoospermie, absence d'ovocytes	Oui	Oui	Oui
STX2	12q24.33	Transporteur de sulfoglycolipides	Arrêt de méiose mâle	Non	Non	Non
SYCE1	10q26.3	Synapsis méiotique	Arrêt de la méiose mâle, diminution du nombre de follicules ovariens matures	Oui	Oui	Oui
TDRD7	9q22.33	Traitement de l'ARN	Arrêt de la spermatogenèse, apoptose des cellules germinales mâles	Oui	Oui	Non

TERB1	16q22.1	Attachement des télomères méiotiques à la membrane interne du noyau pendant l'appariement homologue et la synapsis	Arrêt de la méiose mâle, absence d'ovocytes, absence de follicules ovariens, blocage de méiose I chez les femelles	Oui	Oui	Oui
TERB2	15q21.1	Attachement des télomères méiotiques à la membrane interne du noyau pendant l'appariement homologue et la synapsis	Arrêt de la méiose mâle, absence de follicules ovariens, méiose femelle anormale	Oui	Non	Non
TEX11	Xq13.1	Synapsis chromosomique et formation de crossing-over	Arrêt de la méiose mâle, non-disjonction méiotique au cours de la phase M1	Oui	Oui	Oui
XRCC2	7q36.1	Réparation de CDB	Arrêt méiotique, IOP	Oui	Non	Non
ZMYND15	17p13.2	Répresseur transcriptionnel	Azoospermie	Oui	Non	Non
ZSWIM7	17p12	Recombinaison homologue en favorisant l'assemblage de RAD51 et DMC1 sur des intermédiaires de recombinaison homologue méiotiques	Infertilité, taille réduite des testicules, réduction du nombre des cellules germinales post-méiotiques, nombreux spermatocytes arrêtés en pachytène	Non	Oui	Oui
PNLDC1	6q25.3	Maturation des extrémités 3' des piARN par maturation des pré-piARN de 30 à 40 nt en piARN.	Défauts méiotiques et de spermiogénèse, dû à l'activation de rétrotransposons LINE1.	Non	Oui	Non
SYCP2	20q13.33	Formation du SC et synapsis des chromosomes homologues	Infertilité, anomalies de la synapsis des chromosomes et apoptose des cellules germinales	Non	Non	Non
HFM1	1p22.2	Formation des crossing-over et de la synapsis	Stérilité mâle et femelle dû au blocage de la spermatogénèse et l'ovogénèse, altération de la synapsis	Non	Non	Oui
Divers types de phénotypes testiculaires : SCOS/AM/hypospermatogénèses						
DMRT1	9p24.3	Détermination et différenciation du sexe masculin	Méiose mâle anormale, infertilité mâle	Oui	Oui	Oui
FANCM	14q21.2	Réparation de CDB, élimination de croisement inter-brin	Azoospermie, diminution du nombre de follicules ovariens matures	Oui	Oui	Oui
M1AP	2p13.1	Progression de la méiose I	D'arrêt méiotique mâle à oligozoospermie/globozoospermie sévère	Oui	Oui	Oui
NANOS2	19q13.32	Maintient le pool de SSC	Azoospermie, méiose femelle anormale	Oui	Oui	Non
NR5A1	9q33.3	Activateur transcriptionnel pour la détermination du sexe	D'oligozoospermie à arrêt de la spermatogénèse. Diminution du nombre de follicules ovariens matures à absence de follicules ovariens matures	Oui	Oui	Oui

TAF4B	18q11.2	Coactivateur transcriptionnel	Oligozoospermie, diminution du nombre de cellules germinales mâles, asthénozoospermie, absence de follicules ovariens matures, altération de la folliculogénèse ovarienne	Oui	Non	Non
TDRD9	14q32.33	Répression d'éléments transposables durant la méiose	Arrêt de méiose mâle	Oui	Non	Non
TEX14	17q22	Formation de ponts intercellulaires méiotiques	Arrêt de méiose mâle	Oui	Oui	Oui
TEX15	8p12	Synapsis et réparation des CDBs	Arrêt de méiose mâle	Oui	Oui	Oui
WT1	11p13	Facteur de transcription	Azoospermie	No	Oui	Oui
Phénotype testiculaire non défini						
MCM8	20p12.3	Réparation des CDBs, élimination de croisement inter-brin	Arrêt de la méiose mâle, diminution du nombre d'ovocytes, diminution du nombre de follicules ovariens matures, augmentation de l'incidence des tumeurs ovariennes, augmentation de l'incidence des adénomes ovariens	Oui	Non	Non
PSMC3IP	17q21.2	Stimule l'échange de brins médié par DMC1 nécessaire à l'appariement des chromosomes homologues pendant la méiose.	Arrêt de la méiose mâle, absence de follicules ovariens, développement anormal des ovaires	Oui	Non	Non
AR	Xq12	Médiation de la plupart des effets des androgènes dans les tissus cibles des androgènes	Arrêt de la méiose	Non	Oui	Oui

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des gènes candidats identifiés en ANO humaine

III. Validation des gènes candidats

Pour chaque variant/gène candidat, l'enjeu principal est de valider le lien direct entre le variant identifié et le phénotype du patient. Les modèles cellulaires ou animaux sont donc essentiels pour confirmer le lien entre un défaut génique et un phénotype. En raison de l'homologie génétique importante entre la souris et l'homme, le modèle murin est désormais l'un des meilleurs modèles pour confirmer et caractériser les défauts génétiques identifiés chez l'homme, et cela est particulièrement vrai pour les troubles de la reproduction masculine.

Les souris mutantes étaient « historiquement » générées à l'aide de stratégies ciblées de modification du génome par recombinaison homologe dans des cellules Embryonnaires Souches (ESCs) (Nguyen *et al.*, 2011). Des souris chimériques peuvent ensuite être créées en injectant des cellules ESCs modifiées dans des blastocystes (Capecchi, 2005).

Même si cette technique constitue une avancée scientifique majeure dans le domaine d'édition du génome, elle est cependant coûteuse, avec des fréquences d'événements souhaités rare ($<0,01\%$) (Capecchi, 1989). Récemment, l'utilisation de nucléases artificielles spécifiques à un site, telles que la nucléase à doigt de zinc (ZFN) et les activateurs transcriptionnels, les nucléases effectrices (TALEN), ont permis l'édition du génome sans l'utilisation de cellules ESCs (Barman *et al.*, 2017). Cependant, les difficultés associées à la conception et à la synthèse des nucléases ont limité l'adoption généralisée de ces technologies.

La technique CRISPR (*clustered regular interspersed short palindromic repeats*)/Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*), qui ne nécessite pas la synthèse de protéines spécifiques pour chaque cible génomique, est récemment apparue comme la méthode de choix pour produire des mutations dans des cellules ou des modèles animaux (Sapranauskas *et al.*, 2011). Cette nouvelle méthode est un système d'édition du génome, dérivée du système immunitaire adaptatif des bactéries (Jinek *et al.*, 2012). Cette technologie a été adaptée pour fonctionner de manière similaire sur le génome des mammifères.

Ce système nécessite l'utilisation d'une molécule d'ARN chimérique (sgRNA, pour *single guide RNA*) et la nucléase Cas9 (**figure 43**). La Cas9 nécessite, la reconnaissance d'un motif appelé PAM (*protospacer adjacent motif*), une séquence de trois nucléotides exactement adjacents à l'extrémité 3' du brin complémentaire de la séquence cible afin de la cliver. Dans le cas de *Streptococcus pyogenes*, la Cas9 reconnaît le motif PAM 5'-NGG-3' (N correspondant à n'importe quelle base), situé à 3 paires de base en 3' du site de clivage sur le brin d'ADN non complémentaire (Doudna and Charpentier, 2014). En pratique, le complexe sgRNA-Cas9 sera introduit dans la cellule par différents systèmes de livraison : soit par des systèmes non viraux comme l'électroporation, les nanoparticules ou la micro-injection ; soit par des systèmes viraux à base de plasmides (revue dans Liu *et al.*, 2017). Une fois dans la cellule, le sgRNA guide la Cas9 vers la séquence génomique cible, et la Cas9 agit ensuite comme une paire de ciseaux pour cliver cette séquence en induisant une CDB (**figure 43**).

La cassure double brin d'ADN générée peut être auto-réparée par la cellule selon deux mécanismes : soit par le système de réparation aléatoire NHEJ (*nonhomologous end joining*) ou le système de réparation dirigée HDR (*homology-directed repair*).

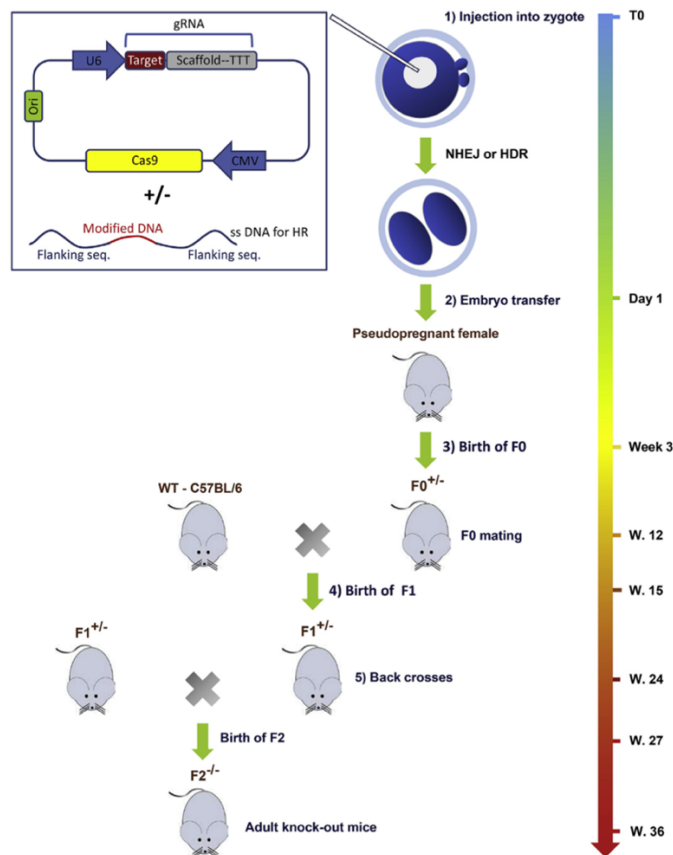


Figure 44: Création de souris KO/KI à l'aide du système CRISPR/Cas9.

(1) Une injection minimale contiendra un plasmide eucaryote permettant la transcription du sgRNA et de la Cas9 (encadré à gauche). La protéine Cas9 sera alors produite par la machinerie endogène de l'ovocyte. Pour obtention d'animaux knock-in (KI) par HDR, une co-injection d'un ADN simple brin (ss) est nécessaire. Le plasmide et, si besoin, l'ADNss, sont micro-injectés dans les pronuclei de zygotes de souris. (2) Les embryons obtenus sont transférés dans des femelles pseudogestantes. (3) Le génotypage des souris obtenues par séquençage de Sanger permet l'identification de souris fondatrices (F0) portant des indels de décalage de cadre (ou la séquence de choix correctement insérée pour un KI). Parce que le système CRISPR/Cas9 peut rester actif après plusieurs divisions mitotiques, les souris fondatrices peuvent être mosaïques, portant différentes mutations. (4) L'obtention de la lignée mutantes par des reproductions des souris fondatrices avec des souris sauvages (WT) (ici souche C57BL/6J) permet la ségrégation des allèles et la transmission à la génération suivante : les souris F1. Le séquençage de Sanger permet l'identification de souris F1 avec le même indel de décalage de cadre hétérozygote. (5) L'élevage de ces souris ensemble conduit à la production de souris F2 comprenant normalement 50 % d'hétérozygotes, 25 % d'homozygotes mutés et 25 % de souris WT. La lignée de souris est établie et peut être maintenue pour la caractérisation phénotypique et d'autres travaux fonctionnels.

(Adaptée de Kherraf *et al.*, 2018)

La réparation par le système NHEJ, entraîne la production des mutations de type InDels (petites insertions et délétions). Une mutation « frameshift » se produit lorsque la séquence cible se trouve dans une région codante et que le nombre de nucléotides impliqués n'est pas un multiple de trois. Cela provoque un décalage du cadre de lecture ainsi qu'une instabilité de l'ARNm. Le système NMD (*non-sens mediated mRNA decay*) peut identifier et dégrader l'ARN transcrit à partir du gène muté, ou, ce dernier peut être transcrit en une protéine tronquée non fonctionnelle. Cette approche est intéressante pour éliminer la fonction d'un gène donné (KO).

La réparation par le système HDR implique la co-injection d'une matrice de réparation sous forme d'un simple-brin d'ADN (ssDNA, pour *single stranded DNA*) (Hsu et al, 2014). Cette matrice, de taille moyenne de 100 pb, doit présenter une homologie avec les séquences flanquants de la région cible. Cette voie de réparation peut être utilisée pour introduire des altérations souhaitables dans la région cible comme des mutations (souris knock-in (KI)).

Des animaux mutants homozygotes peuvent être obtenus après 1 ou 2 rétrocroisements permettant de créer ainsi des animaux KO spécifiques en quelques mois seulement (**figure 44**).

L'introduction du système CRISPR/Cas9 dans le monde de l'édition du génome a conduit à la création rapide de souris KO dans de nombreux domaines, dont l'étude de la fertilité. De très nombreux gènes se sont révélés comme indispensables à la fertilité chez la souris en utilisant cette technologie, comme *Hrob* (arrêt méiotique), *Ppp3r2* (anomalies de fécondation), *Ccdc63* (anomalies de flagelle) et *Cabyr* (anomalies de mobilité) (Miyata *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2016; Hustedt *et al.*, 2019).

Certaines lignées de souris mâles mutantes pour des gènes exprimés principalement dans les testicules, sont cependant fertiles (Lu *et al.*, 2019);(Miyata *et al.*, 2016); (Okabe, 2014). Ceci suggère l'importance de ne pas se baser uniquement sur les profils d'expression tissulaire, et de bien prendre en considération les différences entre la

souris et l'homme. Une analyse transcriptomique récente des sous-types de cellules germinales humaines a révélé une transcription dynamique de plus de 4000 gènes au cours de la spermatogenèse chez l'homme (Jan *et al.*, 2017). Beaucoup de ces gènes doivent encore être analysés avec l'approche KO.

Pour de nombreuses pathologies, il a été développé des modèles cellulaires capables d'analyser l'impact d'un variant par simple modification de la séquence génique, en utilisant désormais principalement la technologie CRISPR/Cas9 (Strikoudis *et al.*, 2019) (Kim *et al.*, 2019) (Antao *et al.*, 2020)(Gopal *et al.*, 2020). Ceci nécessite néanmoins la production de la protéine d'intérêt dans le modèle cellulaire. Si jamais celle-ci n'est pas produite, alors il faudra induire sa production de façon artificielle. Ceci est principalement retrouvé dans l'étude de la fertilité et en particulier de la méiose.

En outre, la technologie CRISPR/Cas9 a le potentiel d'offrir une promesse thérapeutique pour corriger des mutations génétiques entraînant une infertilité. Récemment, Li et collaborateurs (Li *et al.*, 2019) ont établi une nouvelle stratégie de traitement efficace pour l'ANO, causée par des anomalies génétiques des cellules germinales. Grâce à une combinaison d'isolement des cellules souches spermatogoniales (SSC), d'édition de gènes médiée par CRISPR/Cas9 et de transplantation des SSC dans le modèle murin Kit^W/Kit^{WV} (mutant hétérozygote pour le gène *c-Kit* qui contrôle la différenciation des cellules germinales), la spermatogenèse a été restaurée chez ces souris et des descendants sains avec le gène *Kit* de type sauvage. Ces animaux ont été obtenus, par accouplement naturel, 4 mois seulement après la transplantation des SSC.

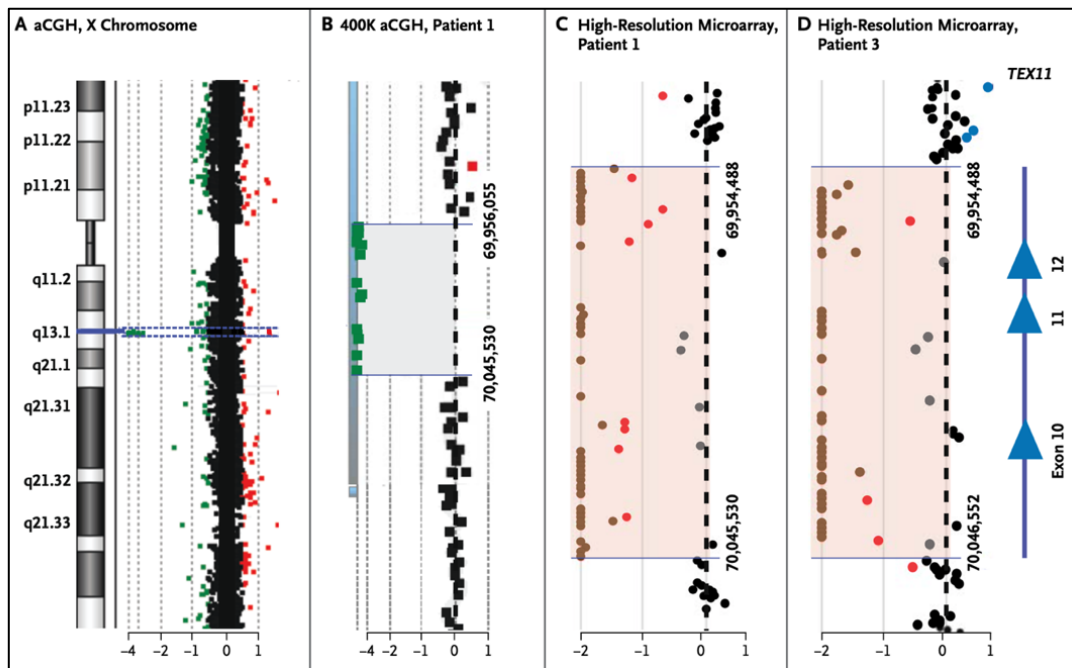


Figure 45 : Délétion hémizygote des exons *TEX11* 10 à 12 et des régions introniques flanquantes chez deux patients azoospermes.

(A) Profil d'hybridation génomique comparative (aCGH) du chromosome X. A gauche, un idiogramme du chromosome X montre une région d'intérêt (ligne bleue) au niveau de la bande Xq13.2. Sur la droite, les points représentent des sondes d'ADN oligonucléotidiques, disposées en fonction de leurs emplacements physiques sur le chromosome X. (B) Zoom de la région délétée (zone ombrée en gris) chez le patient 1. Les coordonnées génomiques (assemblage GRCh37/hg19) de la délétion sont 69 956 055 - 70 045 530 nucléotides. (C) et (D) Profils de la délétion hémizygote qui englobe les exons 10 à 12 (flèches bleues) (points bruns et rouges ; zones ombrées en rose) de *TEX11* chez le patient 1 (C) et le patient 3 (D). (Adaptée de (Yatsenko *et al.*, 2015))

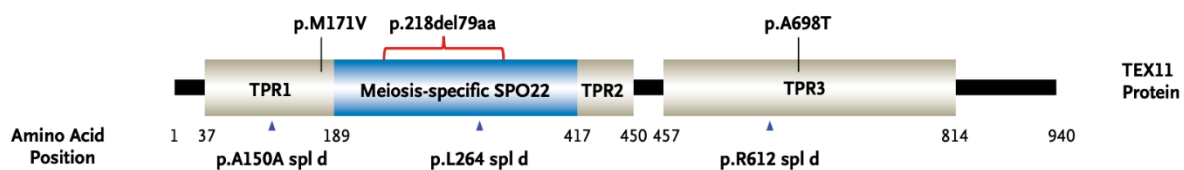


Figure 46 : Localisation d'une délétion exonique et des mutations identifiées dans les domaines protéiques de *TEX11* chez l'Homme.

Le gène *TEX11* contient différents domaines prédits: des domaines tétratricopeptides (TPR) (positions d'acides aminés 37-188, 418-450 et 457-814) et un domaine supposée de liaison à *SPO22* (positions d'acides aminés 189-417). Les mutations dans la région codante (lignes noires verticales) et les variants d'épissage (flèches bleues) sont situées dans ces domaines prédits. Le crochet rouge montre la délétion exonique qui englobe 79 acides aminés du domaine *SPO22* (35 % de la longueur totale du domaine *SPO22*). (Adaptée de Yatsenko *et al.*, 2015)

IV. Le gène *TEX11*

A. Altérations du gène *TEX11* et azoospermie non-obstructive

Les anomalies du gène *TEX11* (*testis expressed 11*) sont rapportées de façon récurrente chez les hommes avec ANO (cf paragraphe précédent).

Une première étude concernant *TEX11*, utilisant l'hybridation génomique comparative (CGH) à haute résolution, a montré la perte de trois exons du gène *TEX11* (exons 10-12) (**figure 45**) chez deux patients atteints d'azoospermie. Cette perte induit une délétion de 79 acides aminés au sein du domaine *SPO22*, (*Sporulation specific protein 22*) (Yatsenko *et al.*, 2015) (**figure 46**). Dans un 2^{ème} temps, il a été rapporté cinq mutations de ce gène chez 7 patients, soit 2,4% de cette cohorte de patients azoospermiques (Yatsenko *et al.*, 2015).

Puis, de façon récurrente, des mutations du gène *TEX11* sont rapportées dans la littérature (Yang *et al.*, 2015)(Nakamura *et al.*, 2017) (Sha *et al.*, 2018) (Yu *et al.*, 2021)(Ji *et al.*, 2021); (An *et al.*, 2021)(Krausz *et al.*, 2020) faisant de celui-ci un gène majeur pour expliquer l'étiologie des ANO (**tableau 4**).

En 2015, Zhang et Coll. ont exploré l'association possible entre les SNP dans *TEX11* et l'infertilité masculine idiopathique (Zhang *et al.*, 2015). Le génotype d'un polymorphisme homozygote rs6525433 était significativement associé à l'oligozoospermie, indiquant que ce polymorphisme joue un rôle dans l'infertilité masculine. Ce SNP non-synonyme (K130A) pourrait avoir un effet négatif sur la structure de la protéine. Si aucune association entre un autre SNP (rs4844247) et l'infertilité masculine n'a été observée, les hommes porteurs des 2 SNPs présenteraient un risque accru d'infertilité (**tableau 4**).

Enfin, une étude a analysé l'expression de *TEX11* chez des individus contrôles et des patients avec ANO (Boroujeni *et al.*, 2018) par RT-qPCR. Un niveau d'expression significativement réduit a été observé aussi bien chez les patients SCOS que chez les patients atteints d'AM. Si ces résultats suggèrent que l'expression de ce gène est

nécessaire pour l'achèvement de la spermatogenèse humaine, les auteurs ont également suggéré que le niveau de protéine TEX11 doit être supérieur à un seuil critique pour que la méiose progresse, et que les allèles *TEX11* à faible expression puissent ainsi entraîner une infertilité masculine chez l'homme. Néanmoins, l'absence de cellules germinales pourrait également expliquer ce taux réduit de TEX11 dans le cas de SCOS (Boroujeni *et al.*, 2018) .

Études	Changement nucléotidique	Type de mutation	Exon/Intron	Nombre des patients avec l'altération
Ji et al, 2021	c.1796 + 2T > G	Mutation par site d'épissage	Intron 21	2 frères
	c.1426-1C > T	Mutation par site d'épissage	Intron 16	4 frères d'une génération et 3 frères d'une deuxième génération
	c.2613G > T	Mutation non-synonyme	Exon 29	2 frères jumeaux
	c.1051G > T	Mutation non-synonyme	Exon 13	1
	c.1254dupA	Duplication	Exon 15	1
	c.298delG	Délétion	Exon 4	1
An et al, 2021	c.857delA	Délétion	Exon 10	1
	c.2240C→A	Mutation non-synonyme	Exon 26	1
	c.1337G→T	Mutation non-synonyme	Exon 16	1
	c.466A→G	Mutation non-synonyme	Exon 7	1
Yu et al, 2021	c.1246C→T	Mutation non-synonyme	Exon 16	1
Krausz et al, 2020	151_154del	Délétion frameshift	Exon 3	1
Cannarella et al, 2020	c.84_651del	Délétion	Exon 4-9	1
	c.2288T→C	Mutation non-synonyme	Exon 26	1
Sha et al, 2018	c.776C→T	Mutation non-synonyme	Exon 9	1
	c.2653G→T	Mutation non-synonyme	Exon 29	2 frères
Nakamura et al, 2017	c.511 A→G	Mutation non-synonyme	Exon 8	1
Yatsenko et al, 2015	c.652del237bp	Délétion	Exons 10-12	2 patients non-apparentés
	c.450C→T	Mutation par site d'épissage	Exon 7	1
	c.511A→G	Mutation non-synonyme	Exon 8	1
	c.792+1G→A	Mutation par site d'épissage	Intron 11	1
	c.1837+1G→C	Mutation par site d'épissage	Intron 22	1
Yang et al, 2015	c.2092G→A	Mutation non-synonyme	Exon 25	1
	c.349T→A	Mutation non-synonyme	Exon 6	1
	c.405C→T	Mutation synonyme	Exon 6	1
	c.424G→A	Mutation non-synonyme	Exon 7	1
	c.515A→G	Mutation non-synonyme	Exon 7	1
	c.731C→T	Mutation non-synonyme	Exon 10	1

	c.1258Ins (TT)	Insertion frameshift	Exon 16	1
	c.2243T→C	Mutation non-synonyme	Exon 26	1
	c.2319T→C	Mutation synonyme	Exon 27	1
	c.-17T→C	Mutation intronique	Intron 3	1
	c.-48G→A	Mutation intronique	Intron 5	1
	c.+42C→A	Mutation intronique	Intron 10	1
	c.-28T→C	Mutation intronique	Intron 12	1
	c.-64G→A	Mutation intronique	Intron 15	1
	c.-1G→A	Altération du site accepteur d'épissage	Intron 21	1
	c.-37A→G	Mutation intronique	Intron 22	1
	c.+119G→A	Mutation intronique	Intron 24	1
	c.-55A→C	Mutation intronique	Intron 27	1
	c.-44A→G	Mutation intronique	Intron 28	1
Zhang et al, 2015	c.344A/G /	Polymorphisme non-synonyme rs6525433 Polymorphisme rs6525433-rs4844247	/	Population Chinoise

Tableau 4 : Bilan des mutations et polymorphismes du gène TEX11 décrites dans la littérature dans le cadre d'ANO

B. Identification, conservation et expression du gène *Tex11*

Le gène *Tex11* a été initialement identifié, chez la souris, comme spécifique des cellules germinales mâles (Bellil *et al.*, 2021). En effet, dans une recherche systématique de gènes exprimés dans les spermatogonies murines et absents des tissus somatiques, Wang *et al.*, (2001) ont identifié 25 gènes, dont 19 nouveaux, exprimés uniquement dans les cellules germinales mâles. Sur les 25 gènes, 3 sont liés au chromosome Y et 10 sont sur le chromosome X, suggérant que le chromosome X joue un rôle prédominant dans les stades pré-méiotiques de la spermatogenèse des mammifères. L'un de ces nouveaux gènes du chromosome X murin est le gène *Tex11*.

Chez l'Homme, Wang *et al.*, (2001) ont identifié une séquence d'ADNc de *TEX11*. Ce gène est hautement conservé chez les vertébrés (140 orthologues), confirmant un rôle potentiel important pour la gamétogenèse. *TEX11* possède 2 transcrits (NM_001003811 et NM_031276) qui codent pour des protéines de 940 et 925 acides aminés respectivement. Chez la souris, on trouve également deux transcrits (NM_031384 et NM_001167997) codant pour des protéines de 947 et 707 acides aminés respectivement. La séquence protéique de ce gène contient plusieurs motifs TPRs (tétratricopeptides) potentiellement impliqués dans les interactions protéine-protéine, et un domaine SPO22. Ce dernier a été nommé ainsi en référence au gène *Spo22* initialement mis en évidence chez la levure. *Tex11* a initialement été nommé *Zip4h* étant orthologue de *ZIP4* d'*Arabidopsis thaliana*.

Chez la souris, les transcrits *tex11* sont exprimés dans les testicules, et la protéine *TEX11* est observée dans le cytoplasme et les noyaux des spermatogonies de type B, avec le niveau le plus élevé dans les spermatocytes zygotènes, et un niveau basal dans les spermatocytes pachytènes tardifs (Wang *et al.*, 2001);(Adelman and Petrini, 2008). L'expression abondante de la protéine *TEX11* dans les spermatogonies de type B et les spermatocytes précoces suggèrent un rôle clé de *TEX11* pour un développement précoce des cellules germinales. Dans les spermatocytes de souris, les foyers *TEX11* sont observés uniquement sur les régions appariées des chromosomes au stade

zygotène et pachytène précoce (~110 foyers par cellule), suggérant que TEX11 pourrait jouer un **rôle dans l'appariement des chromosomes homologues** (Yang *et al.*, 2008). De même, TEX11 a été détectée sur les chromosomes méiotiques femelles, suggérant que la protéine exerce une fonction méiotique similaire chez les deux sexes. En effet, une expression est également retrouvée dans les cellules germinales fœtales, à 15.5jpc, stade où les ovocytes sont en leptotène et zygotène de prophase I (Adelman and Petrini, 2008), alors qu'il n'y a plus d'expression dans les ovocytes de souris adultes. Cet ensemble de résultats démontre l'importance de la protéine dans les mécanismes méiotiques (cf chapitre II paragraphe « protéine de la recombinaison méiotique »). De même, chez l'homme, TEX11 a été détecté dans les spermatocytes du pachytène tardif (stade V) et dans les spermatides rondes et allongées. L'expression de TEX11 était complètement absente dans les cellules somatiques environnantes, telles que les cellules de Sertoli et les cellules interstitielles.

Chez le porc, il a également été montré que TEX11 est également exprimé exclusivement dans les cellules germinales du testicule adulte. L'expression de TEX11 porcin est corrélée avec le début de la méiose, de façon similaire aux observations chez la souris (Tang *et al.*, 2011).

Le rôle de ce gène dans la synapse est en outre soutenu par la colocalisation de TEX11 avec des foyers de RPA, présents sur les régions appariées (Plug *et al.*, 1997) ; (Moens *et al.*, 2002). Il est important de noter que TEX11 interagit également avec SYCP2, nécessaire à la formation du CS (vu chapitre II) (Yang *et al.*, 2006). TEX11 pourrait donc contribuer à l'allongement ou à la stabilisation du SC. En l'absence de TEX11, la synapsis chromosomique peut être initiée mais pas propagée ou maintenue (Yang *et al.*, 2008). Plusieurs sources de preuves soutiennent la conclusion que TEX11 joue également un **rôle distinct dans la recombinaison méiotique** :

- i. Une majorité de foyers TEX11 chevauchent des foyers RPA et des foyers MSH4, qui correspondent aux nodules méiotiques de transition. La formation de foyers TEX11 entre les éléments latéraux du CS des spermatocytes *Sycp1^{-/-}* en

pachytène démontre en outre que même si l'appariement des chromosomes n'est pas adéquat *TEX11* est maintenu sur les nodules méiotiques, suggérant que *TEX11* fasse partie d'un complexe de recombinaison, indépendamment de la synapse (Yang *et al.*, 2008).

- ii. Si la perte de *Tex11* provoque un effet modéré sur l'initiation et/ou le maintien de la synapsis ; un effet plus sévère sur la formation des crossing-over est observé. En particulier, le nombre de foyers MLH1 dans les spermatocytes des souris *Tex11^{-Y}*, présentant une synapsis normale, est considérablement réduit, suggérant que le rôle de *Tex11* dans la formation de crossing-over est distinct de son rôle dans la synapsis.
- iii. Les levures mutantes pour *Zip4* et les plantes *Arabidopsis* mutantes pour *Zip4* présentent des défauts dans la formation des crossing-overs, démontrant la conservation évolutive des fonctions *TEX11*/*ZIP4* dans la recombinaison méiotique (Tsubouchi *et al.*, 2006);(Chelysheva *et al.*, 2007);(Kuromori *et al.*, 2008).

C. Modèles murins et fonction du gène *Tex11*

Deux modèles de souris mutantes pour le gène *Tex11* ont été créés et publiés en 2008:

- Yang et collaborateurs ont généré des souris *Tex11*-null en supprimant 27 des 30 exons totaux du gène *Tex11* (exons 3 à 29) (Yang *et al.*, 2008). Chez ces souris mâles *Tex11^{-Y}*, la spermatogenèse est altérée lors de l'appariement chromosomique du stade pachytène et le nombre de crossing-over est réduit (Yang *et al.*, 2008). Certains spermatocytes dégénèrent par apoptose au stade pachytène. Dans d'autres spermatocytes, les chromosomes homologues ne se séparent pas lors de la première division méiotique, ce qui provoque la mort cellulaire (Roeder and Bailis, 2000)(Eaker *et al.*, 2002)(de Rooij and de Boer, 2003)(Turner *et al.*, 2005). Dans tous les cas, les souris mâles sont stériles. En revanche, les souris femelles *Tex11^{-/-}* sont fertiles mais présentent une réduction

de la taille des portées. Ceci serait due à des aneuploïdies retrouvés dans les ovocytes mutants.

- Adelman et collaborateurs ont créé une lignée de souris mutante pour *Tex11* différente. Seul l'exon 3 a été supprimé. Ceci crée un décalage de lecture apportant un codon stop prématurément (à 6 pb du début de l'exon 4) (Adelman and Petrini, 2008). Ces animaux mutants sont fertiles, aussi bien les mâles que les femelles. Cependant, chez les mâles mutants, la réparation des CDBs est retardée dans les spermatocytes et il y a une diminution de la formation de crossing-over (Adelman and Petrini, 2008).

Aujourd'hui, aucun modèle murin n'a été construit pour valider la délétion exonique identifiée dans le gène *TEX11* de deux patients azoospermes non apparentés (délétion de 79 acides aminés au sein du domaine SPO22) (Yatsenko *et al.*, 2015).

D. Validation des variants du gène *TEX11*, et thérapie génique

Dans une étude de Yang et coll. (Yang *et al.*, 2015), une insertion entraînant un décalage dans le cadre de lecture du gène *TEX11* a été mise en évidence chez un patient azoosperme. L'analyse histologique de la biopsie testiculaire de ce patient a montré un arrêt méiotique au stade pachytène.

Cette insertion, décalant le cadre de lecture du gène *Tex11*, a été reproduite dans un modèle murin dans le but de pouvoir, ultérieurement, restaurer la fertilité des animaux mutants par une thérapie génique (Wang *et al.*, 2021). L'analyse histologique a indiqué un arrêt méiotique durant la spermatogenèse.

Dans ces testicules de mâle *Tex11^{PM/Y}* mutants murins, des SSC ont été retrouvés, semblables à celles des témoins (morphologie, prolifération, marqueurs, génome et transcriptome similaires). A l'aide de culture *in vitro* de ces SSC, suivie d'une thérapie génique (basée sur la technologie CRISPR/Cas9) et de la réimplantation des

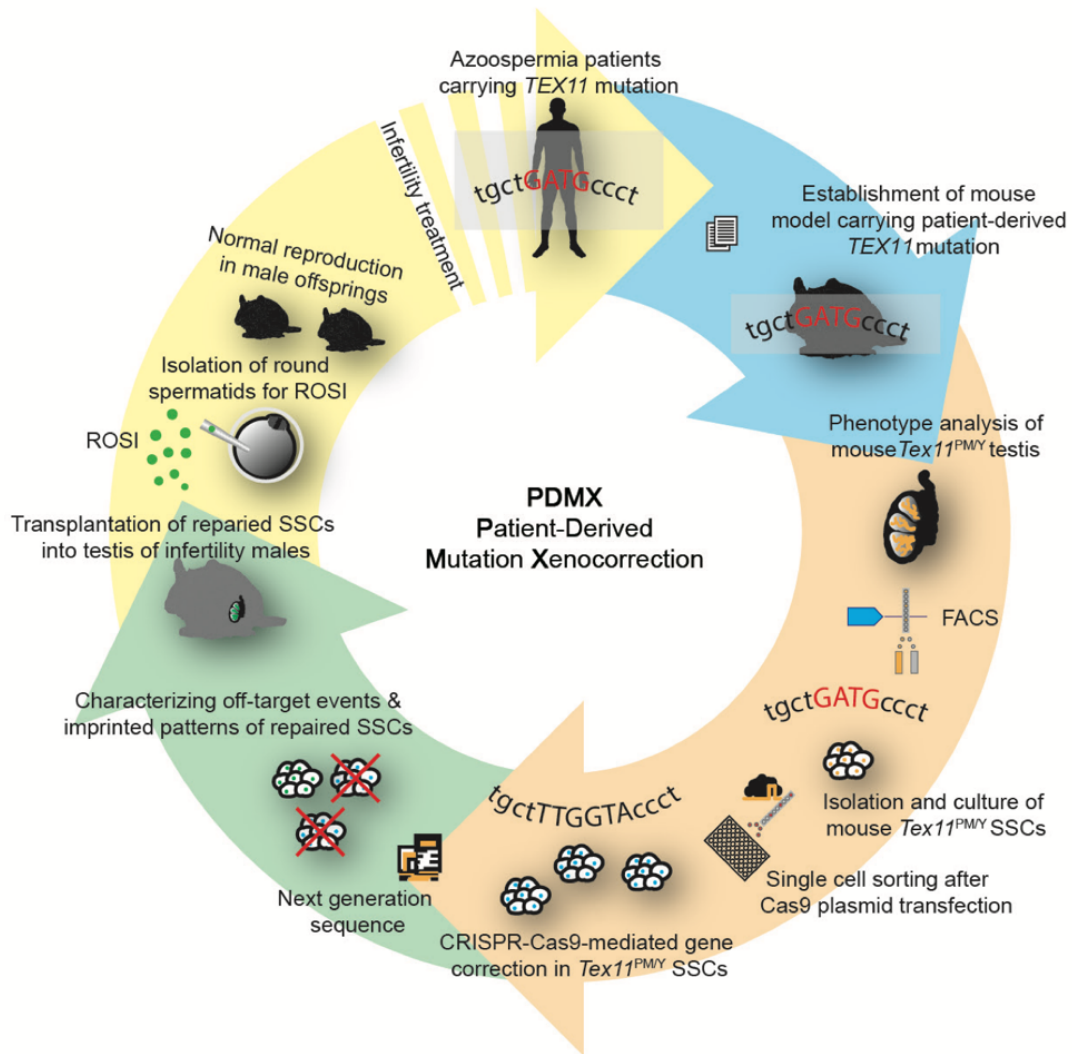


Figure 47 : Modèle schématisé du traitement de l'azoospermie chez la souris.

ROSI : injection de spermatide ronde, SSC : cellules souches spermatogoniales, PDMX : xénocorrection de mutation dérivée de patient. (Adaptée de (Wang *et al.*, 2021))

cellules germinales, un enrichissement en spermatozoïdes haploïdes a été observé en 2 mois. Une descendance a été obtenue en 4 mois, avec transmission du gène corrigé. Le modèle de la **figure 47** résume cette étude (Wang *et al.*, 2021).

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE THÈSE

Chez les patients présentant une insuffisance testiculaire primaire, un diagnostic génétique est réalisé dans environ 30 % des cas suite à l'exclusion de toutes les causes acquises et génétiques connues. Compte tenu de la complexité de la spermatogenèse et des phénotypes testiculaires hétérogènes, seules de grandes études d'analyse de l'exome et du génome impliquant des milliers de patients bien caractérisés ont le potentiel de démêler les causes génétiques récurrentes de l'ANO, et/ou de mieux caractériser les phénotypes. Dans le cadre des ANO, le dépistage génétique est primordial pour (1) une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infertilité et l'identification de nouveaux acteurs intervenant aux différentes étapes de la spermatogenèse, (2) pouvoir aborder de nouvelles stratégies de prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients infertiles et éviter une chirurgie inutile chez les patients atteints d'un AM pure.

Le premier objectif du travail de thèse a été d'identifier les causes génétiques potentiellement responsables du phénotype histologique testiculaire particulier de « l'arrêt de maturation ». Cet objectif a commencé par l'étude d'une famille consanguine avec 2 frères présentant un AM. Après une cartographie d'homozygotie des régions LOH communes aux 2 frères infertiles par puces à ADN (SNP-CGH array), nous avons réalisé le séquençage d'exome et identifié un variant d'intérêt.

Conforté par ces résultats, nous avons étendu cette approche à une cohorte plus large, composée de patients azoospermes avec AM.

Le deuxième objectif de ces travaux s'est focalisé sur la caractérisation d'un modèle murin mimant la délétion exonique humaine connue du gène *TEX11* déjà décrite dans le chapitre IV de la partie I (délétions des exons 10-12, supprimant une partie du domaine SPO22). Pour cela, nous avons construit, avec la technologie CRISPR/Cas9, des souris *Tex11^{Ex-9-11del/Y}* dont les exons 9, 10 et 11 du gène *Tex11* murin (exons équivalents aux exons 10-12 humains) ont été supprimés, et étudié l'effet de cette délétion exonique sur la fertilité et le processus de la spermatogenèse chez ces souris

Partie II : ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

**Chapitre I. Investigation génétique du phénotype
d'azoospermie non-obstructive due à l'arrêt de
maturation testiculaire chez l'homme**

Article 1

A *MEI1* homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family.

Mariam Ben Khelifa*, **Farah Ghieh***, Radia Boudjenah, Christophe Hue, Delphine Fauvert, Rodolphe Dard, Henri-Jean Garchon, François Vialard

* Co-premiers auteurs

Travail réalisé dans le cadre du Master2 recherche : année 2017-2018

Human Reproduction, Vol.33, No.6 pp. 1034-1037, 2018

Objectifs et principaux résultats de l'étude

L'objectif de ce travail a été d'identifier la cause génétique d'azoospermie non-obstructive dans une famille Tunisienne consanguine où 2 frères sont infertiles. L'un des frères a bénéficié d'une TESE qui a montré la présence d'un arrêt méiotique complet au stade spermatocyte. Ce travail a été initié alors que peu de données de la littérature existaient sur l'utilisation du WES en cas d'ANO.

Compte tenu de la consanguinité parentale connue, nous avons alors émis l'hypothèse que le phénotype observé est due à la transmission d'une mutation de manière autosomique récessive. L'analyse de SNP-CGH array réalisée chez 3 frères : les 2 azoospermes et un frère fertile a permis d'identifier des régions LOH communes aux 2 frères azoospermes et absentes chez le frère fertile. Nous avons ensuite réalisé le WES, et, en ne considérant que les zones LOH sélectionnées, nous avons identifié un nouveau gène, à savoir *MEI1*, impliqué dans le phénotype d'ANO dans cette famille étudiée. Cette étude princeps nous a permis de valider l'approche diagnostic.

MEI1 (Meiotic double-stranded breaks formation protein 1) est exprimé principalement dans les testicules. Ce gène situé sur le chromosome 22, code pour une protéine de 1,274 acides aminés. L'expression prédominante de *MEI1* dans les testicules est cohérente avec son rôle putatif dans la spermatogenèse, comme cela a été montré dans le modèle murin KO pour *Mei1*. Celui-ci présente un arrêt méiotique et une infertilité (Libby *et al.*, 2003). Des analyses plus approfondies ont montré que *Mei1* est probablement nécessaire à la formation de cassures double brin (CDBs), l'événement déclencheur de la recombinaison méiotique. *Mei1* agit en amont des gènes nécessaires à la réparation des CDBs et est essentiel pour les événements initiateurs de la recombinaison méiotique. Étant donné que (1) le gène *Mei1* est spécifique de la méiose, (2) que le variant (c.C3307T.p.R1103W) est hautement pathogène, (3) que l'inactivation de ce gène chez la souris induit un arrêt méiotique, le variant identifié a été considéré comme à l'origine de l'arrêt méiotique chez les frères infertiles.

A *MEI1* homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family

M. Ben Khelifa¹, F. Ghieh¹, R. Boudjenah^{1,2}, C. Hue³, D. Fauvert¹, R. Dard^{1,2}, H.J. Garchon³, and F. Vialard^{1,2,*}

¹EA7404-GIG, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ, 2 av de la source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France

²Genetics Laboratory, CHI de Poissy St Germain en Laye, 10 rue du champ gaillard, 78300 Poissy, France ³UMR1179, Ufr des sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ, 2 av de la source de la Bièvre, 78180, Montigny le Bretonneux, France

*Correspondence address. EA7404-GIG, UVSQ, Montigny le Bretonneux, France. E-mail: francois.vialard@uvsq.fr

Submitted on February 7, 2018; resubmitted on February 28, 2018; accepted on March 10, 2018

ABSTRACT: Although meiotic arrest in males is observed in about 25% of azoospermic patients, pure homogeneous arrest in all seminiferous tubules is less frequent, and may be due to mutation of a single gene. However, given the large number of genes involved in meiosis, this gives rise to extensive genetic heterogeneity. Only two genetic abnormalities have been reported on a regular basis: the X-linked exonic *TEX11* deletion, and the AZFb microdeletion on the Y chromosome. Other single gene defects were private and found in consanguineous families. Here, we report on a homozygous missense mutation in the gene coding for meiotic double-stranded break formation protein 1 (*MEI1*; c.C3307T:p.R1103W) observed in two brothers (from a consanguineous Tunisian family) with non-obstructive azoospermia and meiotic arrest. A fertile brother was heterozygous for the mutation. All the queried databases predicted that this mutation is damaging, and it has previously been reported that *Mei1* knock-out is associated with meiotic arrest in a murine model. Hence, meiotic arrest in the two brothers was probably caused by an alteration in a gene known to be fundamental for chromosome synapsis.

Key words: azoospermia / meiosis / *MEI1* / meiotic arrest / whole exome sequencing

Introduction

Infertility (defined as the inability to conceive after 1 year of unprotected intercourse) is a worldwide health problem in industrial nations, and affects 15% of couples. Although the aetiology of infertility is sometimes known, the condition remains idiopathic in a large proportion of cases. Hence, a higher level of fundamental knowledge is required to improve clinical care. Infertility in men is initially diagnosed after a semen analysis. There are several types of sperm abnormality: the complete absence of spermatozoa in the semen (azoospermia), a low sperm count (oligozoospermia), inadequate sperm motility (asthenozoospermia), abnormal sperm morphology (teratozoospermia) or a combination of these defects (Jungwirth *et al.*, 2012). The heterogeneity of causal factors results in a typical multifactorial male infertility disorder, which complicates our understanding of the underlying mechanisms. Azoospermia (affecting around 1% of men in the general population) may be due to an excretory cause (an obstruction in the seminal tract, leading to obstructive azoospermia, OA) or a secretory cause (defective sperm production, leading to non-OA, NOA). In both

cases, a testicular biopsy (TB) should be carried out. Although TB is positive in over 95% of cases of OA, this value varies from 40 to 50% in NOA (on average, and depending on the cause of the defect). Histological phenotypes in NOA are classified into three main groups: (i) maturation arrest, (ii) Sertoli-cell-only syndrome (SCOS) and (iii) hypospermatogenesis. One can also distinguish between pure phenotypes (in which all the seminiferous tubules have the same appearance) and mixed phenotypes (in which the tubules differ in appearance) (Robin *et al.*, 2010). TB is usually negative in cases of pure maturation arrest and SCOS, and usually positive in cases of hypospermatogenesis. Genetic factors are often involved; indeed, it has been estimated that a genetic origin is present in around 1 in 40 infertile men. It has been unambiguously demonstrated that chromosomal aberrations (mainly 47,XXY—Klinefelter syndrome), microdeletions of the Y chromosome, and mutations of the gene coding for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator are frequent genetic causes of male infertility (Jungwirth *et al.*, 2012). However, routine screening for these well-established genetic causes results in the diagnosis of just 5% of all phenotypes. Even though other genes are reportedly associated with

impaired male fertility, fewer than 25% of infertile men currently have a clear genetic diagnosis. One can thus legitimately presume that most of the genetic causes of male infertility have not yet been characterized—probably because of the (i) large number of genes involved (Matzuk and Lamb, 2008) and (ii) the influence of the environment on spermatogenesis—a highly secured, conserved process.

Many studies have focused on the relationship between the Y chromosome and male infertility, although other genes involved in spermatogenesis are located elsewhere in the genome. Recently, a number of researchers have used whole-genome analysis (array comparative genomic hybridization, whole-exome sequencing (WES), etc.) to identify genetic defects associated with spermatogenesis failure or NOA (Table I).

Case report

The proband (III-8, a healthy man from a consanguineous Tunisian family) consulted in our clinic for infertility. Two other brothers (III-2 and III-4) were reported to be azoospermic, although no further details were given. The pedigree is shown in Fig. 1.

The analysis of two consecutive semen samples revealed complete azoospermia. A physical examination showed a normal testis volume. The FSH level was 3.2 IU/l. Genetic analysis showed a normal karyotype and absence of a Y chromosome microdeletion. After counselling, TB was performed. Unfortunately, no spermatozoa were retrieved. A histological analysis highlighted a homogeneous maturation arrest at the spermatocyte stage.

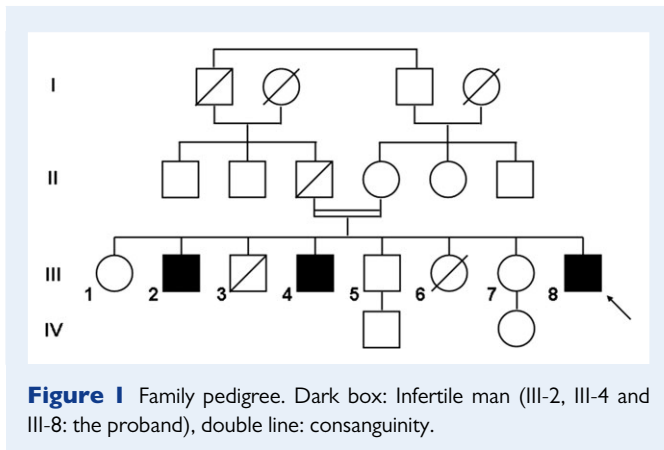
In view of the known parental consanguinity, we assumed that a founder mutation had been transmitted in an autosomal-recessive manner. After each family member having agreed to participate in the genetic screening had received appropriate genetic counselling, and following approval by the local independent ethics committee, we collected a DNA sample for two infertile brothers (the proband (III-8) and one of his infertile brothers (III-4)), the fertile brother (III-5), an infertile sister (III-1) and a fertile sister (III-7). DNA was extracted from saliva samples using the Oragene DNA kit (DNA-Genotek Inc., Ottawa, Ontario, Canada).

In order to rule out the presence of TEX11 exon microdeletions and focus on the WES analysis, we performed array-based comparative genomic hybridization using the Agilent Human Genome Comparative Genomic Hybridization + Single Nucleotide Polymorphism (CGH + SNP) Microarray (SurePrint G3 Human Genome CGH + SNP Microarray Kit, 2x400 K; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for the three brothers' samples. A SNP genome scan was performed, according to the manufacturer's instructions. Commercial male human genomic DNA (Agilent) was used as the control. For each test sample, ~100 000 SNP signal intensities were compared with the mean signals from the Agilent's reference database. Following restriction enzyme digestion, Klenow-based enzyme labelling and digestion, washing, and drying, the microarray slides were scanned at a resolution of 2 µm using a microarray scanner (Agilent Technologies). Features were extracted from the scanned images by using Feature Extraction software (version 4.0, Agilent technologies). The extracted features were analysed using the Aberration Detection Method 2 algorithms. Copy number and loss of heterozygosity were analysed using downloaded CytoGenomics software (Agilent), which genotypes SNPs with an average distance of 7.2 kb between markers. No TEX11 microdeletions were identified. The regions of heterozygosity loss (common to the two infertile brothers but absent in the fertile brother) spanned 46.56 Mb. The lengths of the eleven identified homozygous regions ranged from 1.05 to 17.7 Mb.

Table I Gene defects associated with spermatogenesis failure (SPGF) or non-obstructive azoospermia (apart from Klinefelter syndrome and Y microdeletions).

OMIM SPGF number	Gene	Symbol	Male human phenotype		Family history	Male mouse phenotype	
			Testicular Phenotype	Reference		Testicular Phenotype	Reference
13	TATA-binding protein-associated factors 4B	TAF4B	Unknown	(Ayhan et al. (2014)	Consanguineous	Lack of germ cells	Lovasco et al. (2015)
14	Zinc finger MYND-containing protein 15	ZMYND15	Unknown	(Ayhan et al. (2014)	Consanguineous	Spermiogenesis defects	Yan et al. (2010)
15	Synaptonemal complex central element protein 1	SYCE1	Meiotic arrest	Maor-Sagie et al. (2015)	Consanguineous	Meiotic arrest	Bolcun-Flas et al. (2009)
22	Meiosis-specific protein with OB domains	MEIOB	Unknown	Gershoni et al. (2017)	Consanguineous	Meiotic arrest	Souquet et al. (2013)
23	Testis-expressed gene 14	TEX14	Unknown	Gershoni et al. (2017)	Consanguineous	Meiotic arrest	Greenbaum et al. (2006)
	Testis-expressed gene 15	TEX15	Meiotic arrest	Okutman et al. (2015)	Consanguineous	Meiotic arrest	Yang et al. (2008)
	Tudor domain containing 9	TDRD9	Meiotic arrest	Aratât et al. (2017)	Consanguineous	Meiotic arrest	Shoji et al. (2009)
	Serine protease inhibitor, kazal-type, 2	SPINK2	Post-meiotic arrest	Kherraf et al. (2017)	Consanguineous	Post-meiotic arrest	Kherraf et al. (2017)
	Proteasome 26 S subunit, ATPase, 3-interacting protein	PSMC3IP	Unknown	Al-Agha et al. (2018)	Consanguineous	Meiotic arrest	Petukhova et al. (2003)
X2	Testis-expressed gene 11	TEX11	Meiotic arrest	Yatsenko et al. (2015)	Non-consanguineous	Meiotic arrest	Yang et al. (2015)
	Meiotic double-stranded break formation protein 1	MEI1	Meiotic arrest	Present report	Consanguineous	Meiotic arrest	Libby et al. (2002)

OMIM: online Mendelian inheritance in man.



Next, WES of the proband's sample (III-8) was carried out using a Next Seq 500[®] system (Illumina, San Diego, CA, USA) and a TruSeq Exome Library Prep Kit (Illumina). Read alignment and variant calling were performed with BWA-MEM software (Burrows-Wheeler Aligner, <http://bio-bwa.sourceforge.net>), using the default parameters and with the human genome assembly hg19 (GRCh38) as the reference. Variants were identified by using the GATK (Genome Analysis Toolkit, <https://software.broadinstitute.org/gatk/>, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) Haplotype Caller and then the GATK Variant Recalibrator. The variants were functionally annotated using ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org/>). Out of 30 000 identified variants, we considered a total of 34 non-synonymous homozygous variants in exon sequences with a frequency below 5% (according to Gnomad software, <http://gnomad.broadinstitute.org/>, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) and that were predicted to be damaging by SIFT (<http://sift.jcvi.org/>, J. Craig Venter Institute, La Jolla, CA, USA) and PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, Harvard University, Cambridge, MA, USA). When we focused on the previously identified 49.56 Mb, only seven variants were considered (all with testis expression: NBPF9, RASSF10, HPS5, ARHGGEF15, TBC1D10A, MEI1 and TLL12). Given that (i) the MEI1 gene (coding for meiotic double-stranded break formation protein 1) is meiosis-specific, (ii) the variant (c.C3307T:p.R1103W) is predicted to be highly damaging (with an arginine/threonine substitution) and (iii) MEI1 knock-out in the mouse is associated with meiotic arrest (Libby et al., 2002), we considered that the MEI1 variant caused meiotic arrest in our patient. The c.C3307T:p.R1103W variant is located in exon 26/31. None of the databases provided domain information.

To confirm the mutation's impact in the family, primers were designed (using Primer 3 software, <http://primer3.ut.ee/>, Whitehead Institute, MA, USA) and validated. The PCR analysis was performed by GATC (Constance, Germany). As expected, the mutation was homozygous in the two infertile brothers (Supplementary Fig. S1a) and heterozygous (Supplementary Fig. S1b) or absent (Supplementary Fig. S1c) in the other family members. The lack of any remaining testis tissue prevented an immunochemical assessment.

Discussion

We identified a homozygote missense mutation in the *MEI1* gene in two infertile patients (one of whom displayed meiotic arrest). *MEI1* codes for a 1274 aa protein, and seven isoforms have been identified

(from 238 to 1274 aa in length). Arginine 1103 is absent in isoforms 4 and 6 (Supplementary Fig. S2). Although it has been suggested that polymorphic alleles (with three synonymous variations) are associated with human azoospermia, no homozygote variations have previously been observed (Sato et al., 2006).

MEI1 is required for normal meiotic chromosome synapsis, and may be involved in the formation of meiotic double-strand breaks in gonocytes. In male *Mei1* knock-out mice, spermatocyte arrest is observed at the zygotene stage; the homologous chromosomes fail to perform synapsis. A similar phenotype is observed for female *Mei1* knock-out mice (Libby et al., 2002). Hence, the MEI1 homozygous variant appears to be a good candidate gene for the phenotype observed in the two infertile brothers described here.

Since 2013, whole-genome analysis has revealed 11 gene defects in patients with NOA. For eight of these defects, meiotic arrest is observed in male humans and mice. Considering the main steps in spermatogenesis (formation of a spermatogonial stem cell pool, meiosis and spermiogenesis), it is likely that each meiotic defect is due to the mutation of a single gene. Genetic heterogeneity then arises because of the large number of genes involved in meiosis. To date, only the *TEX11* gene defect (Yang et al., 2015) and AZFb microdeletions have been considered as recurrent genetic defects in males with meiotic arrest. Each of the other genetic defects have only been reported in a single, consanguineous family. For all the genes identified to date, there is a good correlation between the human and knock-out mouse phenotypes; this is a rare situation because for many genes, mouse models are not necessarily comparable. Most of the gene defects reported in the literature to date lead to meiotic arrest, as many are important for chromosome synapsis and double-strand break repair during meiosis.

In fact, we expect that whole-genome sequencing will identify a large number of cases in which alterations in genes involved in meiosis cause abnormal pairing and/or recombination. Some of these putative defects may already have been reported in women with premature ovarian insufficiency (e.g. *STAG3*) (Caburet et al., 2014) or in knock-out mice (e.g. *Topaz1*) (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015). Recently, a *PSMC3IP* stop gain mutation was reported in a Yemeni family in which four daughters had premature ovarian insufficiency and one brother had azoospermia (Al-Agha et al., 2018). Although the brother's testicular phenotype was not described in detail, meiotic arrest was observed in the *Psmc3ip* knock-out mouse (Petukhova et al., 2003). *PSMC3IP* protein is a member of the meiotic homologous recombination and DNA repair complex (Petukhova et al., 2003). Similar results have been observed for *SYCE1* in premature ovarian failure (de Vries et al., 2014) and azoospermia (Maor-Sagie et al., 2015).

As previously hypothesized (and confirmed in the present case), autosomal recessive diseases are readily identified in a context of consanguinity. However, the mutations identified to date have been restricted to a single family. With the exception of the report that identified *TEX11* microdeletions/mutations, all the recent genetic studies of meiotic arrest focused on consanguineous families. At present, cases of sporadic meiotic arrest are not investigated or reported in the absence of a known gene defect. Given the large number of X chromosome genes involved in meiosis in males (often located in different clusters, making them very difficult to sequence using WES with $\times 100$ coverage), targeting these clusters might help to explain idiopathic meiotic arrest in non-consanguineous patients.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Human Reproduction* online.

Acknowledgements

We thanks the staff at the UVSQ's genomics facility.

Authors' roles

M.B.: patient inclusion, F.G.: Sanger sequencing, R.B.: array comparative genomic hybridization analysis, C.H.: WES, D.F.: technical support for array comparative genomic hybridization analysis, R.D.: interpretation of Sanger sequencing, and critical review, H.J.G.: WES analysis, F.V.: coordination and article drafting.

Funding

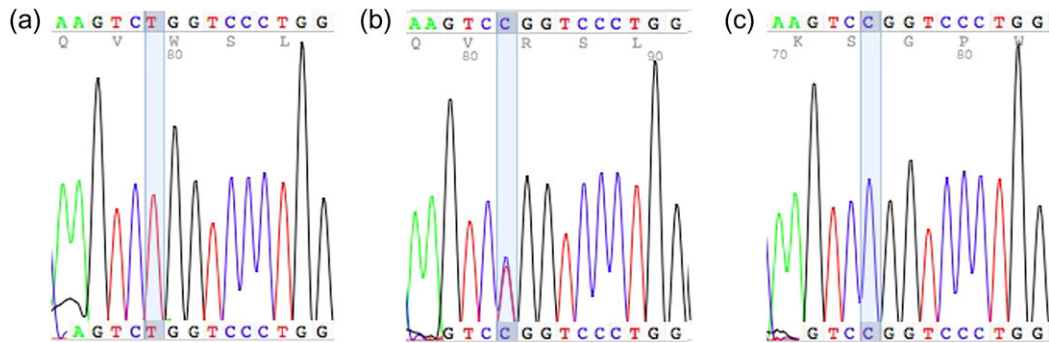
Fondation Maladie Rare, Merck, and Agence de la Biomédecine.

Conflict of interest

None.

References

- Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, Moriwaki M, Moore B, Peacock KA, Mosbrugger T, Neklason DW, Jorde LB, Yandell M *et al.* Primary ovarian insufficiency and azospermia in carriers of a homozygous PSMC3IP stop gain mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;**103**:555–563.
- Arafat M, Har-Vardi I, Harlev A, Levitas E, Zeadna A, Abofoul-Azab M, Dymov V, Sheffield VC, Lunenfeld E, Huleihel M *et al.* Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azospermia in infertile men. *J Med Genet* 2017;**54**:633–639.
- Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, Tolun A. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azospermia. *J Med Genet* 2014;**51**:239–244.
- Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, Taggart M, Grey C, Massy B, de, Benavente R, Cooke HJ. Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000393.
- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I *et al.* Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2014;**370**:943–949.
- Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, Pietrokovski S, Kleiman SE. A familial study of azospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azospermia genes. *Genet Med* 2017;**19**:998–1006.
- Greenbaum MP, Yan W, Wu M-H, Lin Y-N, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A, Matzuk MM. *TEX14* is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:4982–4987.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012;**62**:324–332.
- Kherraf Z-E, Christou-Kent M, Karaouzene T, Amiri-Yekta A, Martinez G, Vargas AS, Lambert E, Borel C, Dorphin B, Aknin-Seifer I *et al.* *SPINK2* deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med* 2017;**9**:1132–1149.
- Libby BJ, De La Fuente R, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Cobb J, Inselman A, Eaker S, Handel MA, Eppig JJ, Schimenti JC. The mouse meiotic mutation *mei1* disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol* 2002;**242**:174–187.
- Lovasco LA, Gustafson EA, Seymour KA, Rooij DG, de, Freiman RN. *TAF4B* is required for mouse spermatogonial stem cell development. *Stem Cells* 2015;**33**:1267–1276.
- Luangpraseuth-Prosper A, Lesueur E, Jouneau L, Pailhoux E, Cotinot C, Mandon-Pépin B. *TOPAZI*, a germ cell specific factor, is essential for male meiotic progression. *Dev Biol* 2015;**406**:158–171.
- Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmid H, Zenvirt S, Laufer N, Richler C, Frumkin A. Deleterious mutation in *SYCE1* is associated with non-obstructive azospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:887–891.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;**14**:1197–1213.
- Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, Rombaut C, Benkhalifa M, Teletin M, Skory V *et al.* Exome sequencing reveals a nonsense mutation in *TEX15* causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet* 2015;**24**:5581–5588.
- Petukhova GV, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Dev Cell* 2003;**5**:927–936.
- Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcelli F, Rigot J-M, Mitchell V. [Assessment of azospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann Pathol* 2010;**30**:182–195.
- Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N *et al.* Polymorphic alleles of the human *MEI1* gene are associated with human azospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet* 2006;**51**:533–540.
- Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T *et al.* The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell* 2009;**17**:775–787.
- Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J *et al.* *MEIOB* targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003784.
- Vries L, de, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals *SYCE1* mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:E2129–E2132.
- Yan W, Si Y, Slaymaker S, Li J, Zheng H, Young DL, Aslanian A, Saunders L, Verdin E, Charo IF. *Zmynd15* encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *J Biol Chem* 2010;**285**:31418–31426.
- Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse *TEX15* is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 2008;**180**:673–679.
- Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, Brown LG, Rozen S, Page DC, Wang PJ. *TEX11* is mutated in infertile men with azospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:1198–1210.
- Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A *et al.* X-linked *TEX11* mutations, meiotic arrest, and azospermia in infertile men. *N Engl J Med* 2015;**372**:2097–2107.



Supplementary Figure S1 Confirmation using Sanger sequencing at position 3307 of MEI1 gene (Blue square). T allele (red curve), C allele (blue curve). a:III-4 (infertile brother): homozygote T/T, b:III-5 (fertile brother): heterozygote T/C, c:III7 (fertile sister): homozygote C/C.

Q5TIA1	MEI1_HUMAN	1081	SGAQLPATKDTVLAPLRMSQVRSLVIGLQNLVQKDPLLSQACVGCLEALLDYLDARSP	1140
Q5TIA1-2	MEI1_HUMAN	449	SGAQLPATKDTVLAPLRMSQVRSLVIGLQNLVQKDPLLSQACVGCLEALLDYLDARSP	508
Q5TIA1-3	MEI1_HUMAN	414	SGAQLPATKDTVLAPLRMSQVRSLVIGLQNLVQKDPLLSQACVGCLEALLDYLDARSP	473
Q5TIA1-4	MEI1_HUMAN	570	-----	569
Q5TIA1-5	MEI1_HUMAN	324	SGAQLPATKDTVLAPLRMSQVRSLVIGLQNLVQKDPLLSQACVGCLEALLDYLDARSP	383
Q5TIA1-6	MEI1_HUMAN	445	-----	444
Q5TIA1-7	MEI1_HUMAN	89	SGAQLPATKDTVLAPLRMSQVRSLVIGLQNLVQKDPLLSQACVGCLEALLDYLDARSP	148

Supplementary Figure S2 The MEI isoform at position I103: Arginine I103 is absent in isoforms 4 and 6.

Article 2

How could whole-exome sequencing be implemented in clinical practice for human spermatogenic arrest, considering the latter's high genetic heterogeneity?

Farah Ghieh, Anne-Laure Barbotin, Clara Leroy, Nelly Swierkowsky-Blanchard, Joanne Fortemps, Carole Gerault, Christophe Hue, Hendrick Mambu Mambueni, Sylvie Jaillard, Martine Albert, Marc Bailly, Vincent Izard, François Marcelli, Julie Prasiviravong, Marie-Noelle Dieudonné, Valérie Serazin, Marie Delcroix, Henri-Jean Garchon, Anne Louboutin, Béatrice Mandon-Pepin, Sophie Ferlicot, François Vialard

Soumis à *Human Reproduction*, le 28 octobre 2021

Objectifs et principaux résultats de l'étude

Les investigations génétiques réalisées dans le cadre d'ANO n'ont pas connu de changement depuis plusieurs décennies. Les tests génétiques réalisées en routine sont le caryotype et la recherche des microdélétions des régions AZFs, permettant d'établir un diagnostic génétique dans 20% des cas d'azoospermie (Tüttelmann *et al.*, 2018). L'avènement récent des technologies de séquençage haut débit a permis l'identification de nouvelles causes génétiques et d'améliorer le rendement du diagnostic génétique dans ce phénotype. Si les tests génétiques sont essentiels pour leur pertinence étiologique, aucune amélioration de la prise en charge des patients avec ANO n'a été observée au cours de ces dernières années. Dans ce contexte, le but principal de cette étude a été, de montrer comment le séquençage exomique chez les patients avec AM, pourrait modifier la prise en charge.

Nous avons réalisé le séquençage exomique chez 26 patients AM non apparentés, sans prendre en compte le résultat de la TESE ; ie : récupération de spermatozoïdes testiculaires, et une confirmation histologique a systématiquement été réalisée sur le prélèvement testiculaire. Nous avons identifié des variants délétères chez 57% de la cohorte complète, et 100% en ne considérant que les patients issus de parents consanguins.

Cette étude a démontré l'hétérogénéité génétique du phénotype d'AM complet. Nous avons trouvé des preuves solides pour 5 nouveaux gènes probablement responsables d'AM (*CTCFL*, *MOV10L1*, *EXO1*, *CCDC36* et *C11ORF80*), pour lesquels les modèles de knock-out (KO) de souris sont concordants avec le phénotype humain. De plus, 7 patients portaient des variants pathogènes dans 6 gènes précédemment rapportés dans le cadre d'AM : *TEX11*, *FANCM*, *SYCE1*, *PSMC3IP*, *SPATA22* et *MEI1*, permettant d'améliorer la signification clinique des variants de ces gènes à des fins diagnostiques. Des mutations dans de nouveaux gènes testiculaires non décrits en AM et dont le rôle est encore mal connu dans la spermatogenèse ont été identifiés chez 3 patients : *ZNF85*, *MAGEB6*, et *ARL2*. Toutefois, des validations fonctionnelles de ces derniers sont

nécessaires pour valider leur implication dans l'infertilité. De plus, nos études immunohistologiques ont fourni un nouvel aperçu des conséquences fonctionnelles des variants, soutenant le rôle pathogène de la majorité des variants identifiés.

Nos résultats suggèrent que le séquençage d'exome permet d'éviter des traitements chirurgicaux ou médicaux récurrentes inutiles (comme la TESE) dans le cadre d'AM complet et homogène. Aujourd'hui, si plusieurs études proposent le développement d'un panel de gènes en pré-TESE pour les patients AM, l'identification de nouveaux gènes dans notre étude montre que le séquençage d'exome complet est plus pertinent qu'une stratégie ciblée.

De plus, compte tenu des variants identifiés chez les patients ayant une TESE positive, des recherches supplémentaires sont indispensables avant de proposer une telle analyse génétique avant la TESE afin de la récuser, même si cela semble être pertinent pour les patients consanguins.



Draft Manuscript For Review. Reviewers should submit their review at <http://mc.manuscriptcentral.com/humrep>

How could whole-exome sequencing be implemented in clinical practice for human spermatogenic arrest, considering the latter's high genetic heterogeneity?

Journal:	<i>Human Reproduction</i>
Manuscript ID	HUMREP-21-1332
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Oct-2021
Complete List of Authors:	<p>Ghieh, Farah; UVSQ, Equipe RHuMA, UMR BREED BARBOTIN, Anne-Laure; Lille University Hospital Center, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS Swierkowsky-Blanchard, Nelly; CHI Poissy-Saint-Germain-en-Laye Site Hospitalier de Poissy, Gynaecology and Obstetrics Leroy, Clara; Lille University Hospital Center, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS Fortemps, Joanne; Intermunicipal Hospital Centre Poissy-Saint-Germain-en-Laye Poissy Site, Anatomo-pathology laboratory Gerault, Caroele; CHI Poissy-Saint-Germain-en-Laye Site Hospitalier de Poissy, Génétique Hue, Christophe; Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines UFR des sciences de la santé Simone Veil, UMR1173 Mambu-Mambueni, Hendrick; Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines UFR des sciences de la santé Simone Veil, UMR1173 Jaillard, Sylvie; University Hospital Centre Rennes, Service de cytogénétique Albert, Martine; Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines UFR des sciences de la santé Simone Veil, RHuMA Bailly, Marc; Fertility Unit, Poissy-Saint-Germain-en-Laye General Hospital, F-78303 Poissy, France Izard, Vincent; Hospital Bicetre, Service d'urologie Molina-Gomes, Denise; CHI Poissy-Saint-Germain-en-Laye Site Hospitalier de Poissy, Génétique PRASIVORAVONG, Julie; Lille University Hospital Center, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS Sérazin, Valérie; Intermunicipal Hospital Centre Poissy-Saint-Germain-en-Laye Poissy Site, Genetic department Dieudonné, Marie-Noëlle; Université de Versailles Saint-Quentin-en-</p>

	Yvelines UFR des sciences de la santé Simone Veil, RHuMA Delcroix, Marie; Intermunicipal Hospital Centre Poissy-Saint-Germain-en-Laye Poissy Site, Génétique Garchon, Henri-Jean; Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines UFR des sciences de la santé Simone Veil, UMR1173 Louboutin, Anne; Intermunicipal Hospital Centre Poissy-Saint-Germain-en-Laye Poissy Site, Anatomo-pathology laboratory Marcelli, François; Lille University Hospital Center, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS Mandon-Pépin, Béatrice; INRAE, BREED Ferlicot, Sophie; Université Paris-Saclay Faculté de Médecine Vialard, François; UVSQ, Equipe RHuMA, UMR BREED; CHI Poissy-Saint-Germain-en-Laye Site Hospitalier de Poissy, Génétique
Keywords:	AZOOSPERMIA, MEIOSIS, spermatogenic arrest, whole-exome sequencing, consanguinity
Subject Section:	Reproductive genetics

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Title: How could whole-exome sequencing be implemented in clinical practice for human
2 spermatogenic arrest, considering the latter's high genetic heterogeneity?

3

4 Running Title: Whole-exome sequencing in human spermatogenic arrest

5

6 F Ghieh^{1,2}, AL Barbotin³, N Swierkowsky-Blanchard^{1,2,4}, C Leroy³, J Fortemps⁵, C Gerault⁶, C
7 Hue⁷, H Mambu Mambueni⁷, S Jaillard^{8,9}, M Albert^{1,2}, M Bailly⁴, V Izard¹⁰, D Molina-Gomes⁶, F
8 Marcelli³, J Prasivorawong³, V Serazin^{1,2,6}, MN Dieudonne^{1,2}, M Delcroix⁶, HJ Garchon⁷, A
9 Louboutin⁵, B Mandon-Pepin^{1,2}, S Ferlicot¹¹, F Vialard^{1,2,6,*}

10

11 1: Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350, Jouy-en-Josas, France

12 2: École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700, Maisons-Alfort, France

13 3: Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier et
14 Universitaire, F-59000, Lille, France.

15 4: Département de Gynécologie Obstétrique, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78300, Poissy, France

16 5: Service d'Anatomie Pathologique, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78100, Saint-Germain-en-Laye,
17 France

18 6: Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78300,
19 Poissy, France

20 7: Department of Biotechnology and Health, UVSQ, Université Paris-Saclay, Inserm UMR 1173, F-78180
21 Montigny-le-Bretonneux, France

22 8: Service de Cytogénétique, CHU Rennes, F-35000, Rennes, France

23 9: INSERM, EHESP, IRSET - UMR_S 1085, Université Rennes 1, Rennes, France

24 10: Service d'Urologie, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, F-94270, Le Kremlin-Bicêtre, France

25 11: Service d'Anatomie Pathologique, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, F-94270, Le Kremlin-
26 Bicêtre, France

27

28 * Corresponding author :

29 Email: francois.vialard@uvsq.fr

30 Tel: +33 139 274 700

31 ORCID : 0000-0002-5774-2756

32

33 **Abstract:**

34 **Study question:** Could whole-exome sequencing (WES) be implemented in clinical practice for
35 human maturation arrest (MA) ?

36 **Summary answer:** Our results suggest WES could help to avoid recurrent, recurrent testicular
37 sperm extraction (TESE) in men with MA

38 **What is known already:** A targeted sequencing strategy, for a limited genes number, has been
39 proposed for male patients with azoospermia, mainly to avoid incidental findings, without any
40 integrated into the clinical management of men. At present, the only definitive
41 contraindications for TESE in men with NOA are a 46,XX karyotype and AZFa and/or AZFb
42 regions microdeletions

43 **Study design, size, duration:** We included patients with idiopathic NOA caused by complete
44 MA at the spermatocyte stage in all seminiferous tubules after the histopathological analysis
45 performed independently by two expert histologists.

46 **Participants/materials, setting, methods:** Twenty-six men with MA and a normal karyotype
47 (i.e. no azoospermia factor (*AZF*) gene microdeletions on the Y chromosome) were included
48 and assessed with single-nucleotide polymorphism comparative genomic hybridization array
49 and WES. The results were validated with Sanger sequencing. For all the variants thought to
50 influence spermatogenesis, we used immunohistochemical techniques to analyze the
51 expression of the altered protein.

52 **Main results and the role of chance:** Deleterious homozygous variants were identified in all
53 seven consanguineous patients and three of the 19 non-consanguineous patients. Compound
54 heterozygous variants were identified in another five of the 19 non-consanguineous. No
55 recurrent variants were identified. We found new variants in genes known to be involved in
56 azoospermia or MA (including *TEX11*, *MEI1*, *PSMC3IP*, *SYCE1*, and *FANCM*) and variants in
57 genes not previously linked to human MA (including *CTCF*, *CCDC36*, *MOV10L1*, *C11ORF80* and
58 *EXO1*).

59 **Limitations, reasons for caution:** More data are probably required before WES screening can
60 be used to avoid testicular sperm extraction completely, although screening should be
61 recommended for men with a consanguineous family background. WES is still complex and
62 can generate incidental findings.

63 **Wider implications of the findings:** These results confirmed the genetic aetiology of MA in
64 most patients, with a variant frequency of up to 50% in the study population as a whole and

65 100% among consanguineous patients. With the exception of *MEI1* (compound heterozygous
66 variants of which were identified in two cases), each variant corresponded to a specific gene
67 - confirming the high degree of genetic heterogeneity in men with MA. Our results suggest
68 that WES screening could help to avoid recurrent, futile testicular sperm extraction in men
69 with MA – especially those with consanguineous individuals.

70 **Study funding/competing interest(s):** The study was funded by Fondation Maladise Rares
71 (Paris, France), Merck (Kenilworth, NJ,USA), IRSF (Montigny le bretonneux, France) and
72 Agence de la Biomédecine (St Denis, France)

73 **Trial registration number:** None.

74

75 Keywords: azoospermia, meiosis, spermatogenic arrest, whole-exome sequencing,
76 consanguinity

77

79 Introduction

80 Infertility is a major worldwide health issue and concerns more than 15% of couples. The
81 aetiology of infertility is not known in a high proportion of cases. Hence, a greater level of
82 fundamental knowledge is required to improve clinical care.

83 In over 50% of cases, infertility is due to sperm abnormalities (Jungwirth *et al.*, 2012). The
84 most severe clinical phenotype (observed in 10% of infertile men) is azoospermia, with the
85 complete absence of spermatozoa in the semen. The condition can be obstructive (i.e. caused
86 by an obstruction in the seminal tract, for example) or non-obstructive (i.e. due to a defect in
87 sperm production). Testicular sperm extraction (TESE) is the main assisted reproductive
88 technology for enabling men with azoospermia to become fathers (ASRM, 2019; Corona *et al.*,
89 2019). TESE is positive in over 95% of cases of obstructive azoospermia (OA) and 40-50% of
90 cases of non-obstructive azoospermia (NOA). In NOA, the likelihood of retrieving sperm with
91 a TESE is related to the testis' histological phenotype: (i) hypospermatogenesis, (ii) Sertoli cell-
92 only syndrome (SCOS, with the absence of germ cells in the tubules), and (iii) germ cell
93 maturation arrest (MA, where developmental stops at the spermatocyte or spermatid stage).
94 MA can be homogeneous (i.e. all the seminiferous tubules have the same appearance) or
95 mixte (i.e. tubules differ in their appearance) (Robin *et al.*, 2010). With a view to subsequent
96 *in vitro* fertilization, surgical sperm recovery via TESE is futile in cases of homogeneous MA or
97 SCOS (i.e. when mature haploid germ cells are absent).

98 Many cases of NOA are thought to have a genetic cause. After acquired diseases have been
99 ruled out, genetic screening is always recommended for men with NOA patients. This
100 screening is typically limited to karyotyping for the identification of chromosomal
101 abnormalities (De Braekeleer and Dao, 1991) and Y chromosome microdeletions (Vogt *et al.*,
102 1992). Over the last few decades, whole-genome analyses (especially array comparative
103 genomic hybridization (CGH) and whole-exome sequencing (WES)) have been used to discover
104 novel genetic defects associated with spermatogenesis failure or NOA (Cannarella *et al.*, 2020;
105 Krausz *et al.*, 2020). Several lines of evidence indicate that MA can be caused by point
106 mutations in single genes and by copy number variations (CNVs) (Halder *et al.*, 2017), notably
107 (i) the occurrence of MA in male siblings, (ii) the features of monogenic mouse models with
108 MA, and (iii) the fact that spermatogenesis is governed by a particular set of genes. The list of
109 gene mutations leading to NOA continues to grow (Houston *et al.*, 2021) – confirming that a
110 large number of genes are involved in spermatogenesis (Matzuk and Lamb, 2008). To date,

111 few mutations in human genes directly involved in meiosis have been linked to MA in
112 particular (Bellil *et al.*, 2021; Houston *et al.*, 2021). The sequencing of these mutated genes
113 has not yet been integrated into the clinical management of men. Some researchers have
114 suggested sequencing a panel of candidate genes prior to TESE, especially for genes that are
115 frequently found to be mutated in NOA (e.g. *TEX11*, *STAG3*, and *SYCE1* (Cannarella *et al.*,
116 2020)). When at least one of these genes carries a deleterious mutation (e.g. as listed in the
117 ClinVar database (<http://www.clinvar.com/>)), the likelihood of sperm retrieval is low and so
118 futile TESE could be avoided.

119 At present, the only definitive contraindications for TESE in men with NOA are a 46,XX
120 karyotype (usually 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2) (Ferguson-Smith, 1966)) and AZFa and/or
121 AZFb regions microdeletions (Patrat *et al.*, 2010). These abnormalities lead to SCOS or MA.,
122 Other chromosomal abnormalities do not contraindicate TESE, although genetic counselling is
123 required to evaluate the risk of an unbalanced karyotype in the offspring; this is mainly applied
124 to structural chromosome rearrangement. Thus, karyotyping and screening for Y chromosome
125 microdeletions (De Braekeleer and Dao, 1991; Jungwirth *et al.*, 2012) are still the first-line
126 analyses.

127 Furthermore, the respective medical benefits of a gene panel approach and WES must be
128 compared; longer sequences will be associated with a greater number of genetic variants,
129 higher costs, and a greater probability of incidental findings. The latter point will complicate
130 the provision of patient consent, require pre- and post-test genetic counselling, and make the
131 data more difficult to interpret. However, a focus on genes involved on spermatogenesis could
132 help to avoid the incidental discovery of gene defects associated with other pathologies (e.g.
133 cancer).

134 First, we evaluated the incidence of SNPs and CNVs in patients with a particular clinical
135 phenotype, in order to refine our clinical practice. Furthermore, it is now necessary to
136 determine whether new technological approaches like WES should be performed before TESE
137 or after a first negative TESE. In order to address these issues, we performed an SNP-CGH array
138 analysis and WES in a series of 26 men with homogeneous spermatogenetic MA and a positive
139 or negative TESE result. We also used immunohistochemical techniques to assess the impact
140 of the identified gene variants on the expression of candidate proteins during
141 spermatogenesis.

142 **Material and methods**

143 **Patients**

144 We included patients with idiopathic NOA in Bicêtre, Lille and Poissy hospital. NOA is caused
145 by complete MA at the spermatocyte stage in all seminiferous tubules. The histopathological
146 analysis was performed independently by two expert histologists. Disagreements have been
147 considered as an exclusion criteria. Patients with an abnormal karyotype or Y chromosome
148 microdeletions were excluded. After counselling and the provision of consent, DNA was
149 purified from whole blood or buffy coat samples either automatically (using a QIASymphony
150 DSP DNA Midi Kit, Qiagen, Venlo, Nederland) or manually. Parental DNA was not available for
151 all study participants.

152 **Ethical approval**

153 The study protocol was approved by an independent ethics committee (*CPP Ile de France-*
154 *Ouest*, Paris, France; reference: 01-132). All participants gave their written, informed consent.

155 **SNP-CGH-array analysis and CNV selection**

156 We performed array CGH (SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, Agilent
157 Technologies, Santa Clara, CA, USA), in order to (i) identify CNVs associated to MA, (ii) identify
158 regions with loss of heterozygosity (LOH, also referred to as runs of homozygosity) for
159 consanguineous patients, and (ii) to rule out the presence of TEX11 exonic microdeletions
160 (Yatsenko et al, 2015). The array CGH protocol has been validated by our laboratory (Ghieh *et*
161 *al.*, 2021b). The experimental protocol and the interpretation procedure are detailed in
162 Supplemental Data 1.

163 **Whole-exome sequencing and variant prioritization**

164 WES was carried out at the genomics facility at the University of Versailles Saint Quentin
165 (Versailles, France) and by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany), using Illumina
166 technology (San Diego, CA, USA). Only homozygous or compound heterozygous variants were
167 considered. We retained variants causing insertions/deletions, missense, stop-loss, stop-gain
168 or frameshift mutations, or changes to splice acceptor/donor sites. Synonymous variants and
169 variants with untranslated 3' or 5' regions were excluded. Missense variant were selected by
170 combining (i) the allele frequency, (ii) the predicted effect on the encoded protein, and (iii)
171 data on predominant or exclusively expression of the protein in the testis or essential status
172 for spermatogenesis and meiosis. The experimental protocol and the interpretation
173 procedure are detailed in Supplemental Data 2.

174 [Validation of mutations by Sanger sequencing](#)

175 Variants prioritized in our analysis were experimentally validated using Sanger sequencing,
176 using a BigDye Terminator v3.1 sequencing kit A38073 (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
177 MA, USA) and a SeqStudio genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific). The experimental
178 protocol and the interpretation procedure are detailed in Supplemental Data 3. Primers used
179 are listed in Supplemental Table 1.

180

181 [Immunohistochemical analyses](#)

182 Protein expression was assessed with immunochemical techniques. Samples from participants
183 were compared with a control sample from patients with OA and normal spermatogenesis.
184 Immunohistochemistry was performed using the Benchmark XT Ventana Roche system with
185 the XT ultraView DAB v3 revelation kit (Roche Life Science, Penzberg, Germany). The primary
186 antibodies are listed in Supplemental Table 2, and the experimental protocol is detailed in
187 Supplemental Data 4.

188

189 **Results**

190 **Clinical characteristics of the study population**

191 Twenty-six patients (including 7 with a consanguineous family background) were included in
192 the study. In each case, homogenous MA of spermatogenesis in all seminiferous tubules
193 (according to a testicular biopsy) had been confirmed independently by two experts. The
194 mean \pm standard deviation (SD) volumes for the left and right testis were respectively $10.11 \pm$
195 4.31 ml and 11.47 ± 4.53 ml. The mean FSH, LH, E2, inhibin B and testosterone levels were
196 respectively 7.78 ± 6.05 IU/l, 6.59 ± 5.43 IU/l, 26.53 ± 10.93 ng/l, 106.00 ± 83.83 IU/l and 4.92
197 ± 1.8 μ g/l. The measured clinical variables and hormone levels were in line with the literature
198 data on the MA phenotype, i.e. half the usual testis volume and slightly elevated FSH and LH
199 levels.

200 TESE had enabled sperm retrieval for 5 of the 26 patients, forming the TESE+ group. Hence,
201 the TESE- group comprised 21 patients. Although 2 of the 5 TESE+ patients lacked a frozen
202 sperm sample, more than 20 spermatozoa were available for the other 3 (i.e. enough for
203 attempting in vitro fertilization without a further testicular biopsy).

204

205 **CGH analysis**

206 All the patients except patient (P)24 had provided enough DNA for SNP-CGH analysis. The
207 mean \pm SD total number of CNVs was 8.56 ± 7.06 (range: 1 to 30). The mean number of
208 nullosomies was 0.68 ± 2.41 , with 3.12 ± 3.24 deletions, 3.84 ± 3.04 duplications, and $0.92 \pm$
209 3.50 amplifications. The nullosomy regions did not contain any genes reported as being
210 essential for spermatogenesis. For all the spermatogenesis genes (see Supplemental Data 5)
211 affected by a heterozygous deletion or duplication, we used WES to search for mutations on
212 the other allele; no variants were found in any cases. Accordingly, we considered that the
213 CNVs were not responsible for the patients' phenotype. Furthermore, no TEX11 (testis
214 expressed 11) deletions (Yatsenko et al, 2015) were found in any of the 25 analyzed patients.
215 We also identified areas of homozygosity (LOH, in Mb) in each patient's genome. According to
216 the ACMG's criteria, the mean \pm SD inbreeding ratio was 2.14 ± 2.32 (range: 0.20 to 8.91). As
217 expected, 7 of the 25 analyzed MA patients had high inbreeding coefficients (between 2.3%
218 and 8.9%) and 18 had low inbreeding coefficients (between 0.9% and 1.75%). These results
219 enabled us to focus on regions of interest with LOH in the WES analysis of patients with high
220 inbreeding coefficients.

221 Exome analysis

222 We postulated that MA was associated with autosomal recessive or X-linked recessive
223 inheritance. Accordingly, a list of homozygous, compound heterozygous and X-linked variants
224 was drawn up for each patient after the exclusion of frequent variants and the application of
225 stringent filters (Table 1). We only considered variants in genes reported as being expressed
226 during spermatogenesis in humans or mice. The data for each patient are summarized in Table
227 1.

228 There were no homozygous or compound heterozygous variants in spermatogenesis-
229 associated or testis-expressed genes for 8 of the 26 patients, all of whom had non-
230 consanguineous family backgrounds. For the remaining 18 patients, we identified at least one
231 candidate variant (Table 1 and Supplemental Data 6). By applying additional selection criteria,
232 we only considered variants in 15 different genes for 15 patients.

233

234 Sanger sequencing, immunohistochemical analyses

235 With the exception of P24 (for whom no further material was available), the Sanger
236 sequencing confirmed all the participants' variants (Supplemental Figure 1). We then used
237 immunohistochemical techniques to semiquantitatively evaluate the protein levels on
238 testicular biopsies. We performed 15 immunohistochemical analyses (two for P21 but none
239 for P4 - a compound heterozygote for 2 *MEI1* (meiotic double-stranded break formation
240 protein 1) variants - due to a lack of material). The observed protein expression on control
241 samples was always in agreement with the human Protein Atlas database
242 (www.proteinatlas.org/). However, we noticed that the Protein Atlas did not contain data on
243 the testis expression of *SPATA22* (spermatogenesis associated 22), *EXO1* (exonuclease 1),
244 *FANCM* (FA complementation group M) and *MCMDC2* (minichromosome maintenance
245 domain containing 2).

246 Next, we compared protein expression in the testis on patient samples vs. the control (Figure
247 1). The results for P18 and P19 differed markedly from the control. *FANCM* expression was
248 observed in the cytoplasm only for P18 but in the nucleus only for the control. *MOV10L1*
249 (*mov10* like RISC complex RNA helicase 1) expression was observed in the nucleus only for P19
250 but in the cytoplasm only for the control. The variants' impact on these patients was therefore
251 uncertain. Relative to the control, P9 showed very low levels of *ZNF85* (zinc finger protein 85)

252 expression and P12 showed very low levels of EXO1 expression. Again, the variants' impact on
253 these patients was uncertain.

254 Protein expression was absent for the 11-remaining patients. Relative to the control patient,
255 these proteins were either not expressed (ARL2 (ADP ribosylation factor like GTPase 2) (P21)),
256 or expressed only at the spermatogonia and spermatocyte stages (for CCDC36 (coiled-coil
257 domain-containing protein 36) (P15), MCMDC2 (P21)), predominantly during the
258 spermatocyte stage for (SPATA22 (P3), SYCE1 (synaptonemal complex central element protein
259 1) (P6), PSMC3IP (PSMC3 interacting protein) (P7), C11orf80 (chromosome 11 open reading
260 frame 80) (P10), MAGEB6 (MAGE family member B6) (P11), TEX11 (P20) and MEI1 (P24)), or
261 during the spermatocyte and spermatid stages for CTCFL ((encoding CCCTC-binding factor like
262 (P2)).

263

264 Overall interpretation

265 Considering our results as a whole (Figure 2 and Table 1), we identified clearly deleterious
266 variants in 8 patients (all in the TESE- group) and VUS in 7 patients (4 in the TESE- group and 3
267 in the TESE+ group). P21 appeared to lack two proteins (MCMDC2 and ARL2). The genetic
268 diagnosis rate was 57.7% (15 out of 26) overall, 100% for consanguineous patients, and 42%
269 for non-consanguineous patients ($p=0.010$ when comparing the last two groups). The rates in
270 the TESE+ group (3 out 5; 60%) and the TESE- group (12 out of 21; 57.1%:) did not differ
271 significantly.

272

273 Discussion

274 Since 2013, whole-genome analysis has identified more than 40 candidate genes for idiopathic
275 NOA. However, two limitations should be noted. Firstly, only a few of these genes (*SYCE1*,
276 *TEX11*, and *STAG3*) have been identified in more than one study (Houston *et al.*, 2021).
277 Secondly, a number of different testicular histology phenotypes have been reported. Thirdly,
278 few of the studies focused on a particular, homogeneous phenotype. To date, the MA
279 phenotype has been studied most frequently, and over 25 candidate genes have been linked
280 to various stages of spermatogenesis. However, most of these variants were identified in
281 consanguineous families and were not confirmed in independent cohorts. The present study
282 is the first to have assessed a selected group of men with complete MA, TESE results, and a
283 testicular biopsy. The participants were included after a double-blind histological assessment
284 (i.e. the examiners were not aware of the TESE outcome); hence, we could evaluate the utility
285 of performing WES prior to TESE.

286

287 Use of an SNP-CGH array in cases of MA

288 Prior to WES, we used an SNP-CGH array to (i) identify new CNVs, (ii) screen for the recurrent
289 *TEX11* deletion (Yatsenko *et al.*, 2015), (iii) restrict the WES to regions with LOH, and (iv)
290 confirm the impact of consanguinity (likely to be high for a hypothetically autosomal recessive
291 disease). Only a few heterozygous deletions or duplications were observed for genes involved
292 in spermatogenesis. No deleterious variants on the second allele were observed with WES for
293 any of these genes. Furthermore, no *TEX11* gene deletions were found. Apart from the regions
294 with LOH in patients with a consanguineous family background, the SNP-CGH array did not
295 reveal any deleterious CNVs; this technique does not appear to be powerful enough in this
296 context. It might be more useful to identify CNVs through next-generation sequencing (NGS).
297 Several NGS tools have been developed in this respect, although each has strengths and
298 weaknesses in terms of applicability; no single tool can detect the entire range of DNA
299 variations (Pirooznia *et al.*, 2015). The development of new WES/whole-genome sequencing
300 tools should soon enable the identification of smaller CNVs. Although many researchers have
301 analysed CNVs in men with NOA patients, most of the studies revealed heterozygous CNVs,
302 CNVs that only predisposed to infertility, or duplication in spermatogenesis genes that cannot
303 alone account for the NOA phenotype (Sharma *et al.*, 2021).

304

305 Use of WES to identify SNPs

306 We successfully performed WES in a highly selected group of patients. The candidate genes
307 were selected testis-specific genes and/or a genes identified in a knock-out mouse model of
308 male infertility with spermatogenesis MA. We identified 16 variants that might be responsible
309 for MA in our patients. Only 5 of the affected genes have already been implicated in
310 azoospermia or spermatogenesis MA. We notably highlighted a novel deleterious missense
311 mutation (p.A495T) in the *TEX11* gene. More than 40 *TEX11* variants have been reported in
312 the literature (Ghieh *et al.*, 2019) - confirming the high incidence of *TEX11* gene mutations in
313 MA patients. We also identified novel variants in other genes previously reported as being
314 associated with NOA: *MEI1*, *SYCE1*, *PSMC3IP*, *SPATA22* and *FANCM*. Various researchers have
315 suggested the inclusion of these genes in a target panel for analysis prior to TESE (de Vries *et al.*,
316 2014; Al-Agha *et al.*, 2017; Ben Khelifa *et al.*, 2018; Kasak *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021). Our
317 WES analysis also highlighted deleterious variants in *CTCF*, *C11orf80*, *EXO1*, *CCDC36*,
318 *MOV10L1*, *MCMDC2*. All these genes have been previously described as acting during meiosis.
319 The genes' roles in spermatogenesis are summarized in Supplemental Data 7. As explained in
320 the description of our prioritisation strategy for variant identification, knock-out mouse
321 models have been developed and described for 8 of these genes. The observed defects
322 confirm the variants' potential effects on spermatogenesis. The roles of other candidate gene
323 variants identified in this study have not been described unambiguously in the literature.
324 There are no literature data on the functions of **ZNF85** and **ARL2** genes and proteins during
325 spermatogenesis in the mouse or in other animals. The role of **MAGEB6** during
326 spermatogenesis has not yet been elucidated.

327 WES vs. targeted sequencing: which is the best strategy?

328 When considering the immunohistochemical analyses, the TESE results, and the variants
329 reported in the present study, we were able to provide a definitive genetic diagnosis for 8 of
330 our patients. For the other 7 patients, the immunohistochemical analyses (n=4), the TESE
331 outcome (n=2) or both (n=1) left room for uncertainty (Figure 2). All the mutated genes
332 described in the present study are probably involved in meiotic progression (Figure 3) and
333 perhaps involved in MA.

334 Considering the complexity of the main steps in spermatogenesis and the large number of
335 genes involved, one would expect the MA phenotype to show a high degree of genetic
336 heterogeneity. Most of the genetic defects reported in the literature are involved in the early

337 stages of meiosis, such as chromosome synapsis and DSB repair (figure 3). One could therefore
338 expect whole-genome sequencing to identify a large number of many meiotic gene variants
339 that would impair pairing and/or recombination.

340 A targeted sequencing strategy has been proposed for the above-mentioned genes
341 (Cannarella *et al.*, 2020; Krausz *et al.*, 2020). Had we applied a targeted strategy for genes
342 known to be involved in MA or NOA, the genetic diagnosis rate would have been 27% (i.e. 7
343 of the 26 patients). Although this value is higher than for other diseases and disorders (such
344 as cardiovascular disease (Richard *et al.*, 2019), epilepsy (Good *et al.*, 2021), intellectual
345 deficiency (Bruel *et al.*, 2020) and premature ovarian insufficiency (Tucker *et al.*, 2016)), the
346 application of WES more than doubled the genetic diagnosis rate (to 57%). When considering
347 solely our 7 consanguineous patients, a targeted strategy yielded a diagnosis for 2 of them. In
348 contrast, the application of WES gave a genetic diagnosis rate of 100% (Figure 2).

349

350 The present study focused on genes expressed in the testis because the patients' consent only
351 covered the identification of genetic defects related to azoospermia. In fact, WES can also
352 generate incidental findings. Thus, the ACMG has issued guidelines on reporting incidental
353 findings in clinical exome and genome sequencing
354 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/>). A list of more than 50 genes has been
355 suggested for cardiomyopathy and cancer predisposition screening. The list only includes
356 actionable genes, i.e. those associated with a clear medical strategy. Actionability should be
357 the goal of WES analysis, and this is in line with our objective of avoid unnecessary TESEs in
358 men with NOA. Although the detection of a larger number of genetic variants increases the
359 cost and complexity of analysis and interpretation, these factors have tended to fall over time.
360 We believe that WES could become the gold standard genetic analysis in the near future -
361 especially for NOA (Ghieh *et al.*, 2021a). However, a WES analysis must always be preceded
362 by counselling. The implementation of WES is currently limited by the requirement for genetic
363 counselling before and after the analysis, the complexity of the data, the patient's medical
364 history, and the implications for the patient's family. All these issues will need to be resolved
365 in the near future. It should also be born in mind that only a few variants are reportedly of
366 importance in human male meiosis arrest, azoospermia (Maor-Sagie *et al.*, 2015), and female
367 premature ovarian insufficiency: for example *STAG3* (Jaillard *et al.*, 2020), *PSMC3IP* (Al-Agha
368 *et al.*, 2017), and *SYCE1* (de Vries *et al.*, 2014).

369 Thus, the large number of genes involved in spermatogenesis (Matzuk and Lamb, 2008) and
370 forthcoming improvements in genetic analysis software (which should report only class 4 and
371 5 variants, according to the ACMG's guidelines (Richards *et al.*, 2015)) will probably limit the
372 value of targeted sequencing, relative to WES.

373

374 [Should WES be recommended before or after TESE?](#)

375 For patients with azoospermia, the main objective of genetic testing (other than obtaining an
376 aetiological diagnosis) is to better predict the outcome of TESE. To date, TESE was only
377 contraindicated for individuals with a 46,XX karyotype or an AZFa and/or AZFb microdeletion
378 (Patrat *et al.*, 2010). Similarly, an *AURKC* gene defect contraindicated IVF in patients with
379 macrozoospermia (Dieterich *et al.*, 2007). In other spermatogenesis defects (e.g.
380 globozoospermia (Celse *et al.*, 2020) and multiple morphological abnormalities of the
381 flagellum (Touré *et al.*, 2020)), the diagnosis is solely etiological. However, the
382 contraindication of TESE after WES in patients with azoospermia requires strong arguments,
383 such as the identification of a frequent pathologic variant. In contrast, when the variant is first
384 reported, genetic counselling should include a discussion about the likelihood of a positive
385 TESE result, relative to the literature data. Here, the TESE outcome was not a selection
386 criterion. This gave us an opportunity to blindly evaluate the true impact of variant
387 identification on spermatogenesis and, more specifically, to provide the best advice on the
388 likelihood of sperm retrieval in TESE. A candidate variant was identified in 12 of the TESE-
389 patients. When considering only genes repeatedly described in the literature, the WES data
390 alone were conclusive and actionable for 2 patients (P7 with a *PMSC3IP* variant, and P20 with
391 a *TEX11* variant; Table 1). When combined with the immunohistochemistry results, the WES
392 data were conclusive for the 10 other patients (actionable after TESE in Table 1). Among the
393 TESE+ patients, VUS were identified for *SPATA22*, *MAGEB6*, and *EXO1*; only one gene has
394 previously been described in human MA (*SPATA22* (Wu *et al.*, 2021)). Here, the genetic
395 variants were part of the overall phenotype, and we cannot rule out effects by combinations
396 of genetic factors (Ghieh *et al.*, 2021b) and/or defects in the testicular environment.

397 Thus, one of the best ways of avoiding repeated futile TESEs after an initial negative outcome
398 might be the TESE-WES-immunohistochemistry sequence. As has been reported for TESE-
399 positive patients, the identification of a gene variant does not necessarily mean that TESE will
400 be negative. When combined with an immunohistochemical assessment, WES is a powerful

401 tool for classifying the patients after TESE. Although an immunohistochemical assessment
402 might improve the characterization of meiotic arrest in metaphase cells, the functional
403 validation of an identified variant is still the most powerful tool. However, cellular models of
404 meiosis are not available, and the development of a specific mouse model poses ethical
405 problems.

406 For men with a consanguineous family background, WES could be recommended; the
407 identification of a frameshift mutation or a deleterious mutation already known to cause
408 meiotic arrest in humans might help to avoid futile TESEs. More caution is probably required
409 for non-consanguineous men.

410

411 Conclusion

412 We reported the results of an SNP-CGH array analysis and then WES in a series of infertile men
413 with MA. The deleterious nature of some (but not all) of the highlighted mutations were
414 confirmed in immunohistochemical analyses. We conclude that (i) most cases of MA (and
415 especially those in consanguineous men) have a genetic aetiology; (ii) it is more informative
416 to focus on genes implicated in spermatogenesis with WES than with targeted sequencing; (iii)
417 WES might be a powerful tool after an initial negative TESE attempt in cases where a
418 deleterious variant is associated with a homogeneous histological profile (such as MA or
419 SCOS); and (iv) WES before TESE should be limited to consanguineous men. The identification
420 of gene defects will facilitate discussion with the patient about the TESE's risk/benefit ratio.
421 Although contraindicating TESE following the identification of a pathologic variant will take
422 more of the practitioner's time, we believe that this approach can markedly improve clinical
423 practice.

424

425 **Acknowledgements:** We thank the staff at the UVSQ's genomics facility.

426

427 **Author's roles:** FG: participated in data analysis, SNP-CGH array experiments,
428 immunohistochemical analyses, Sanger sequencing, and the writing of the first draft; SF and
429 ALB: revised the manuscript and validated the testicular histopathological phenotype; CL, NSB,
430 MA, DMG, MB, VI, FM and JP: included participants and/or performed testicular biopsies; JF,
431 CH, CG and MD: participated in and provided technical support for immunohistochemical
432 analyses, CGH, WES and/or Sanger sequencing; SJ: revised the manuscript; VS: supervised the
433 genetic analyses; HJG: bioinformatics analyses of WES data; AL: supervised the
434 immunohistochemical analyses; BMP: project supervision and revision of the various versions
435 of the manuscript. FV: supervised and coordinated the project and helped to draft the various
436 versions of the manuscript.

437

438 **Funding:** The study was funded by Fondation Maladise Rares (Paris, France), Merck
439 (Kenilworth, NJ,USA), IRSF (Montigny le bretonneux, France) and Agence de la Biomédecine
440 (St Denis, France). FG received a doctoral fellowship from the Ministère Délégué à
441 l'Enseignement Supérieur et à la Recherche, Paris-Saclay University ([https://www.universite-](https://www.universite-paris-saclay.fr/en)
442 [paris-saclay.fr/en](https://www.universite-paris-saclay.fr/en)), Université Versailles St Quentin (UVSQ) and the PHASE department of
443 Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE).

444

445 **Conflicts of interest:** None

446

447 **Data Availability statement:** Available

448

449 **Figure legends**

450 **Figure 1:** Immunohistochemical analysis results for candidate variants in testicular
451 seminiferous tubules of controls and patients. Scale bars = 200 μ m.

452

453 **Figure 2:** Summary of results obtained in our series, according to two different genetic
454 strategies: target sequencing (TS) or whole-exome sequencing (WES).

455

456 **Figure 3:** A schematic representation of the genes involved in the major events of
457 spermatogenesis. Candidate genes involved in MA in our study or in other studies are shown
458 in red and green, respectively. Other spermatogenesis-associated genes not described yet in
459 human MA are presented in shown.

460 (A): The spermatogenesis process. Human MA genes can be involved in the proliferation of
461 spermatogonial stem cells, the differentiation of spermatogonia, epigenetic modifications
462 during meiosis, the protection of spermatocytes from retrotransposons, and spermiogenesis.

463 (B): Homologous recombination during prophase I comprises four substages: leptonema,
464 zygonema, pachynema, and diplonema. A series of events occurs throughout this period,
465 including DSB formation, 5' to 3' resection, strand invasion, and crossover (double Holliday
466 junction) formation and resolution. MA-causative genes can affect DSB formation and repair,
467 and pairing, synapsis and recombination between homologous chromosomes. (C): Structure
468 of the fusion between chromosome telomeres and the nuclear membrane during pachynema
469 meiosis. During meiosis, telomeres attach to the inner nuclear membrane (INM) and drive the
470 chromosome movement required for homolog pairing and recombination. Human MA-
471 associated genes form complexes to accomplish this meiotic task. (D): The tripartite structure
472 of the synaptonemal complex (SC), consisting of two parallel lateral elements and a central
473 element. The SC normally forms between homologs during meiotic prophase I. Human MA-
474 associated genes are involved in the formation of the SC complex and synapsis between
475 homologous chromosomes.

476

477 **Supplemental Figure 1:** Sanger sequencing confirmation of each variant.

478

479 **Table legends**

480 [Table 1](#): Detailed genetic results and variants obtained for each patient. VUS: variant of
481 unknown significance.

482

483 [Supplemental Table 1](#): Primers used in the Sanger sequencing confirmation of the candidate
484 variants.

485

486 [Supplemental Table 2](#): Primary antibodies used in the immunohistochemical analyses.

487

488

489 **Supplemental data**

490 [Supplemental data 1](#): Protocol for the SNP-CGH-array analysis, and interpretation

491 [Supplemental data 2](#): Whole-exome sequencing and variant prioritization

492 [Supplemental data 3](#): Protocol for the validation of mutations by Sanger sequencing

493 [Supplemental data 4](#): Protocol for the immunohistochemical analyses

494 [Supplemental data 5](#): List of spermatogenesis genes affected by a heterozygous deletion or
495 duplication

496 [Supplemental data 6](#): Variant prioritization

497 [Supplemental data 7](#): Summary for genes never described (or only described once) in NOA

498

499

500 **REFERENCES**

- 501 Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, Moriwaki M, Moore B, Peacock KA, Mosbrugger T, Neklason
502 DW, Jorde LB, Yandell M, *et al.* Primary Ovarian Insufficiency and Azospermia in
503 Carriers of a Homozygous PSMC3IP Stop Gain Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;
504 ASRM. The management of obstructive azospermia: a committee opinion. *Fertil Steril*
505 2019;**111**:873–880.
- 506 Bellil H, Ghieh F, Hermel E, Mandon-Pepin B, Vialard F. Human testis-expressed (TEX) genes: a
507 review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic Clin Androl* 2021;**31**:9.
- 508 Ben Khelifa M, Ghieh F, Boudjenah R, Hue C, Fauvert D, Dard R, Garchon HJ, Vialard F. A MEI1
509 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous
510 family. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:1034–1037.
- 511 Bruel A-L, Vitobello A, Tran Mau-Them F, Nambot S, Sorlin A, Denommé-Pichon A-S, Delanne
512 J, Moutton S, Callier P, Duffourd Y, *et al.* Next-generation sequencing approaches and
513 challenges in the diagnosis of developmental anomalies and intellectual disability. *Clin*
514 *Genet* 2020;**98**:433–444.
- 515 Cannarella R, Condorelli RA, Paolacci S, Barbagallo F, Guerri G, Bertelli M, La Vignera S,
516 Calogero AE. Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield
517 in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian J Androl* 2020;
- 518 Celse T, Cazin C, Mietton F, Martinez G, Martinez D, Thierry-Mieg N, Septier A, Guillemain C,
519 Beurois J, Clergeau A, *et al.* Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with
520 globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. *Hum*
521 *Genet* 2020;
- 522 Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G, Fusco F,
523 Kadioglou A, Kliesch S, Kopa Z, *et al.* Sperm recovery and ICSI outcomes in men with
524 non-obstructive azospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*
525 *Update* 2019;**25**:733–757.
- 526 De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod Oxf*
527 *Engl* 1991;**6**:245–250.
- 528 Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sèle
529 B, Jouk P-S, *et al.* Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid
530 spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007;**39**:661–665.
- 531 Ferguson-Smith MA. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism
532 and of XX Klinefelter's syndrome. *Lancet Lond Engl* 1966;**2**:475–476.
- 533 Ghieh F, Barbotin A-L, Leroy C, Marcelli F, Swierkowsky-Blanchard N, Serazin V, Mandon-Pepin
534 B, Vialard F. Will whole-genome sequencing become the first-line genetic analysis for
535 male infertility in the near future? *Basic Clin Androl* 2021a;**31**:21.
- 536 Ghieh F, Barbotin, A.L., Prasivoravong, J., Ferlicot, S., Mandon-Pepin, B., Fortemp, J., Garchon,
537 H.J., Serazin, V., Leroy, C., Marcelli, F., *et al.* Azospermia and reciprocal translocations:
538 should whole-exome sequencing be recommended? *Basic Clin Androl* 2021b;.
- 539 Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Genetic defects in human azospermia. *Basic*
540 *Clin Androl* 2019;**29**:4.
- 541 Good J-M, Atallah I, Castro Jimenez M, Benninger D, Kuntzer T, Superti-Furga A, Tran C. NGS-
542 Based Diagnosis of Treatable Neurogenetic Disorders in Adults: Opportunities and
543 Challenges. *Genes* 2021;**12**:695.
- 544 Halder A, Kumar P, Jain M, Iyer VK. Copy number variations in testicular maturation arrest.
545 *Andrology* 2017;**5**:460–472.

- 546 Houston BJ, Riera-Escamilla A, Wyrwoll MJ, Salas-Huetos A, Xavier MJ, Nagirnaja L, Friedrich
547 C, Conrad DF, Aston KI, Krausz C, *et al.* A systematic review of the validated monogenic
548 causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-
549 disease relationships. *Hum Reprod Update* 2021;dmab030.
- 550 Jaillard S, McElreavy K, Robevska G, Akloul L, Ghieh F, Sreenivasan R, Beaumont M,
551 Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Neyroud A-S, *et al.* STAG3 homozygous missense
552 variant causes primary ovarian insufficiency and male non-obstructive azoospermia.
553 *Mol Hum Reprod* 2020;**26**:665–677.
- 554 Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C, European
555 Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of
556 Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012;**62**:324–332.
- 557 Kasak L, Punab M, Nagirnaja L, Grigorova M, Minajeva A, Lopes AM, Punab AM, Aston KI,
558 Carvalho F, Laasik E, *et al.* Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM
559 Cause Non-obstructive Azoospermia. *Am J Hum Genet* 2018;**103**:200–212.
- 560 Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, Pybus M,
561 Friedrich C, Wyrwoll MJ, Casamonti E, *et al.* Genetic dissection of spermatogenic arrest
562 through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic
563 men. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2020;**22**:1956–1966.
- 564 Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S, Laufer N, Richler C,
565 Frumkin A. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive
566 azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:887–891.
- 567 Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat*
568 *Med* 2008;**14**:1197–1213.
- 569 Patrat C, Bienvenu T, Janny L, Faure A-K, Fauque P, Akinin-Seifer I, Davy C, Thiounn N, Jouannet
570 P, Lévy R. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertil*
571 *Steril* 2010;**93**:822–832.
- 572 Pirooznia M, Goes FS, Zandi PP. Whole-genome CNV analysis: advances in computational
573 approaches. *Front Genet* 2015;**6**:138.
- 574 Richard P, Ader F, Roux M, Donal E, Eicher J-C, Aoutil N, Huttin O, Selton-Suty C, Coisne D,
575 Jondeau G, *et al.* Targeted panel sequencing in adult patients with left ventricular non-
576 compaction reveals a large genetic heterogeneity. *Clin Genet* 2019;**95**:356–367.
- 577 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector
578 E, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint
579 consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and
580 Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med*
581 *Genet* 2015;**17**:405–424.
- 582 Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcelli F, Rigot J-M, Mitchell V. [Assessment of
583 azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann Pathol*
584 2010;**30**:182–195.
- 585 Sharma A, Jain M, Halder A, Kaushal S. Identification of genomic imbalances (CNVs as well as
586 LOH) in sertoli cell only syndrome cases through cytoscan microarray. *Gene*
587 2021;**801**:145851.
- 588 Touré A, Martinez G, Kherraf Z-E, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. The genetic
589 architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet* 2020;
- 590 Tucker EJ, Grover SR, Bachelot A, Touraine P, Sinclair AH. Premature Ovarian Insufficiency:
591 New Perspectives on Genetic Cause and Phenotypic Spectrum. *Endocr Rev*
592 2016;**37**:609–635.

- 593 Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the
594 Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human
595 spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992;**89**:491–496.
- 596 Vries L de, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing
597 reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian
598 insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:E2129-2132.
- 599 Wu Y, Li Y, Murtaza G, Zhou J, Jiao Y, Gong C, Hu C, Han Q, Zhang H, Zhang Y, *et al.* Whole-
600 exome sequencing of consanguineous families with infertile men and women
601 identifies homologous mutations in SPATA22 and MEIOB. *Hum Reprod Oxf Engl*
602 2021;**36**:2793–2804.
- 603
- 604

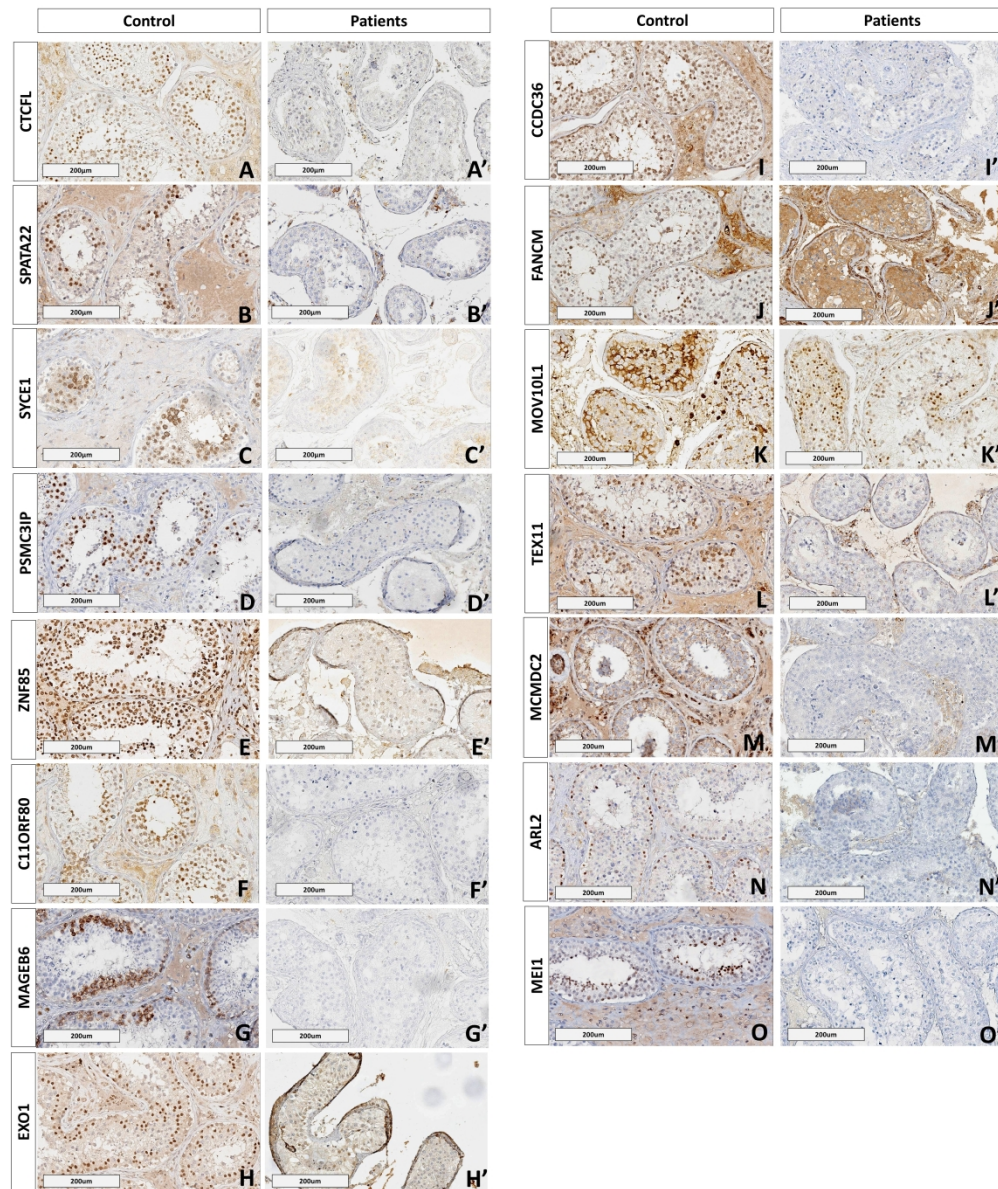
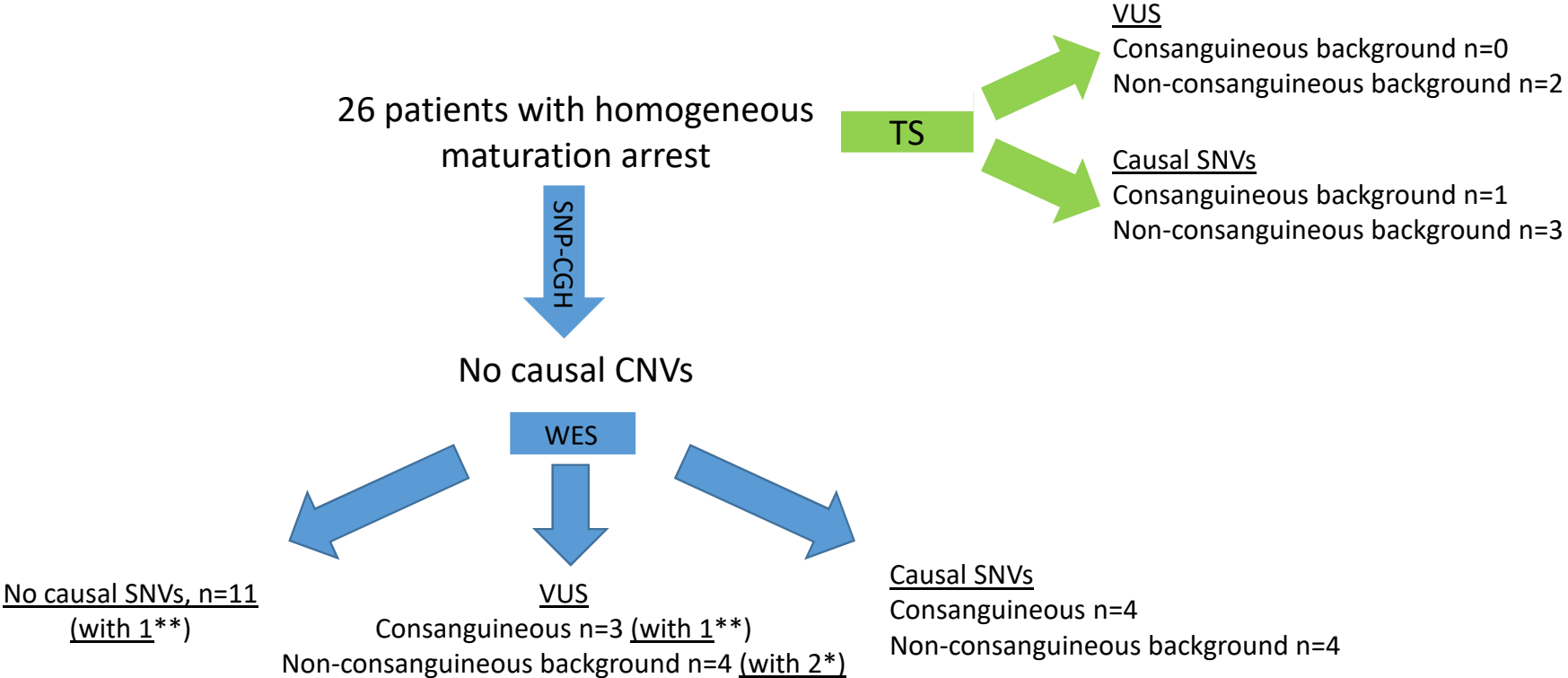
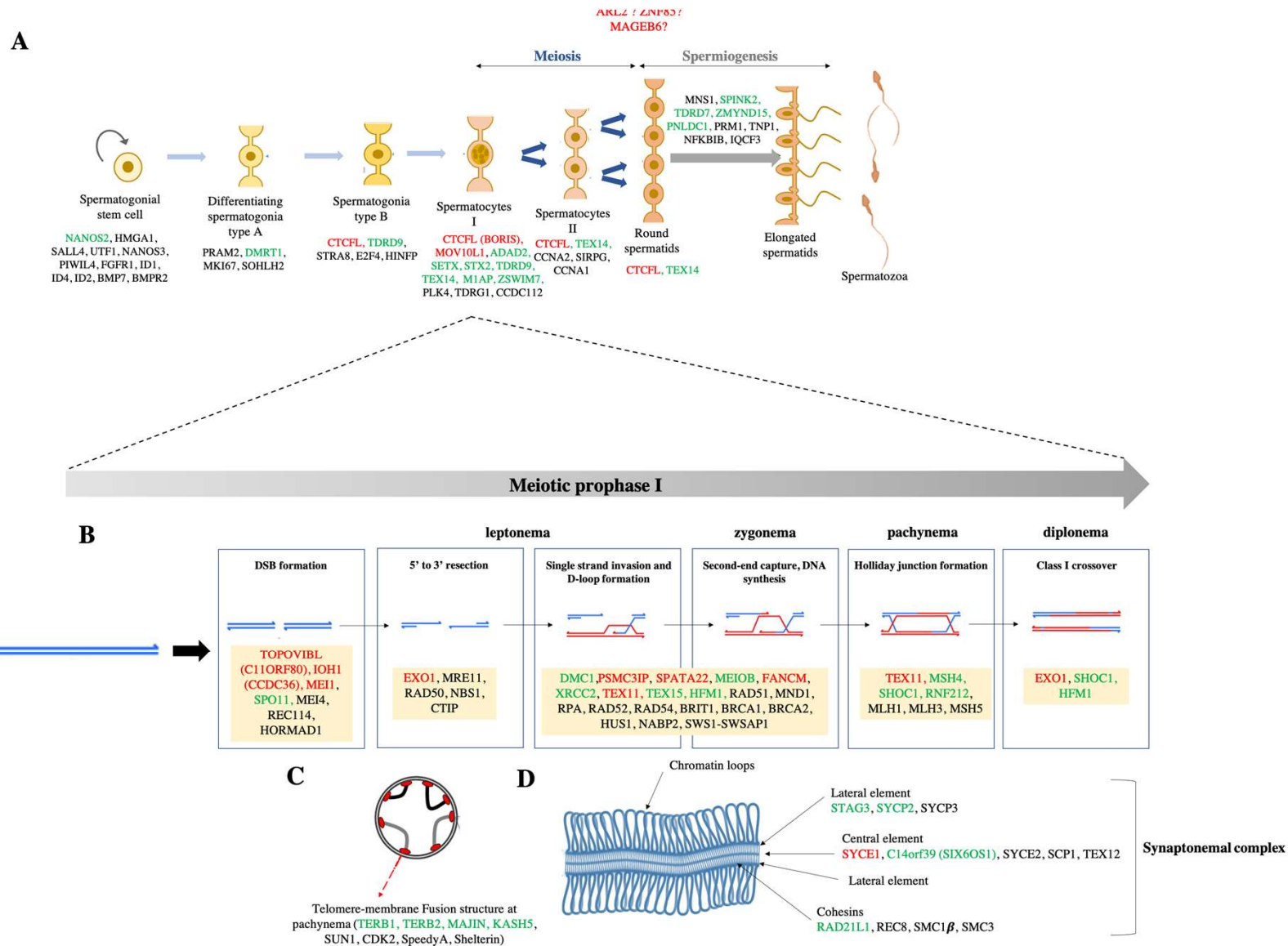


Fig1

1165x1397mm (96 x 96 DPI)



Positive TESE, with** or without* frozen spermatozoa



Patient	Consanguinity rate	TESE outcome	Gene		Variant											Decision after WES	Sanger	Confirmation			Conclusive	Previously reported gene	Actionable	
					Genomic position		Nucleotide	Protein	Type	Frequency	Predictive pathogenicity				Classification			Immunohistochemical assessment					Before TESE	After TESE
			Name	NM	MCAP	Revel					SIFT	Polyphe	Human protein atlas	Expression in the control				Expression in the patient						
P1	0.96	Positive +			chr20: 57498582	exon10:c.T1960C	C654R	Homozygote	Unknown	Benign	Benign	Deleterious	Deleterious	VUS	To be confirmed	Yes	nuclear expression in spermatogonia, preleptotene spermatocytes (high) and pachytene spermatocytes (low)	nuclear in germ cells, with the highest expression in spermatocytes and round spermatids	None	Yes	No	No	Yes	
P2	6.25*	Negative	CTCF	NM_001269041	chr20: 57515764	exon4:c.A344G	Y115C	Homozygote	Unknown	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes	nuclear expression in spermatogonia, preleptotene spermatocytes (high) and pachytene spermatocytes (low)	nuclear in germ cells, with the highest expression in spermatocytes and round spermatids	None	Yes	No	No	Yes	
P3	7.15*	Positive +	SPATA22	NM_001170696	chr17: 3462708	exon3:c.G103A	G35R	Homozygote	inf-e-04	Unknown	Benign	Benign	Benign	Benign but very rare	To be confirmed	Yes	no data	nuclear expression in spermatocytes	None	Uncertain	No	No	No	
P4	1.07	Negative	MNS1	NM_0183865	chr15: 5644483	exon5:c.T647C	I216T	Homozygote	0.0178	Unknown	Benign	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression only in elongated or late spermatids (medium)	nuclear expression in spermatocytes	No sample	Uncertain	Yes	Debatable	Yes	
			MEI1	NM_152513	chr22: 41705502	exon3:c.299-2A>G	/	Heterozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	VUS											
P5	0.63	Negative	MLH1	NM_001167619	chr3: 37047639	exon15:c.A1129G	K377E	Heterozygote	0.0034	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Cis	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in pachytene spermatocytes and round or early spermatids	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	Yes	Debatable	Yes	
					chr3: 37047640	exon15:c.A1130C	K377T	Heterozygote	0.0034	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Cis										
P6	3.48*	Negative	SYCE1	NM_001143763	chr10: 133557865	exon6:c.A373G	R125G	Homozygote	0.0022	Unknown	Benign	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in pachytene spermatocytes and round or early spermatids	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	Yes	Debatable	Yes	
P7	0.9	Negative	PSM/CIP	NM_001256014	chr17: 42573326	exon5:c.333delG	R111fs	Homozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Frameshift	To be confirmed	Yes	nuclear expression in spermatogonia, preleptotene and pachytene spermatocytes, and elongated spermatids/cytoplasmic expression in round spermatids	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	Yes	Yes	Yes	
P8	1.14	Negative																						
P9	2.38*	Negative	ZNF85	NM_001256173	chr19: 2094941	exon3:c.736delG	T245fs	Homozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Frameshift	To be confirmed	Yes	nuclear/cytoplasmic expression in germ cells and Leydig cells	nuclear expression in all germ cells	None or very low	Uncertain	No	No	Probably	
			DNMT3a	NM_022552	chr2: 25275056	exon6:c.G524T	G175V	Heterozygote	Unknown	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Cis										
P10	2.68*	Negative	C11orf80	NM_001302084	chr11: 66788158	exon3:c.26-2A>G	/	Homozygote	inf-e-04	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	VUS	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in spermatogonia, preleptotene and pachytene spermatocytes, and in late and round spermatids	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	No	No	Yes	
					chr3: 37047640	exon15:c.A1130C	K377T	Heterozygote	0.0034	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Cis										
P11	1.13	Positive	MAGEB6	NM_173523.2	chrX:26194134-26194150	exon2:c.288_304del	T96fs	Heterozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Deleterious	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in pachytene spermatocytes	membrane expression in spermatocytes	None	Uncertain	No	No	No	
			TOPAZ1	NM_001145030	chr3: 44242181	exon1:c.G128C	C43S	Heterozygote	inf-e-04	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign										Likely Deleterious
P12	1.18	Positive	EXO1	NM_003686	chr1: 241853401	exon4:c.G325A	E109K	Heterozygote	0.0002	VUS	Benign	Deleterious	Deleterious	VUS	To be confirmed	Yes	no data	nuclear expression in spermatogonia (low) and spermatocytes (high)	None or very low	Uncertain	No	No	No	
					chr1: 241885313	exon14:c.2209-10<C	/	Heterozygote	0.0016	Unknown	Benign	Unknown	Unknown	VUS										
P13	0.78	Negative	SLC2A16	NM_033125	chr6: 110438740	exon5:c.G1291A	V43I	Heterozygote	0.0026	Unknown	Benign	Benign	Benign	Benign	To be confirmed	Yes								
P14	1.29	Negative			chr6: 110442732	exon4:c.A695G	E232G	Heterozygote	0.0149	Unknown	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes								
P15	1.21	Negative	CCDC36	NM_001135197	chr3: 49211800	exon2:c.A20G	N7S	Heterozygote	0.0004	Benign	Benign	Deleterious	Deleterious	VUS	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in pachytene spermatocytes, and round and elongated spermatids	nuclear expression in spermatogonia and spermatocytes	None	Yes	No	No	Yes	
					chr3:49256550-49256553	exon8:c.1053_1056del	K351fs	Heterozygote	inf-e-04	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Deleterious										
P16	1.75	Negative																						
P17	1.11	Positive +																						
P18	1.02	Negative	LRRCC1	NM_001349639	chr8: 85137473	exon11:c.T1202C	L401P	Homozygote	0.0039	Deleterious	Limite	Deleterious	Deleterious	VUS but frequent	To be confirmed	Yes	no data	nuclear expression in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids	cytoplasmic expression in germ cells	Uncertain	Yes	No	Debatable	
			MDC1	NM_014641	chr6: 30705059	exon10:c.4124delC	P1375fs	Heterozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Cis										
			FANCM	NM_001308133	chr14: 45137184	exon2:c.A624G	I208M	Heterozygote	0.0102	Unknown	Benign	Deleterious	Deleterious	VUS										
P19	5.49*	Negative	MOV10L1	NM_001164104	chr22: 50144223	exon18:c.G2485A	A829T	Homozygote	0	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	VUS but too frequent	To be confirmed	Yes	cytoplasmic/membrane expression in germ cells (weak) and leydig cells	cytoplasmic expression in spermatogonia and spermatocytes	nuclear expression in spermatogonia and spermatocytes	Uncertain	No	No	Debatable	
			ATM	NM_000051	chr11: 108272729	exon22:c.C3161G	P1054R	Homozygote	0.0166	Unknown	Limite	Deleterious	Deleterious	VUS but too frequent										
P20	0.29	Negative	TEX11	NM_031276	chrX: 70651450	exon17:c.G1483A	A495T	Homozygote	Unknown	Unknown	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes	nuclear expression in spermatogonia, preleptotene and pachytene spermatocytes	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	Yes	Yes	Yes	
P21	8.91*	Negative	MCMDC2	/	chr8: 66905436	intron: T/C	/	Homozygote	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	VUS	To be confirmed	Yes	no data	cytoplasmic expression in spermatogonia and spermatocytes	None	Yes	No	No	Yes	
			ARL2	NM_001199745	chr11: 65018680	exon3:c.C286T	R96C	Homozygote	inf-e-04	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious										To be confirmed
P22	0.84	Negative	MAP7	NM_001198617	chr6: 136362513	exon9:c.G1181A	R394Q	Heterozygote	0.0005	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes								
P23	1.15	Negative	MAP7	NM_001198617	chr6: 136372607	exon6:c.T488A	I163N	Heterozygote	0.0005	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	To be confirmed	Yes								
P24	not done	Negative	MEI1	NM_152513	chr22: 41699654	exon1:c.T116G	V39G	Heterozygote	0.015	Unknown	Benign	Benign	Benign	Benign	To be confirmed	No	cytoplasmic/membrane expression only in elongated or late spermatids (medium)	nuclear expression in spermatocytes	None	Yes	Yes	No	Yes	
					chr22: 41718236	exon6:c.A695T	D232V	Heterozygote	Unknown	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign but unknown										
P25	0.2	Negative			chr22: 41730527	exon9:c.T986C	L329P	Heterozygote	inf-e-04	Deleterious	Limite	Deleterious	Deleterious	Deleterious	To be confirmed	Yes								
P26	0.56	Negative																						

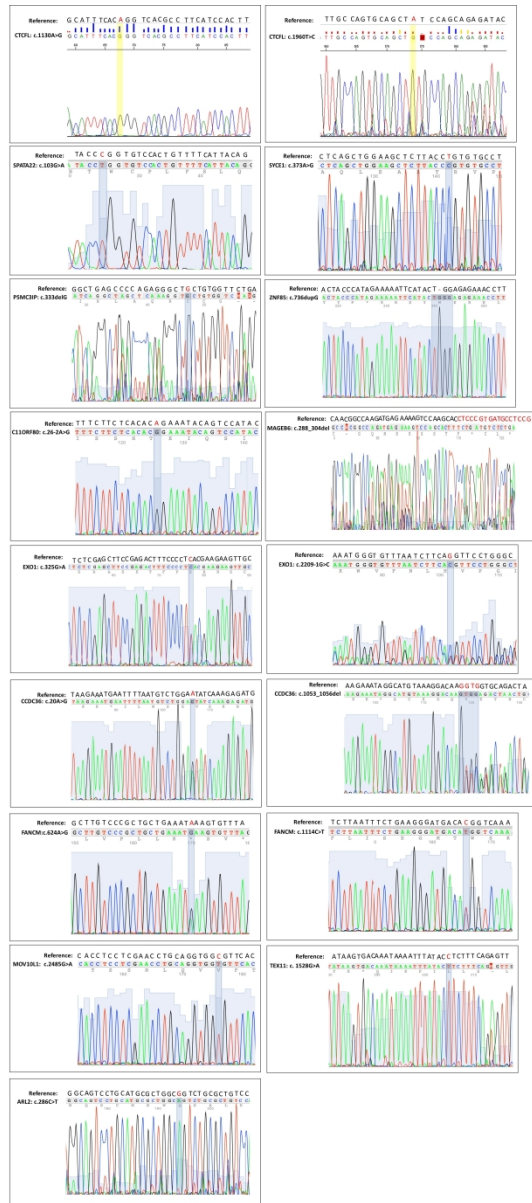
Gene	Sequence (5' -> 3')			
	Forward	Reverse	PCR product size	Annealing temperature
CTCF variant 1	GAACACGCAACCCGAATC	CAAGAAGCTGCTGCTGAGG	178 bp	57.1
CTCF variant 2	CCCTTACTGAGTGCGTTCT	TGCTCTGGTGCTCTGATGTT	249 bp	57.6
SPATA22	TCAGTTAGTAACAGACACATCCA	CCTGGGAAGCTGTGAATCCA	103 bp	59.5
MNS1	AGGTGCTTCAGTTCCTCACAA	ATGCTGCAGAAGACAAACGA	248 bp	56.2
SYCE1	CACTACTGCCAGCTGTTGGA	TTGCCAGGAAAAGGAAAGTG	196 bp	56
PSMC3IP	AAAGAGCAGGTGAGCTGGAA	GGAGCTCCCACACACTTACC	195 bp	58
ZNF85	CATGCCTAACTGAACATAGCAGA	TGGTAAGGTGTGCAGACTGG	516 bp	58.8
C11orf80	TGCATAGCCATTTCCAGTCA	GAAGGGTGTTACCCTGTCA	249 bp	55.6
MAGEB6	TCTGGGTGATTGTCGTAGGTC	CGGAGACATCATGGGAAG	287 bp	55.2
EXO1 variant 1	TTCTTCCCTTGAGAAGACG	CCATCTGCCCTTTGTCTTA	159 bp	56.8
EXO1 variant 2	GCGACAGAGTAGAGTCCAT	GAGAGTCTGCAGAACTGGACT	167 bp	55.2
CCDC36 variant 1	AGCTGCTGGAATGTCTTCGT	CCCGGCCAGAAAATCCTCTT	222 bp	57.8
CCDC36 variant 2	CTGCTGCATGGAATCCTGGT	CATGGTTCTTGGCACCTGTT	204 bp	57.6
FANCM variant 1	TGCATTCTGAAAAGCCAGACT	AGCATAGTTTCCGAGAGCTTT	247 bp	57.9
FANCM variant 2	TCCTGGAGAAAAGGAAACCATTCA	GTCTTCATTTGCGCCAAGTTCA	226 bp	60.8
MOV10L1	CACGAGAGCAAGGTGCTACA	GCAATCAAGCTCCACCATTT	247 bp	55.4
TEX11	TCTCACCCACACAGCTTT	CCCTCAGCCATTTGACTACCT	530 bp	58.3
ARL2	ATGGCCTCATCTGGGTAGTG	AGCATGTGTCCTGCCTCTG	250 bp	58.1

1 Table S1: Primers used in Sanger sequencing for the confirmation of candidate variants

2

Target	Species	Dilution	Reference	Supplier
ZIP4H/TEX11	Rabbit	1:50	NBP1-80692	NovusBio
SYCE1	rabbit	1:100	NBP1-88971	NovusBio
PSMC3IP	rabbit	1:200	NBP1-92301	NovusBio
ARL2	rabbit	1:500	NBP1-91680	NovusBio
MAGEB6	rabbit	1/1000	NBP1-84353	NovusBio
ZNF85	mouse	1:50	sc-130413	Santa Cruz
CTCFL	mouse	1:50	sc-377085	Santa Cruz
C11orf80	rabbit	1:20	PA5-58596	Thermo Fisher Scientific
MOV10L1	rabbit	1:50	PA5-53898	Thermo Fisher Scientific
C8orf45 (MCMDC2)	rabbit	1:100	PA5-69931	Invitrogen
EXO1	rabbit	1:50	PA5-86470	Invitrogen
SPATA22	mouse	1:150	MA5-26991	Invitrogen
MEI1	rabbit	1:10	HPA049240	Sigma Aldrich
CCDC36	rabbit	1:50	HPA045690	Sigma Aldrich
FANCM	mouse	1:10	NBP2-50418	NovusBio

3 Table S2: Primary antibodies used for the immunohistochemical confirmation of candidate variants



Supp Fig1.

775x1644mm (96 x 96 DPI)

Supplemental data 1: Protocol for the SNP-CGH-array analysis, and interpretation

The SurePrint G3 array can simultaneously detect CNVs and identify LOH with high resolution. It combines around 300,000 60-mer probes distributed across the genome and around 100,000 SNP probes.

Commercial human male genomic DNA (Agilent Technologies) was used as a control. For each test sample, approximately 100,000 SNP signal intensities were compared with the mean signals from the reference database. Following restriction enzyme digestion, Klenow-based enzyme digestion, labelling, washing, and drying, the microarray slides were scanned at a resolution of 2 μm using a microarray scanner (Agilent Technologies). Features were extracted from the scanned images using Feature Extraction software (version 4.0, Agilent Technologies) and analysed using the software's Aberration Detection Method 2 algorithm.

Loss of heterozygosity was analysed using CytoGenomics software (Agilent Technologies), which genotypes SNPs with an average distance of 7.2 kb between markers. The LOH can correspond to a region inherited from a common ancestor (e.g. a consanguineous family background) or a region in which both alleles come from the same parental chromosome (i.e. uniparental disomy). We followed the American College of Medical Genetics (ACMG)'s criteria for the selection of LOH regions and calculation of the inbreeding coefficient F (the homozygosity rate, defined as the fraction of the individual's genome that should be homozygous by descent)¹ for each patient²: $F = \text{total LOH}/\text{human genome size}$ (3138 Mb for the hg19 genome)³. The observed coefficients were compared with the theoretical coefficients for various degrees of inbreeding². The identification of regions with LOH also enabled us to focus on regions of interest for the WES analysis in consanguineous patients. Signals with five or more adjacent probes were interpreted as a CNV. Next, CNVs were classified on the basis of their mean CGH log ratio: >1.2 : homozygous duplication (amplification); 0.6 to 0.8: heterozygous duplications; -0.8 to -1.2: heterozygous deletion; <-2 : homozygous deletions (nullosomy). The data were then filtered to select candidate CNVs. Recurrent CNVs, CNVs due to variations in the reference DNA, and benign CNVs (as listed in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)) were eliminated. Lastly, we used the UCSC genome browser (<https://www.genome.ucsc.edu/>) to determine which genes were affected by each CNV.

Supplemental data 2: Whole-exome sequencing and variant prioritization

DNA libraries were built with a SureSelect Exome V6+UTR Capture Library Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions.

Sequence reads were trimmed to remove read-through adaptors and low-quality sequences (using fastp) ⁴ and then aligned against the GRCh38/hg38 build of the human genome (using the bwa-mem algorithm) ⁵. After the removal of PCR duplicates with Picard tools (<https://broadinstitute.github.io/picard/>), the bases were recalibrated using the GATK (v4) tool Baserecalibrator (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), as recommended by the Broad Institute Genome Team ⁶. Variants were then called with the GATK haplotype Caller (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), recalibrated with the GATK VariantRecalibrator tool (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), and annotated with ANNOVAR (<https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>) ⁷.

Only homozygous or compound heterozygous variants were considered. We retained variants causing insertions/deletions, missense, stop-loss, stop-gain or frameshift mutations, or changes to splice acceptor/donor sites. Synonymous variants and variants with untranslated 3' or 5' regions were excluded. Missense variant were selected by combining (i) the allele frequency in the GnomAD and the 1000Genomes databases, (ii) the predicted effect on the encoded protein, as judged with the Rare Exome Variant Ensemble Learner, SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), and M-CAP (<http://bejerano.stanford.edu/mcap/>), and (iii) data on predominant or exclusively expression of the protein in the testis or essential status for spermatogenesis and meiosis in the literature or the Gene-Tissue Expression (<https://gtexportal.org/home/>), Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), PubMed and Ensembl databases.

Supplemental data 3: Protocol for the validation of mutations by Sanger sequencing

After PCR amplification, the products were sequenced in both directions. Primers were chosen with Primer 3 Plus software (<http://primer3.ut.ee/>), according to the general principles of primer design. The primers for PCR and Sanger sequencing validation are listed in Supplemental Table 1. The chromatogram files generated by the analyzer were read with 4 Peaks software (<https://nucleobytes.com/4peaks/index.html>).

Supplemental data 4: Protocol for the immunohistochemical analyses

To identify and locate the altered proteins in human testicular tissues, 4 µm sections of paraffin-embedded testis samples were cut into ribbons with a microtome. The ribbons were deposited on slides (SuperFrost Plus type 25x75x1.0 mm, Thermo Fisher Scientific), which were then dried at 56°C for 24 hours to ensure good adhesion of the tissue before staining. After the inhibition of endogenous peroxidases, sections of testicular tissue were incubated with the primary antibody (Table S2) for 40 min. After several washing cycles, the antigen-antibody complex was visualized using a peroxidase/3,3'-diaminobenzidine detection system (rabbit/mouse). Slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated, and coverslipped for microscopy (magnification: x40). Each experiment included a negative control not exposed to the primary antibody.

Supplemental data 5: List of spermatogenesis genes affected by a heterozygous deletion or duplication

Spermatogenesis genes affected by a heterozygous deletion or duplication Other types of variant were found in the following spermatogenesis genes: *SYCE1* (1 deletion and 2 duplications), *PAX6* (1 deletion, 1 duplication, and 1 amplification), *SH2B1*, *SH2B1* (1 deletion and 2 amplifications), *SPATA31A3* (2 deletions), *DAZAP1*, *KISS1R*, *CDKN1C* (1 deletion and 1 amplification), *H2BFWT* (2 duplications), *MSH2*, *PAX8* (1 deletion), *TOP3B*, and *SATB2* (1 duplication).

Supplemental data 6: Variant prioritization

For 7 patients, homozygous variants were identified in a single gene (in *CTCF* (encoding CCCTC-binding factor like) for P2, *SPATA22* (spermatogenesis associated 22) for P3, *SYCE1* (synaptonemal complex central element protein 1) for P6, *PSMC3IP* (PSMC3 interacting protein) for P7, *C11orf80* (chromosome 11 open reading frame 80) for P10) or in several genes (*MOV10L1* (mov10 like RISC complex RNA helicase 1) and *ATM* (ATM serine/threonine kinase) for P19, *MCMDC2* (minichromosome maintenance domain containing 2) and *ARL2* (ADP ribosylation factor like GTPase 2) for P21). Three patients carried a homozygous variant in one gene and a compound heterozygous variant in another gene (respectively in *MNS1* (meiosis-specific nuclear structural 1) and *MEI1* (meiotic double-stranded break formation protein 1) for P4, *ZNF85* (zinc finger protein 85) and *DNMT3A* (DNA methyltransferase 3 alpha) for P9) or a compound heterozygous variant in two genes (*LRCC1* (leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1), *MDC1* (mediator of DNA damage checkpoint 1) and *FANCM* (FA complementation group M) for P18). Six patients carried a compound heterozygous variant in one gene (*MLH1* (MutL homolog 1) for P5, *EXO1* (exonuclease 1) for P12, P13-*SLC22A6* (Solute carrier family 22 member 6) for P13, *CCDC36* (coiled-coil domain-containing protein 36) for P15, P22-*MAP7*

(microtubule associated protein 7) for P22, and *MEI1* for P24). The last two patients carried an X-linked variant alone (*TEX11* (testis expressed 11) for P20) or an X-linked variant in one gene and a compound heterozygous variant in another (*MAGEB6* (MAGE family member B6) and *TOPAZ1* (testis and ovary specific TOPAZ 1) for P11). Overall, we identified variants in 24 different genes. By applying additional selection criteria, we excluded compound heterozygous variants in *TOPAZ1* (C43S: rare but benign; P673A: frequent but deleterious), *SLC22A16* (V431I: rare but benign; E232G: frequent but deleterious) and *MAP7* (I163N: rare but benign) for P11, P13, and P22 respectively. Furthermore, according to IGV view software (<https://software.broadinstitute.org/software/igv>) Htz variants for *MLH1* (P5), *DNMT3A* (P9) and *MDC1* (P18) were excluded because of their cis-allelic position. Hence, P5, P9, and P18 were then considered to be heterozygous for a multinucleotide variant. Even though some variants were considered to be deleterious or variants of unknown significance (VUS), they were excluded because of their high frequency: I216T in *MNS1* (P4), L401P in *LRRCC1* (P18), and P1054R in *ATM* (P19).

Supplemental data 7: Summary for genes never described (or only described once) in NOA

- ***CTCF*** (a testis-specific *CTCF* paralog gene also referred to as BORIS) is expressed in male germ cells and is essential for spermatogenesis. *CTCF* mRNA is especially abundant in spermatocytes and round spermatids⁸⁻¹⁰. *CTCF* activates the transcription of several testis-specific target genes (including *Gal3st1*)^{8,10} and has a role in male germline-imprinted gene methylation¹¹. Although male mice lacking *Ctcf* are fertile, they exhibit defects in spermatogenesis, small testes, abnormal aggregation of the synaptonemal complex 3 (SCP3) during meiosis, and abnormally low expression of testis-specific genes like *Prss50* and *Gal3st1*^{8,10}. Recent studies of a compound mutant showed that disruption of the *Ctcf* and *Ctcf* genes resulted in defective meiotic recombination, greater germ cell apoptosis, malformed testicular sperm, and male infertility; these findings emphasize the need for combined action by *CTCF* and its paralog *CTCF* during spermatogenesis¹².
- ***MCMDC2*** belongs to the minichromosomal maintenance (MCM) helicase family, which is known to be implicated in meiotic recombination. *MCMDC2* is essential for fertility and meiotic recombination. Male and female *Mcmdc2*^{-/-} mice are infertile. Defects in the synaptonemal complex and meiosis arrest lead to spermatocyte arrest at the pachytene stage in males and the disruption of primordial follicles (due to abnormal homologous synapsis and double-strand break (DSB) repair) and the absence of crossover in females^{13,14}. These data indicate that *MCMDC2* is involved in strand invasion during meiotic recombination and/or recombination stabilization for normal homologous pairing and DSB repair in the mouse.
- ***CCDC36*** (also known as interactor of HORMAD1 (IHO1)) is required for DSB formation in nonsynapsed regions during meiotic recombination. The protein is strongly expressed in testis and male germ cells

during the preleptotene, leptotene and zygotene stages. CCDC36/IHO1 forms a complex with REC114 and MEI4 during meiosis. Male and female *Iho1*^{-/-} mice are sterile and lack RAD51, DMC1 and RPA foci and SPO11 complexes in spermatocytes¹⁵. Hence, CCDC36/IHO1 appears to be essential for germ cell meiosis.

- **C11orf80** (also known as topoisomerase VI-B like (TOPOVIBL)) is also involved in DSB formation in the mouse. The protein is homologous with the B subunit of topoisomerase VI and interacts and forms a complex with SPO11. *Topovibl*^{-/-} spermatocytes display low gamma H2AX levels, the persistence of MEI4 foci, and a complete absence of RPA foci, leading to a lack of meiotic DSBs¹⁶.

- **MOV10L1** encodes a putative RNA helicase primarily expressed in type A spermatogonia through to pachytene spermatocytes. MOV10L1 represses retrotransposons (LINE1, IAP, and LTR) in the Piwi-interacting RNA pathway and thus protects the spermatocytes during spermatogenesis^{17,18}. Male *Mov10l1*^{-/-} mice were sterile due to the activation of retrotransposons in spermatocytes (via the loss of DNA methylation) and then complete spermatogenesis arrest in early prophase I. Interestingly, female *Mov10l1*^{-/-} mice were fertile¹⁷⁻¹⁹. In humans, only one study has investigated the association between *MOV10L1* polymorphisms and male infertility in general and especially spermatocyte MA in particular²⁰.

- **SPATA22** is a meiosis gene that was first described in 2012²¹ and is highly conserved among vertebrates. In both sexes, Spata22 mRNA and protein expression is restricted predominantly to germ cells during the first steps in meiosis. The gene is essential for the proper repair of DSBs during meiotic recombination. Spermatocytes from *Spata22* knock-out mice are unable to complete DSB repair, leading to meiotic prophase arrest, apoptosis, and sterility. Spata22 co-localizes with several proteins involved in meiotic recombination, including MEIOB, RAD51, DMC1, and MLH1²². Interestingly, SPATA22 expression seems to be abnormally low in men with NOA²³, and the gene is differentially methylated in patients with oligoasthenozoospermia²⁴. In the present study, the highlighted *Spata22* variant was very rare and was located in a region with LOH. This makes it a good candidate for meiosis arrest. However, the variant was identified in a man (P3) with a positive TESE outcome and is predicted to be benign by all the software tools used in our study. The presence of focal spermatogenesis in the patient's testis might therefore be due to the combination of the *Spata22* variant with another factor (e.g. an epigenetic alteration). Recently, a homozygote variant has been identified for a patient with meiotic arrest.

- **EXO1** is an exonuclease that resects 5' to 3' DNA ends and thus facilitates strand invasion and crossover formation during meiotic recombination. The exonuclease forms a complex with MutLγ (MLH1-MLH3) on recombination intermediates committed to the crossover repair pathway²⁵.

Disruption of *Exo1* in the mouse leads to male infertility and affects meiosis progression due to a defective DSB repair, chromosomal instability, and low crossover activity^{26,27}. In our study, the level of EXO1 protein expression in a patient in the TESE+ group (P12) was lower than in the control patient. However, very few spermatozoa were retrieved by TESE and so we consider that this *Exo1* variant is a VUS. As explained for some of the other variants, this mutation might contribute to the observed phenotype but might not be the sole cause of MA.

- **ZNF85** is a Krüppel-associated box zinc finger protein²⁸ that (according to Gene-Tissue Expression database) is strongly expressed in the testis.

- **ARL2** is a ubiquitously expressed GTPase that is reportedly involved in oocyte meiosis. *Arl2* depletion in the mouse impairs meiotic progression by affecting spindles and microfilaments and thus damaging oocyte quality²⁹. *Arl2* maintains mitochondrial dynamics and ATP levels in oocytes.

- **MAGEB6** gene, on X chromosome, is a member of the MAGE gene family, some of which are expressed selectively during mouse and human spermatogenesis (from the primordial germ cell stage (MAGE-b4, MAGE-A4) to the round spermatid stage (MAGE-b1/2/3)) - suggesting a role in germ cell development³⁰. However, the expression profiles and functions of most of the MAGE genes (including MAGEB6) are poorly known. The presence of *MAGEB6* mRNA in human testis has been confirmed by RNA-seq data from Necsulea et al.³¹ (available in the ReproGenomics viewer (<https://rgv.genouest.org/>)³²) and from Cardoso-Moreira et al.³³ (available on the Evo-Devo mammalian organ website: <https://apps.kaessmannlab.org/evodevoapp/>). In our study, the *MAGEB6* variant was found in a TESE+ patient for whom few spermatozoa were recovered by TESE. In our opinion, this variant is a VUS. The MAGEB6 protein shares 50 to 68% sequence identity with other members of the human MAGEB family, with most of the variability in the promoters and first exons. This degree of sequence identity is suggestive of functional redundancy. In the present case, the mutated protein MAGEB6 is shorter to 96 amino acids (vs. 407 in the WT), and expression levels in P11's testis sample were abnormally low. It is possible that the defect is rescued by another member of the MAGE family. It was recently reported that rare MAGEE2 variants have a potential role in azoospermia³⁴.

References:

1. McQuillan, R. *et al.* Runs of homozygosity in European populations. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 359–372 (2008).
2. Sund, K. L. *et al.* Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **15**, 70–78 (2013).
3. Wierenga, K. J., Jiang, Z., Yang, A. C., Mulvihill, J. J. & Tsinoremas, N. F. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **15**, 354–360 (2013).
4. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **34**, i884–i890 (2018).
5. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv13033997 Q-Bio* (2013).
6. DePristo, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–498 (2011).
7. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).
8. Suzuki, T. *et al.* Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2473–2484 (2010).
9. Kosaka-Suzuki, N. *et al.* Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J. Biol. Chem.* **286**, 27378–27388 (2011).
10. Sleutels, F. *et al.* The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner. *Epigenetics Chromatin* **5**, 8 (2012).
11. Jelinic, P., Stehle, J.-C. & Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* **4**, e355 (2006).
12. Rivero-Hinojosa, S. *et al.* The combined action of CTCF and its testis-specific paralog BORIS is essential for spermatogenesis. *Nat. Commun.* **12**, 3846 (2021).
13. Finsterbusch, F. *et al.* Alignment of Homologous Chromosomes and Effective Repair of Programmed DNA Double-Strand Breaks during Mouse Meiosis Require the Minichromosome Maintenance Domain Containing 2 (MCMDC2) Protein. *PLoS Genet.* **12**, e1006393 (2016).
14. McNairn, A. J., Rinaldi, V. D. & Schimenti, J. C. Repair of Meiotic DNA Breaks and Homolog Pairing in Mouse Meiosis Requires a Minichromosome Maintenance (MCM) Paralog. *Genetics* **205**, 529–537 (2017).
15. Stanzione, M. *et al.* Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IHO1 (CCDC36) in mice. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1208–1220 (2016).
16. Robert, T. *et al.* The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* **351**, 943–949 (2016).
17. Frost, R. J. A. *et al.* MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11847–11852 (2010).
18. Zheng, K. *et al.* Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11841–11846 (2010).
19. Fu, Q., Pandey, R. R., Leu, N. A., Pillai, R. S. & Wang, P. J. Mutations in the MOV10L1 ATP Hydrolysis Motif Cause piRNA Biogenesis Failure and Male Sterility in Mice. *Biol. Reprod.* **95**, 103 (2016).
20. Sarkardeh, H. *et al.* Association of MOV10L1 gene polymorphisms and male infertility in azoospermic men with complete maturation arrest. *J. Assist. Reprod. Genet.* **31**, 865–871 (2014).
21. La Salle, S. *et al.* Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells. *Biol. Reprod.* **86**, 45 (2012).

22. Hays, E. *et al.* Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells. *Andrology* **5**, 299–312 (2017).
23. Dorosh, A. *et al.* Expression analysis of MND1/GAJ, SPATA22, GAPDHS and ACR genes in testicular biopsies from non-obstructive azoospermia (NOA) patients. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **11**, 42 (2013).
24. Sujit, K. M. *et al.* Genome-wide differential methylation analyses identifies methylation signatures of male infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **33**, 2256–2267 (2018).
25. Sanchez, A. *et al.* Exo1 recruits Cdc5 polo kinase to MutLy to ensure efficient meiotic crossover formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 30577–30588 (2020).
26. Wei, K. *et al.* Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev.* **17**, 603–614 (2003).
27. Schaetzlein, S. *et al.* Mammalian Exo1 encodes both structural and catalytic functions that play distinct roles in essential biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2470-2479 (2013).
28. Poncelet, D. A. *et al.* Functional analysis of ZNF85 KRAB zinc finger protein, a member of the highly homologous ZNF91 family. *DNA Cell Biol.* **17**, 931–943 (1998).
29. Zhou, C.-X. *et al.* GTPases Arf5 and Arl2 function partially distinctly during oocyte meiosis. *J. Cell. Biochem.* **122**, 198–208 (2021).
30. Lee, A. K. & Potts, P. R. A Comprehensive Guide to the MAGE Family of Ubiquitin Ligases. *J. Mol. Biol.* **429**, 1114–1142 (2017).
31. Necsulea, A. *et al.* The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* **505**, 635–640 (2014).
32. Darde, T. A. *et al.* The ReproGenomics Viewer: an integrative cross-species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* **43**, W109-116 (2015).
33. Cardoso-Moreira, M. *et al.* Gene expression across mammalian organ development. *Nature* **571**, 505–509 (2019).
34. Alhathal, N. *et al.* A genomics approach to male infertility. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **22**, 1967–1975 (2020).

Article 3

Azoospermia and reciprocal translocations: should whole-exome sequencing be recommended?

Farah Ghieh, Anne-Laure Barbotin, Julie Prasivoravong, Sophie Ferlicot, Béatrice Mandon-Pepin, Joanne Fortemps, Henri-Jean Garchon, Valérie Serazin, Clara Leroy, François Marcelli, François Vialard

Basic and Clinical Andrology, accepté pour publication

Objectifs et principaux résultats de l'étude

Chez les individus azoospermes, toutes les anomalies chromosomiques, y compris les inversions, délétions et translocations chromosomiques, sont identifiées dans environ 10 à 15% des cas. Si la quasi-totalité des patients Klinefelter sont azoospermes, ceci n'est pas le cas pour les patients porteurs d'une translocation réciproque. Celle-ci est connue comme étant à l'origine d'une altération de la méiose entraînant un échec de la spermatogenèse. En fonction des chromosomes impliqués dans les translocations (autosomes ou gonosomes), les hommes porteurs peuvent présenter un phénotype d'infertilité allant de l'oligozoospermie à l'azoospermie non-obstructive, respectivement.

Pour les patients avec ANO, il existe un double challenge lors de la consultation génétique :

- 1- Évaluer le risque de ségrégation anormale de la translocation pour la descendance, à l'origine d'échec d'implantation embryonnaire, fausse-couche ou de la naissance d'un enfant avec handicap plus ou moins sévère.
- 2- Évaluer les chances de retrouver des spermatozoïdes à la TESE.

L'objectif de ce travail a été, à partir de l'analyse de 2 patients ayant une translocation réciproque : 46,Y,t(X ;21)(q10 ;q10) et 46,XY,t(20 ;22)(q11.2 ;p11.1), de savoir si la translocation seule pouvait expliquer l'arrêt de maturation de la spermatogenèse avec TESE négative.

Nos résultats ont montré que la translocation impliquant le chromosome X et le chromosome 21 était suffisante pour expliquer seule le phénotype du patient. Aucune autre altération génétique d'un gène de la spermatogenèse n'a été identifiée par WES. Au contraire, nous avons identifié 3 mutations homozygotes candidates dans le gène *TMPRSS9* (*Transmembrane Serine Protease 9*) chez le patient portant la translocation entre les autosomes 20 et 22. *TMPRSS9* n'est pas connu dans le processus de la spermatogenèse ou l'ANO dans la littérature. Compte tenu de la forte consanguinité du patient, des chromosomes impliqués dans la translocation, et des variants rares

délétères du gène testiculaire *TMPRSS9*, nous avons suggéré que la translocation seule n'est pas suffisante pour expliquer l'AM chez ce patient. Ces principaux résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc l'implication de deux évènements génétiques dans le phénotype d'AM du patient azosperme porteur de la translocation t (20 ;22).

Le séquençage de l'exome chez les patients azospermes est à nouveau précieux et bénéfique, mais cette fois, dans le cadre de translocations réciproques. Notre étude suggère d'élargir les tests génétiques chez les patients azospermes portant une translocation réciproque si : la translocation implique deux autosomes, et affecte un patient avec AM complet issu de parents consanguins.

CASE REPORT

Open Access

Azoospermia and reciprocal translocations: should whole-exome sequencing be recommended?



Farah Ghieh^{1,2}, Anne-Laure Barbotin³, Julie Prasivoravong³, Sophie Ferlicot⁴, Béatrice Mandon-Pepin^{1,2}, Joanne Fortemps⁶, Henri-Jean Garchon⁷, Valérie Serazin^{1,2,5}, Clara Leroy³, François Marcelli³ and François Vialard^{1,2,5*}

Abstract

Background: Although chromosome rearrangements are responsible for spermatogenesis failure, their impact depends greatly on the chromosomes involved. At present, karyotyping and Y chromosome microdeletion screening are the first-line genetic tests for patients with non-obstructive azoospermia. Although it is generally acknowledged that X or Y chromosome rearrangements lead to meiotic arrest and thus rule out any chance of sperm retrieval after a testicular biopsy, we currently lack markers for the likelihood of testicular sperm extraction (TESE) in patients with other chromosome rearrangements.

Results: We investigated the use of a single nucleotide polymorphism comparative genome hybridization array (SNP-CGH) and whole-exome sequencing (WES) for two patients with non-obstructive azoospermia and testicular meiotic arrest, a reciprocal translocation: t(X;21) and t(20;22), and an unsuccessful TESE. No additional gene defects were identified for the t(X;21) carrier - suggesting that t(X;21) alone damages spermatogenesis. In contrast, the highly consanguineous t(20;22) carrier had two deleterious homozygous variants in the *TMPRSS9* gene; these might have contributed to testicular meiotic arrest. Genetic defect was confirmed with Sanger sequencing and immunohistochemical assessments on testicular tissue sections.

Conclusions: Firstly, *TMPRSS9* gene defects might impact spermatogenesis. Secondly, as a function of the chromosome breakpoints for azoospermic patients with chromosome rearrangements, provision of the best possible genetic counselling means that genetic testing should not be limited to karyotyping. Given the risks associated with TESE, it is essential to perform WES - especially for consanguineous patients.

Keywords: Meiotic arrest, Non-obstructive azoospermia, Translocation, Whole-exome sequencing, *TMPRSS9*

* Correspondence: francois.vialard@uvsq.fr

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350 Jouy-en-Josas, France

²École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700 Maisons-Alfort, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Résumé

Contexte: Si les réarrangements chromosomiques sont connus pour être à l'origine d'une altération de la spermatogenèse, leur impact dépend fortement des chromosomes impliqués. À l'heure actuelle, la réalisation d'un caryotype et le dépistage des microdélétions du chromosome Y sont les tests génétiques réalisés en première intention chez les patients atteints d'azoospermie non obstructive. S'il est généralement admis que les réarrangements impliquant les chromosomes X ou Y entraînent un arrêt méiotique et réduisent fortement les chances de retrouver des spermatozoïdes après une biopsie testiculaire, nous manquons de marqueurs permettant de définir une probabilité d'extraction de spermatozoïdes testiculaires chez les patients présentant d'autres réarrangements chromosomiques.

Résultats: Nous avons utilisé l'hybridation génomique comparative sur puces (SNP-CGH) et le séquençage entier de l'exome (SEE) pour deux patients présentant une azoospermie non obstructive avec arrêt méiotique, une translocation réciproque: t(X;21) et t(20;22), et sans spermatozoïde retrouvé après biopsie testiculaire. Aucune autre anomalie génétique n'a été identifiée chez le patient porteur de la t(X;21) - ce qui suggère que la translocation seule altère la spermatogenèse. En revanche, le patient porteur de la t(20;22), consanguin, présentait deux variants homozygotes délétères dans le gène *TMPRSS9* qui pourraient contribuer à l'arrêt méiotique. Le variant génétique a été confirmé par séquençage Sanger et par immunohistochimie sur des coupes de tissu testiculaire.

Conclusions: Premièrement, nous faisons l'hypothèse d'un impact du défaut du gène *TMPRSS9* sur la spermatogenèse. De plus, en fonction des points de cassures chromosomiques pour les patients azoospermes ayant une translocation réciproque, nous suggérons de ne pas limiter les analyses génétiques à la réalisation d'un caryotype afin d'affiner le conseil génétique. Compte tenu des risques associés à la TESE, il est essentiel de réaliser un SEE en amont et en particulier pour les patients consanguins.

Mots clés: Arrêt méiotique, azoospermie non obstructive, translocation, séquençage de l'exome, *TMPRSS9*.

Introduction

The World Health Organization defines azoospermia as the complete absence of spermatozoa in the semen. The prevalence of azoospermia in the male general population is around 1 % [1, 2]. Azoospermia may have an excretory cause (obstruction of the seminal tract, leading to obstructive azoospermia) or a secretory cause (defective sperm production, leading to non-obstructive azoospermia (NOA)) [1, 2]. In both cases, only recourse to an invasive surgical procedure, testicular sperm extraction (TESE) can potentially retrieve spermatozoa and thus enable the couple's subsequent participation in an *in vitro* fertilization programme [3]. In NOA, the TESE result depends on the three main testicular histological phenotypes: (i) early or late germ cell meiotic arrest (MA), (ii) Sertoli-cell-only syndrome (SCOS), and (iii) hypospermatogenesis with morphological mosaicism. One can also distinguish between pure phenotypes (in which all the seminiferous tubules have the same appearance) and mixed phenotypes (in which the tubules differ in appearance) [4]. TESE is generally negative in cases of pure MA and SCOS, and generally positive in cases of hypospermatogenesis.

Although NOA is likely to have a genetic cause, only a few genetic abnormalities have been specifically identified as recurrent causes of this condition; they include chromosomal aberrations (mainly 47,XXY—Klinefelter syndrome) [5] and Y chromosome microdeletions [6].

Recently, various researchers have used whole-genome analyses (especially array comparative genomic hybridization (CGH) and whole-exome sequencing (WES)) to identify genetic defects associated with spermatogenesis failure or NOA [7–9]. Only defects in Testis-expressed gene 11 (*TEX11*) gene are recurrently identified in NOA patients with MA. The list of gene mutations leading to NOA is growing and thus suggests that a large number of genes are involved in spermatogenesis [10]. Although genetic testing is currently used to help diagnose the aetiology of male infertility, it is not considered to be a prognostic tool for evaluating the likelihood of a positive TESE. In general, we need to find ways of preventing unnecessary TESE in NOA patients with genetic abnormalities. To date, AZFa and/or b microdeletions and a 46,XX karyotype are the only genetic abnormalities that counter-indicate TESE in NOA patients [11]. Conversely, it is now accepted that TESE will be successful in more than 40 % of men with Klinefelter syndrome; this is due to testicular mosaicism and the presence of a few normal 46,XY germ cells in the testis [12].

As with chromosomal rearrangements, the impact of translocations on spermatogenesis probably depends on the chromosomes involved. In cases of azoospermia, only translocations involving the X and Y chromosomes are thought to lead to spermatogenesis failure (due to impairment of the sex vesicle cycle) [13]. However, most

andrologists agree that spermatogenesis failure cannot be explained by reciprocal or Robertsonian translocations or inversions alone (especially those involving autosomal chromosomes). The testicular environment might create a highly variable sperm count that ranges from normal to azoospermic. In such a context, a very low sperm count is likely to result from the combination of two genetic defects. With a view to better genetic counselling, the objective of the present study was to evaluate the potential utility of WES prior to TESE for azoospermic patients with reciprocal translocations. To this end, we performed WES for two patients with NOA (due to a reciprocal autosome-autosome translocation in one case and a gonosome-autosome translocation in the other).

Materials and methods

Patients

Case 1

A 28-year-old man had failed to conceive after 2 years of unprotected intercourse. Two consecutive sperm analyses revealed azoospermia; this was confirmed after sperm centrifugation. The follicle-stimulating hormone (FSH) and inhibin B levels were 3.7 IU/L and 125 IU/L, respectively. The semen biomarker levels (fructose, citrate, phosphatase acid, and alpha glucosidase) were respectively 102, 126, 3712 and 187 IU/ml. A clinical examination found testicular volumes of 18 and 14 ml. Karyotyping and Y chromosome microdeletion screening revealed a reciprocal translocation: 46,Y,t(X;21)(q10;q10). Despite the karyotyping result and on the basis of the hormone and semen biomarker levels, the patient opted for TESE. No spermatozoa were retrieved, and complete MA at the spermatocyte I stage was diagnosed.

Case 2

A 39-year-old man had failed to conceive after 1.5 years of unprotected intercourse. Two consecutive sperm analyses revealed azoospermia; again, this was confirmed after sperm centrifugation. The FSH and inhibin B levels were 11.5 IU/L and 20 IU/L, respectively. Semen biochemical assays were not performed for this patient. The testicular volume was low (between 6.8 and 7.2 ml). Karyotyping and Y chromosome microdeletion screening revealed a reciprocal translocation: 46,XY,t(20;22)(q11.2;p11.1). Despite the karyotyping result and after an unsuccessful resection for testicular varicocele, the patient opted for TESE. No spermatozoa were retrieved, and a complete MA at the spermatocyte I stage was diagnosed.

Histological diagnosis

A small piece of the testicular biopsy was fixed in Bouin's solution (MM France, Brignais, France) for 48 h. Serial sections were prepared from paraffin blocks and

stained with haematoxylin and eosin green FCF. All the sections were evaluated by the same expert histologist. Briefly, the mean seminiferous tubule diameter and the tubule wall thickness were measured on 100 seminiferous tubule cross-sections, using an eyepiece micrometre. The sections were classified according to the predominant histological pattern: Sertoli cell-only syndrome (SCOS, i.e. the absence of germ cells within the seminiferous tubules), maturation arrest (i.e. an absence of late-stage spermatogenesis, due to arrest at a particular stage), hypospermatogenesis (i.e. all stages of germ cell are present but in a low numbers), and normal or sub-normal spermatogenesis. Furthermore, samples with maturation arrest were classified as "complete MA" when all the seminiferous tubules were affected. We specified the stage of the MA according to the most mature cell type observed during the histological assessment (e.g. MA at the spermatocyte I stage).

Single nucleotide polymorphism comparative genome hybridization array analysis

In order to detect copy number variations (CNVs) and losses of heterozygosity (LOH, also referred to as runs of homozygosity), we performed array-based single nucleotide polymorphism comparative genome hybridization (SNP-CGH; SurePrint G3 Human Genome CGH + SNP Microarray Kit, 2 × 400 K; Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95,051, USA). The array was used according to the manufacturer's instructions, and commercially sourced male human genomic DNA (Agilent Technologies) was used as the control. Features were extracted from the scanned images using Feature Extraction software (version 4.0, Agilent Technologies) and analysed using the Aberration Detection Method 2 algorithm and CytoGenomics software (<https://www.agilent.com/en/genomics-software-downloads>; Agilent Technologies). LOH also helped us to analyse the WES results. Furthermore, the total size of all LOH regions (tsLOH) provided us with an opportunity to calculate the inbreeding coefficient for each patient (defined as CsLOH regions/genome size: 3,138 Mb in hg19) according to the American College of Medical Genetics' standards [14], and to then compare it with the theoretical inbreeding coefficient [15].

Whole-exome sequencing

Exome sequencing was carried out by Eurofins Genomics (Ebresberg 85,560, Germany) using a HiSeq2500 sequencer (Illumina, San Diego, CA 92,122 USA) and DNA libraries made with Agilent's SureSelect Exome V6 + UTR Capture Library Kit, according to the manufacturer's instructions. Sequence reads were trimmed to remove read-through adaptors and low-quality sequences (using fastp [16]) and aligned against the

GRCh38 build of the human genome (using the bwa-mem algorithm [17]). After the removal of PCR duplicates using Picard tools (<https://broadinstitute.github.io/picard/>), the bases were recalibrated using the GATK (v4) tool Baserecalibrator (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), as recommended by the Broad Institute Genome Team [18]. Variants were then called with GATK haplotype Caller (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), recalibrated with GATK VariantRecalibrator tool (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), and annotated with ANNOVAR (<https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>) [19].

Only homozygous or compound heterozygous variants with an allele frequency < 1% in GnomAD and the 1000Genomes project were included. We only retained variants causing insertions/deletions, missense, stop-loss, stop-gain or frameshift mutations, or changes to splice acceptor/donor sites. Synonymous and untranslated 3' or 5' regions variants were excluded. We selected missense variants with a high or moderate predicted effect on the encoded protein, as judged with the following prediction algorithms: REVEL (rare exome variant ensemble learner), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), and M-CAP (<http://bejerano.stanford.edu/mcap/>). Lastly, in order to identify variants potentially associated with MA, we only considered those in genes strongly or exclusively expressed in the testis or described as being essential for spermatogenesis and meiosis in the literature or in the Gene-Tissue Expression (<https://gtexportal.org/home/>), Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), PubMed or Ensembl databases.

Sanger sequencing

The variants observed in our analysis were confirmed with Sanger sequencing (carried out by Eurofins Genomics). Primers were designed using Primer 3 Plus software (<http://primer3.ut.ee/>), and 4 Peaks software (<https://nucleobytes.com/4peaks/>) was used to read the chromatogram files generated by Eurofins. For each mutation, primers are reported in supplementary material and data (Supplemental Table 1).

Immunohistochemical assessment

DNMT3B (DNA methyltransferase 3B) and Tmprss9 (transmembrane protease, serine 9) protein expression levels were assessed on testicular tissue sections from patient 2 and compared with those in a control subject with normal spermatogenesis and who had undergone a testicular biopsy for obstructive azoospermia. We used the Benchmark XT Ventana Roche immunohistochemistry (IHC) system and the XT UltraView Universal DAB Detection kit (Roche Life Science, Penzberg, Germany). To identify and localize the altered proteins in human

testicular tissues, 4 µm of paraffin-embedded testis sections from the patient and the control subject were prepared with a microtome. The sections were deposited on IHC slides (SuperFrost Plus type 25 × 75 × 1.0 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then dried at 56°C for 24 h to ensure good adhesion to the slide before staining. After the inhibition of endogenous peroxidases, the sections were incubated with the primary antibodies DNMT3B and Tmprss9 (NBP1-85815 (1/500) and NBP2-30892 (1/100), NovusBio, Centennial, CO, USA) 32 min. After several rounds of washing, the antigen-antibody complex was visualized using the DAB detection system (Roche Life Science, Penzberg, Germany). Slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated, and coverslipped for microscopy. Each experiment included negative controls not exposed to the primary antibody. Slides were examined under the microscope with a magnification of x40.

Results

Single nucleotide polymorphism comparative genome hybridization array analysis and WES

We did not find any CNVs that could explain the patients' respective spermatogenesis defects. In particular, we did not find any deletions of the *TEX11* gene –the most frequently altered gene in patients with MA, according to the literature data [20, 21]. The inbreeding coefficient was low (0.70%) for patient 1 and high (5.38%) for patient 2. These results prompted us to consider patient 2 as consanguineous and (especially for the latter patient) focus on regions of interest for WES.

For patient 1 (a 46,Y,t(X;21)(q10;q10) carrier), we did not find any SNVs that could have explained the MA. For patient 2 (a 46,XY,t(20;22)(q11.2;p11.1) carrier), and taking account of previously identified regions of interest with loss of heterozygosity, we identified a single homozygous single-nucleotide variant (SNV) in the *DNMT3B* gene (p.E115D, rs761700747) that had not previously been reported in the ExAC database (<https://gnomad.broadinstitute.org>). Given (i) the absence in the patient 2 of clinical signs of the immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 1 (OMIM 242,860) associated with deleterious *DNMT3B* SNVs, and (ii) the high predicted variability associated with this SNV in the various databases (Table 1), we decided to screen the entire exome and to focus on genes that are strongly expressed in the testis. Three homozygous SNVs (p.T4A (rs8100709), p.R74W (rs142862960) and p.T1044I (rs72522121)) were identified in *Tmprss9* gene. Two of the 3 SNVs were considered to be pathogenic and had a low frequency in general population (at 0.0011 and 0.0032, respectively, according to gnomAD). The data are summarized in Table 1. The variants observed in our analysis were confirmed with Sanger sequencing.

Table 1 Homozygous SNPs identified for patient 2, using WES

Gene	Mutation	Type	Frequency (gnomAD)	M-CAP	Revel	SIFT	Polyphen2
TMPRSS9	T4A	homozygous	0.0138	unknown	benign	benign	benign
	R74W	homozygous	0.0011	unknown	benign	deleterious	deleterious
	T1044I	homozygous	0.0032	unknown	deleterious	deleterious	deleterious
DNMT3B	E115D	homozygous	< 0.0001	deleterious	benign	benign	probably deleterious

Immunohistochemical assessment

In normal spermatogenesis, the TMPRSS9 protein is located in the nuclei of the spermatogonia (control subject: Fig. 1A), and the DNMT3B protein is located in the nuclei of spermatocytes (control subject: Fig. 1C). For patient 2, the seminiferous tubules (containing germ cells arrested at the spermatocyte stage) were not stained (Fig. 1B and D). In contrast, strong DNMT3B staining was detected in the cytoplasm of Leydig cells for the patient 2 but not for the control. These results suggested that the SNVs identified in patient 2 were linked to his testicular phenotype.

Discussion

The SNVs' impact on spermatogenesis

We identified three rare variants for patient 2 and then developed a hypothesis for the possible link between consanguinity, maturation arrest during spermatogenesis, and gene defects. The three *TMPRSS9* mutations all occurred in the isoform ENST00000332578.7, which is strongly expressed in testis. Both *TMPRSS9* and *DNMT3B* proteins are strongly expressed in testes,

according to the Gene-Tissue Expression database and the Human Protein Atlas. Although *TMPRSS9* mRNA expression has also been reported in the liver and spleen, there are no data on protein levels in these organs. High levels of *DNMT3B* mRNA expression are also observed in testes. The *DNMT3B* protein appears to be present in many tissues, with the highest levels in testis and placenta. An IHC assessment of a testicular biopsy from a control subject with a positive TESE and complete spermatogenesis revealed strong *TMPRSS9* protein staining in the nuclei of spermatogonia A and B and strong *DNMT3B* protein staining in spermatocytes. These results were in line with the expression data recorded in the Human Protein Atlas and indicated that *TMPRSS9* is expressed earlier than *DNMT3B* in the seminiferous tubules during normal spermatogenesis. If a defect in the *TMPRSS9* gene does indeed cause MA, it would presumably occur at the spermatogonia stage (i.e. before *DNMT3B* expression). More generally, the absence of *TMPRSS9* is associated with the absence of all the proteins expressed downstream (e.g. *DNMT3B*); this might explain the absence of protein expression in patient 2's testicular biopsy. Furthermore, many pathogenic allelic variants in *DNMT3B* have been identified [22, 23], all of which were associated with the immunodeficiency-

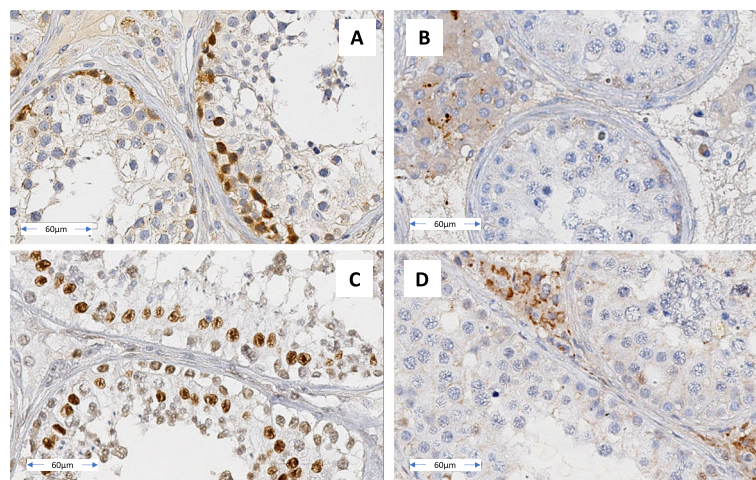


Fig. 1 Immunohistochemical assessment of seminiferous tubule expression of *TMPRSS9* (A: control; B: patient 2) and *DNMT3B* (C: control; D: patient 2) in the testes. A and C: normal spermatogenesis, showing normal expression of *TMPRSS9* and *DNMT3B*. B and D: spermatogenesis arrested at the spermatocyte stage, with no expression of *TMPRSS9* or *DNMT3B*. Staining: the antigen-antibody complex was visualized with the DAB detection system, and slides were counterstained with haematoxylin

centromeric instability-facial anomalies syndrome 1 (ICF1) (OMIM 242,860). The variants spanned the entire sequence, and there were no hotspots. Taking into account the great variability in the SNV's impact predicted by the various databases and in the absence of clinical manifestations of ICF1 syndrome, we conclude that the *DNMT3B* SNV did not have an effect on spermatogenesis. We therefore hypothesize that *TMPRSS9* gene defects (caused here by 2 rare pathogenic SNVs) may impair meiosis and lead to a spermatogenic defect. Further experiments will be necessary to refine our results for *TMPRSS9* and to characterize its putative functional role during spermatogenesis; this role has never been studied, even though the gene is known to be mainly or exclusively expressed in the testis. To date, *TMPRSS9* variants have been only reported in a single patient with autism spectrum disorders [24], who was a compound heterozygote for 2 frameshift mutations. Only one homozygous *Tmprss9* knockout mice has been reported in literature, with an exon 2 deletion. [25]. If mice were fertile, a residual *Tmprss9* mRNA expression could be observed; however, no definitive conclusions could be drawn with regard to fertility. In order to understand the impact of *TMPRSS9* on spermatogenesis, new null mouse models (i.e. models lacking mRNA expression) should be designed.

The impact of reciprocal translocation on spermatogenesis

Reciprocal translocations between two autosomes are the most frequent structural chromosomal abnormalities in humans. The prevalence of chromosomal abnormalities is 6.5 times higher in infertile male adults than in newborns [26]. Chromosome screening studies have established the relationship between the sperm count on one hand and the frequencies and types of chromosomal abnormalities on the other. It appears that reciprocal translocations involving only autosomes are more frequent in oligozoospermia, and that those involving gonosomes are associated with severe male infertility and azoospermia [27]. Gonosome-autosome translocations are rare and are divided into three groups, depending on the gonosome involved: Y-autosome translocations (i.e. t(Y;A)), X-autosome translocations (i.e. t(X;A)), and X-Y translocations. Spermatogenic arrest at the pachytene stage is mainly due to disruption of sex vesicle formation by the quadrivalent observed in all translocation segregations [28]. However, the majority of these patients have severe oligozoospermia and are infertile. For t(Y;A), it has been hypothesized that a smaller translocation segment is associated with more frequent bivalent formation and a higher sperm count [29]. This hypothesis was based on the sperm segregation pattern. In the few patients who showed

spermatogenesis, the great majority of spermatozoa were derived from alternate and adjacent segregation. For t(X;A), the interpretation was more complicated (as in our present case): various breakpoints were described, and the sperm segregation pattern was high variable [30]. The size of the segment involved in the translocation does not appear to be related to the TESE result. Although autosome (chromosome 1) breakpoints and X chromosome breakpoints are unusually frequent in male infertility [31], the breakpoint profile does not have prognostic value for TESE. Nevertheless, it has been suggested that the presence of an acrocentric chromosome is associated with a poor prognosis [32]. It has also been reported that a poor TESE prognosis is associated with the XY body in rearrangements involving an acrocentric chromosome [33] and an abnormally high frequency of breakpoints on an acrocentric p-arm in infertile patients [31].

The "two genetic defects" hypothesis

Taken as a whole, these data suggest that the t(X;A) alone could explain MA in patient 1 (with idiopathic azoospermia and normal testicular volume). This hypothesis was strengthened by the absence of a pathological variant in the WES analysis. In contrast, the reciprocal translocation alone could not explain the MA for patient 2. However, the combination of the reciprocal translocation with the 3 rare variants of *TMPRSS9* (2 of which were considered to be deleterious in predictive databases) could probably explained the spermatogenesis phenotype. These observations strengthen the "two genetic defects" hypothesis for spermatogenesis failure, as has been seen for several other pathologies [34].

In view of the present two cases, the possible impact of a reciprocal translocation on spermatogenesis should be discussed more widely during genetic counselling. Should TESE be suggested, therefore, in patients with a reciprocal translocation? In such a case, one must take account of additional genetic abnormalities. In order to evaluate the probability of successful TESE, we suggest that WES could be performed after considering the chromosome involved, the chromosome breakpoints, and the patient's family medical history. As described above, t(X;A) was probably the main cause of MA in patient 1. Considering this reciprocal translocation and the high probability of inheriting unbalanced chromosomes (due to translocation malsegregation), the probability of sperm retrieval with TESE is probably very low; this point should be discussed with the patient prior to surgery. We now require more data on when TESE should be ruled out completely. In contrast, the reciprocal translocation alone could not explain patient 2's testicular phenotype. If the inbreeding coefficient is high, WES should be considered - even though the scarcity of

literature data on the *TMPRSS9* gene prevents us drawing clear conclusions about TESE.

Limitations of the WES approach

WES provides an opportunity to map defects in genes involved in early or late germ cell meiotic arrest. However, a number of complicating factors must be borne in mind: the need for informed consent from the patient, the requirement for pre- and post-test genetic counseling, the complexity of data interpretation, and the cost. In order to limit the complexity and reduce the costs, we decided to focus solely on genes primarily or exclusively expressed in the testis; this would hopefully avoid the fortuitous discovery of gene defects associated with other pathologies (such as cancer) to limit patient feedback and the implications for the patient's family. Even though WES data are still time-consuming to interpret, the development of novel software tools should soon facilitate the identification and interpretation of all genetic variants. Although the present study might constitute the first step in a larger study, we would nevertheless consider implementing whole-genome sequencing as a replacement for WES and karyotyping.

Conclusion

Prior to TESE, genetic counselling is important for patients with a reciprocal translocation: discussion of the high probability of inheriting unbalanced chromosomes, and evaluation of the family history. However, our case reports also suggest that WES should be recommended for consanguineous patients, in order to better define the likelihood of sperm retrieval and with a focus on genes primarily or exclusively expressed in the testis. Furthermore, we suggest that deleterious *TMPRSS9* variants impact spermatogenesis – although further data are required.

Abbreviations

AZF: Azoospermia factor; CGH: Comparative genome hybridization; CNV: Copy number variation; T_sLOH: Total size of all LOH regions; DNMT3B: DNA methyltransferase 3B; FSH: Follicle-stimulating hormone; LOH: Loss of heterozygosity; MA: Meiotic arrest; Mb: Megabase; NOA: Non-obstructive azoospermia; SCOS: Sertoli-cell-only syndrome; SNP: Single nucleotide polymorphism; SNV: Single nucleotide variant; TEX11: Testis-expressed gene 11; TESE: Testicular sperm extraction; TMPRSS9: Transmembrane protease, serine 9; WES: Whole-exome sequencing

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00145-5>.

Additional file 1 : Supplemental Table 1. Primers used for Sanger sequencing in this study.

Acknowledgements

None.

Authors' contributions

FG: performed immunochemistry, Sanger confirmation, variant prioritization and wrote the paper. ALB: performed histological and TESE analysis. JP, CL: performed the clinical examination and TESE surgery. SF: supervised the immunochemistry analysis, revised the paper. BMP: revised the paper and supervised the study. JF: performed the immunochemistry analysis. HJG: supervised variant prioritization, revised the paper. VS: supervised Sanger analysis, revised the paper. FM: performed the clinical examination and TESE surgery, revised the paper. FV: designed the study, wrote the paper. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

Fondation maladies rares: <https://fondation-maladiesrares.org>, IRSF: <http://www.irsf.fr>.

Availability of data and materials

All supporting data are available.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The present study was approved by an independent ethics committee (CPP Ile de France-Ouest, Paris, France; reference: 01-132). Both patients gave their written informed consent to publication of their personal health data.

Consent for publication

All authors gave their consent for publication.

Competing interests

None.

Author details

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350 Jouy-en-Josas, France. ²École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700 Maisons-Alfort, France. ³Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier et Universitaire, F-59000 Lille, France. ⁴Service d'Anatomie Pathologique, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁵Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78300 Poissy, France. ⁶Service d'Anatomie Pathologique, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78100 Saint-Germain-en-Laye, France. ⁷UMR1179, UVSQ, F-78180 Montigny le Bretonneux, France.

Received: 21 April 2021 Accepted: 7 September 2021

Published online: 11 November 2021

References

1. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, Rossato M, Varotto A. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;43:537–43.
2. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int*. 1982;20:9–10.
3. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2007;13:539–49.
4. Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcelli F, Rigot J-M, et al. [Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann Pathol*. 2010;30:182–95.
5. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991;6:245–50.
6. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet*. 1992;89:491–6.
7. Cannarella R, Condorelli RA, Paolacci S, Barbagallo F, Guerri G, Bertelli M, et al. Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2020;23(1):24–9.
8. Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med*. 2020;22:1956–66.

9. Ben Khelifa M, Ghieh F, Boudjenah R, Hue C, Fauvert D, Dard R, et al. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. *Hum Reprod.* 2018;33:1034–7.
10. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med.* 2008;14:1197–213.
11. Punjani N, Kang C, Schlegel PN. Clinical implications of Y chromosome microdeletions among infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020 Dec;34(6):101471.
12. Vialard F, Bailly M, Bouazzi H, Albert M, Pont JC, Mendes V, et al. The high frequency of sperm aneuploidy in klinefelter patients and in nonobstructive azoospermia is due to meiotic errors in euploid spermatocytes. *J Androl.* 2012;33:1352–9.
13. Vialard F, Molina-Gomes D, Roume J, Podbiol A, Hirel C, Bailly M, et al. Case report: meiotic segregation in spermatozoa of a 46,X,t(Y;10)(q11.2;p15.2) fertile translocation carrier. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:549–54.
14. Wierenga KJ, Jiang Z, Yang AC, Mulvihill JJ, Tsinoremas NF. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Genet Med.* 2013;15:354–60.
15. Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, Mitchell AL, Prada CE, Grote L, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med.* 2013 Jan;15(1):70–8.
16. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34:i884–90.
17. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bio]. 2013 [cited 2021 Feb 26]; Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997> "Preprint manuscript (2013)”.
18. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43:491–8.
19. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164.
20. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med.* 2015;372:2097–107.
21. Sha Y, Zheng L, Ji Z, Mei L, Ding L, Lin S, et al. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Med Genet.* 2018;19:63.
22. Jiang YL, Rigolet M, Bourc'his D, Nigon F, Bokesoy I, Fryns JP, et al. DNMT3B mutations and DNA methylation defect define two types of ICF syndrome. *Hum Mutat.* 2005;25:56–63.
23. Xie Z-H, Huang Y-N, Chen Z-X, Riggs AD, Ding J-P, Gowher H, et al. Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum Mol Genet.* 2006;15(9):1375–85.
24. Aragam N, Wang K-S, Anderson JL, Liu X. TMPRSS9 and GRIN2B are associated with neuroticism: a genome-wide association study in a European sample. *J Mol Neurosci.* 2013;50:250–6.
25. Chen C-A, Pal R, Yin J, Tao H, Amawi A, Sabo A, et al. Combination of whole exome sequencing and animal modeling identifies TMPRSS9 as a candidate gene for autism spectrum disorder. *Hum Mol Genet.* 2020;29:459–70.
26. Bourrouillou G, Mansat A, Calvas P, Pontonnier F, Colombies P. [Chromosome anomalies and male infertility. A study of 1,444 subjects]. *Bull Assoc Anat (Nancy).* 1987;71:29–31.
27. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod.* 1996;11(Suppl 4):1–24 discussion 25–26.
28. Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carré-Pigeon F, Rumpfer Y. Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43:154–60.
29. Vialard F, Molina-Gomes D, Roume J, Podbiol A, Hirel C, Bailly M, et al. Case report: Meiotic segregation in spermatozoa of a 46,X,t(Y;10)(q11.2;p15.2) fertile translocation carrier. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:549–54.
30. Perrin A, Vialard F, Douet-Guilbert N, Gomes DM, Gutthausen B, De Braekeleer M, et al. Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:850–5.
31. Bache I, Assche EV, Cingoz S, Bugge M, Tümer Z, Hjorth M, et al. An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:993–1000.
32. Vialard F, Nouchy M, Malan V, Taillemite J-L, Selva J, Portnoi M-F. Whole-arm translocations between chromosome 1 and acrocentric G chromosomes are associated with a poor prognosis for spermatogenesis: two new cases and review of the literature. *Fertil Steril.* 2006;86:1001.e1-5.
33. Luciani JM, Guichaoua MR, Delafontaine D, North MO, Gabriel-Robez O, Rumpfer Y. Pachytene analysis in a 17;21 reciprocal translocation carrier: role of the acrocentric chromosomes in male sterility. *Hum Genet.* 1987;77:246–50.
34. Pavone P, Pappalardo XG, Incorpora G, Falsaperla R, Marino SD, Corsello G, et al. Long-term follow-up and novel genotype-phenotype analysis of monozygotic twins with ATP1A3 mutation in Alternating Hemiplegia of Childhood-2. *Eur J Med Genet.* 2020;63:103957.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Article 4

Cryptic splicing and meiosis arrest caused by a homozygous frameshift mutation in *RBMXL2*: a case report

Farah Ghieh, Vincent Izard, Marine Poulain, Joanne Fortemps, Valérie Serazin, Henri-Jean Garchon, A Louboutin, Béatrice Mandon-Pepin, Jean-Marc Ayoubi, Sophie Ferlicot, François Vialard

Article en cours de rédaction

Objectifs et principaux résultats de l'étude

À la suite des résultats encourageants obtenus dans les études précédentes (articles 1, 2, et 3), nous avons élargi notre stratégie d'investigation génétique en utilisant le séquençage d'exome et la SNP-CGH array dans une nouvelle série de patients ANO due à un AM. Ceci nous a permis d'identifier, chez un patient consanguin, un variant (NM_014469.4:c.301dup ; p.Ser101LysfsTer29) dans *RBMXL2* entraînant un décalage du cadre de lecture et un arrêt prématuré de la protéine.

Le phénotype clinique du patient récapitule celui observé chez les souris knock-out pour *Rbmxl2*. Une seule étude récente dans la littérature détaille la fonction de ce gène au cours de la spermatogenèse murine (Ehrmann *et al.*, 2019). Cette étude révèle que la perte de protéine RBMXL2 empêche complètement la production de spermatozoïdes chez la souris, en grande partie à cause d'un blocage de la méiose. La taille des testicules *Rbmxl2*^{-/-} était significativement réduite par rapport aux testicules WT. Les résultats de cette étude révèlent que la protéine RBMXL2 est nécessaire pour protéger le transcriptome méiotique d'une variété d'erreurs d'épissage (vu précédemment dans le chapitre II).

La fonction de *RBMXL2* dans le contrôle de l'épissage, au cours de la spermatogenèse humaine, a été donc étudiée dans nos analyses supplémentaires sur la biopsie testiculaire du patient. L'expression de plusieurs protéines a été réalisée, dont certaines essentielles à la spermatogenèse : DAZAP1, SYCE1, MLH1, STAG3, MEI1, ARL2 et MEIOC.

Dans un premier temps, l'expression de RBMXL2 a été étudiée dans les testicules du patient et d'un patient contrôle. Chez ce dernier, une forte expression nucléaire de RBMXL2 a été observée dans les spermatocytes et les spermatides, confirmant les résultats observés chez la souris. Aucune expression de la protéine n'a été observée dans les testicules du patient. De plus, nous avons observé une altération de l'expression de certains gènes analysés :

- Absence d'expression de protéines, ie : ARL2 et MEIOC, exprimées dans le noyau des spermatogonies chez le patient contrôle.
- Absence d'expression de MEI1, essentielle pour la formation des CDBs au cours des premières étapes de la recombinaison méiotique, normalement exprimées dans les spermatocytes et les spermatides rondes (cf témoin).
- Expression de la protéine SYCE1 codant pour l'élément central du complexe synaptonémal, mais absence d'expression de STAG3, essentielle pour la cohésion des chromatides (expression nucléaire dans les spermatogonies et spermatocytes chez le témoin).
- Diminution significative de l'expression de MLH1, par rapport au témoin, essentielle pour réparation des CDBs.
- Aucune modification du profil d'expression de DAZAP1 (une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le contrôle d'épissage au cours de la spermatogenèse).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent une altération de l'expression des protéines impliquées dans le processus de la spermatogenèse et surtout des gènes clés de la méiose comme *MLH1*, *STAG3*, *MEI1*, et *MEIOC*. L'altération de l'expression de la protéine MEIOC est similaire au résultat obtenu chez les souris *Rbmxl2*^{-/-}.

On peut donc suggérer que le variant c.301dup altère le spliceosome méiotique, entraînant une altération de l'expression de certaines protéines méiotiques clés. L'ensemble de ces résultats confirment la conservation de la fonction du gène *RBMXL2* dans le contrôle de l'épissage des gènes essentiels à la spermatogenèse humaine.

Cryptic splicing and meiosis arrest caused by a homozygous frameshift mutation in *RBMXL2*: a case report

Running Title: Meiotic arrest and RBMXL2 homozygous frameshift mutation

F Ghieh^{1,2}, V Iazard³, M Poulain^{1,2,4}, J Fortemps⁵, V Serazin^{1,2,6}, HJ Garchon⁷, A Louboutin⁴, B Mandon-Pepin¹, JM Ayoubi^{1,2,4}, S Ferlicot⁸, F Vialard^{1,2,5}

1: Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350, Jouy-en-Josas, France

2: École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700, Maisons-Alfort, France

3: Service d'Urologie, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, F-94270, Le Kremlin-Bicêtre, France

Service d'Urologie, Hôpital Foch, F-92150 Suresnes, France

4: Département de Gynécologie Obstétrique, Biologie de la Reproduction, Hôpital Foch, F-92150 Suresnes, France

5: Service d'Anatomie Pathologique, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78100, Saint-Germain-en-Laye, France

6: Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78300, Poissy, France

7: UMR1179, UVSQ, F-78180, Montigny le Bretonneux, France

8: Service d'Anatomie Pathologique, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, F-94270, Le Kremlin-Bicêtre, France

*Correspondence adress: francois.vialard@uvsq.fr

Abstract

Gene expression in testis is characterized by high levels of transcription and alternative splicing, which is predominantly mediated by meiotic cells. This is mainly controlled by RNA binding proteins (RBPs) highly expressed in germ cells, like the RBM (RNA binding motifs) gene family. Alterations in any of RBPs' functions can lead to defects during the meiotic process resulting in severe male infertility.

In this study, whole-exome sequencing revealed a novel candidate gene (*RBMXL2*) for human azoospermia due to meiosis arrest. Here we identified a frameshift mutation (NM_014469.4:c.301dup ; p.Ser101LysfsTer29) in *RBMXL2* gene, which is known to be crucial for safeguarding the meiotic transcriptome in mice testes. Absence of RBMXL2 protein in the patient' testis tissue affects the expression of several proteins (i.e. ARL2, MEIOC, MLH1, MEI1, STAG3), some of which are important for spermatogenesis. Our data imply that RBMXL2 gene's function during spermatogenesis is conserved in humans. We further believe that deleterious genetic variations in this gene can result in infertility and complete meiosis arrest due to poisoning of critical meiosis transcripts and gene expression disruption caused by aberrant (or "cryptic") splicing.

Keywords: infertility, meiosis arrest, RBMXL2, whole-exome sequencing, cryptic splicing, transcriptome.

Introduction

Alternative splicing expands the coding and regulatory capabilities of eukaryotic transcriptomes, which is one of the evolutionary drivers behind metazoans' greater structural complexity. Because of the variety of alternative splicing, exons can be joined in a variety of ways, resulting in numerous mRNA splice variants from a single gene each translated to a protein with a variable temporal and spatial expression patterns. The spliceosome, a ribonucleoprotein complex, is involved in the pre-mRNA splicing to mRNA, which is a key regulatory mechanism in eukaryotes. During the process of alternative splicing, several RNA-binding proteins (RBPs), promote or inhibit alternative exon splicing by detecting specific motifs in pre-mRNA.

Transcriptome analyses show that testis is one of the organs that most fully use alternative splicing's potential, resulting in the expression of the most splice variants (Naro *et al.*, 2021). It has also been shown by single cell analyses, that the primary source of transcriptome variation in the testis results from splice variant expression in meiotic and post-meiotic germ cells. Indeed, male germ cell differentiation is a complex process involving hundreds of proteins, and post-transcriptional gene expression regulation, primarily controlled by RBPs, is critical for these cells' development. In addition, the two waves of transcription inactivation at two stages of spermatogenesis: during homologous recombination in spermatocytes I, and during the late stages of spermatogenesis, where the chromosomes are strongly compacted by the substitution of histones by transition proteins and protamines, add an additional layer of complexity. Early spermatocytes and round transcriptionally active spermatids, store mRNAs in ribonucleoprotein particles (RNPs) to compensate for the lack of de novo mRNA synthesis during these stages of spermatogenesis. These RNPs keep mRNAs safe until they need to be translated.

RBPs proteins are abundantly expressed throughout the spermatogenesis process and are well known to be essential to posttranscriptional regulation during the mitotic,

meiotic and postmeiotic stages. Many mouse models lacking the genes encoding these RBPs are infertile (Venables and Cooke, 2000). The primary RBPs involved in mammalian spermatogenesis include the RBM (RNA Binding Motif) family. The *RBMX* (RNA Binding Motif Protein, X-linked) and *RBMX* (RNA Binding Motif Protein, X-linked) and *RBMX* (RNA Binding Motif Protein, X-linked) and *RBMX* (RNA Binding Motif Protein, X-linked) genes, which are found on both sexes' chromosomes, code for RNA binding proteins that regulate splicing (Elliott *et al.*, 2019). On the X and Y chromosomes, these genes diverged and developed separately. The ubiquitously expressed *RBMX* gene, is present on the X chromosome of all mammals. A similar gene called *RBMX* is located on the Y chromosome. Several *RBMX* gene copies (about 30) are found on the long arm of Y chromosome with 99% of identity, but only a few of them are active. In humans, we can find the following genes: *RBMX1A1*, *RBMX1B*, *RBMX1D*, *RBMX1E*, *RBMX1F* and *RBMX1J* (Elliott *et al.*, 2019). However, unlike *RBMX* gene, *RBMX* genes are only expressed in germ cells and their deletions on the Y chromosome have been linked to male infertility and meiotic arrest, which demonstrate a role of these genes in spermatogenesis (Vog *et al.*, 1996) (Elliott *et al.*, 2000).

Moreover, duplications of the *RBMX* gene, have created the intronless *RBMX*-like retrogens family (Elliott *et al.*, 2019). *RBMXL2* (RNA Binding Motif Protein, X-Linked Like 2, also known as HNRNPG-T) is a member of this family exclusively expressed in the testes during male meiosis and slightly after meiosis, i.e. when the *RBMX* and *RBMX* genes are transcriptionally inactivated within the XY-body structure (Wang, 2004); (Ehrmann *et al.*, 2019). The *RBMXL2*, *RBMX*, and *RBMX* proteins interact with Tra2b (Transformer 2 Beta Homolog), a pre-mRNA splicing activator that is highly expressed in the testes (Cléry *et al.*, 2011), suggesting a function in splicing control. The *RBMXL2* protein is critical in shielding the meiotic transcriptome from possible splicing errors, according to a study of *Rbmxl2* knockout mice (Ehrmann *et al.*, 2019). After the diplotene stage, *Rbmxl2*^{-/-} mice experience total arrest of meiosis and cellular death (Ehrmann *et al.*, 2019). However, some round spermatids can still be found in the seminiferous tubules of mutant mice. This severe infertility phenotype is caused by

abnormal splicing of important meiotic genes like *Meioc* (meiosis specific gene with coiled coil domain) (Abby *et al.*, 2016) (Soh *et al.*, 2017). This mouse model suggested that RBMXL2 protein can prevent the splicing of cryptic exons in normal mice by either (1) suppressing regulatory splicing proteins like the Tra2b protein via protein-protein interactions or (2) interacting directly with the regulatory splicing sequences in the pre-mRNA (Ehrmann *et al.*, 2019).

As a result, we can imagine that human male infertility could be caused by the loss or mutation of *RBMXL2* gene, just like for its paralog *RBMX* (Elliott, 2000). Today, male infertility is a worldwide health issue with men contributing in more than 50% of cases. Azoospermia is the most severe infertility phenotype with no sperm in the ejaculate. It can be due to an obstruction of genital tracts (obstructive azoospermia) or impairment of the spermatogenesis process (non-obstructive azoospermia (NOA)). Even though numerous causes of NOA have been identified, including some genetic factors (such as Y-chromosome microdeletion and chromosomal abnormalities), the majority of NOA cases are still idiopathic. Respectively, many NOA patients require donor sperm due to a low sperm retrieval after TESE (testicular sperm extraction). Sperm retrieval can vary in NOA patients according to their testicular histology and can be high (>60%) in case of hypospermatogenesis (reduction of germ cells number), or very low (<30%) in case of meiotic arrest and Sertoli cell only syndrome (SCOS, with absence of germ cells in the seminiferous tubules). However, TESE is negative in case of complete and homogeneous SCOS or meiotic arrest. For this reason, it's critical to investigate the pathogenesis of spermatogenic failure in NOA patients to improve their clinical care. Today, thanks to whole-exome sequencing, mutations in more than 25 genes have been linked to meiotic arrest and infertility in humans with few of them functionally validated and recurrently appearing in this context (Cioppi *et al.*, 2021).

In the present study, we identified for the first time a deleterious homozygous mutation in the *RBMXL2* gene associated with severe spermatogenic failure (meiosis arrest) after performing WES for a patient from a consanguineous family.

Case description

The proband (a healthy man) consulted in our clinic for infertility. The analysis of two consecutive semen samples revealed azoospermia. A physical examination showed a normal testis volume and hormonal values.

Genetic analysis showed a normal karyotype and absence of a Y chromosome microdeletions. After counselling, TESE was performed. Unfortunately, no spermatozoa were retrieved.

Histopathological analysis revealed no late spermatids and spermatozoa in the seminiferous tubules of the patient, whereas abundant spermatogonia and spermatocytes compared with the control were observed. Few round spermatids were detected, which recapitulates the testicular phenotype of *Rbmxl2*^{-/-} mice. The testicular histopathological results suggested a non-obstructive azoospermia (NOA) due to meiosis arrest (MA).

Following his agreement to participate in the genetic screening, the patient had received appropriate genetic counselling, and following approval by the local independent ethics committee, we collected a DNA sample.

We performed array CGH (SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 2x400K; catalogue number G5974A, Agilent Technologies), in order to (i) identify CNVs associated to the meiotic arrest, (ii) identify regions with loss of heterozygosity (LOH, also referred to as runs of homozygosity) and (iii) to rule out the presence of TEX11 exonic microdeletions (Yatsenko *et al.*, 2015). The SurePrint G3 array can simultaneously detect CNVs and identify LOH with high resolution. It combines around 300,000 60-mer probes distributed across the genome and around 100,000 SNP probes. The array CGH protocol has been validated by our laboratory (Ghieh *et al.*, 2021). Commercial human male genomic DNA (Agilent Technologies) was used as a control. For each test sample, approximately 100,000 SNP signal intensities were compared with the mean signals from the reference database. Following restriction enzyme digestion, Klenow-based enzyme digestion, labelling, washing, and drying, the

microarray slides were scanned at a resolution of 2 μm using a microarray scanner (Agilent Technologies). Features were extracted from the scanned images using Feature Extraction software (version 4.0, Agilent Technologies) and analysed using the software's Aberration Detection Method 2 algorithm.

Signals with five or more adjacent probes were interpreted as a CNV. Next, CNVs were classified based on their mean CGH log ratio: >1.2: homozygous duplication (amplification); 0.6 to 0.8: heterozygous duplications; -0.8 to -1.2: heterozygous deletion; <-2: homozygous deletions (nullosomy). The data were then filtered to select candidate CNVs. Recurrent CNVs, CNVs due to variations in the reference DNA, and benign CNVs (as listed in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)) were eliminated. Lastly, we used the UCSC genome browser (<https://www.genome.ucsc.edu/>) to determine which genes were affected by each CNV. After this analysis, we didn't identify any CNV in spermatogenesis genes that probably explain the phenotype of the patient.

However, loss of heterozygosity (LOH) was analysed using CytoGenomics software, which genotypes SNPs with an average distance of 7.2 kb between markers. The LOH can correspond to a region inherited from a common ancestor (i.e. a consanguineous family background) or a region in which both alleles come from the same parental chromosome (i.e. uniparental disomy). We followed the American College of Medical Genetics (ACMG)'s criteria for the selection of LOH regions and calculation of the inbreeding coefficient F (the homozygosity rate, defined as the fraction of the individual's genome that should be homozygous by descent) (McQuillan *et al.*, 2008) for each patient: $F = \text{total LOH} / \text{human genome size}$ (Wierenga *et al.*, 2013). The observed coefficients were compared with the theoretical coefficients for various degrees of inbreeding (Sund *et al.*, 2013). The inbreeding coefficient of the patient was at 7.06%. The identification of regions with LOH also enabled us to focus on regions of interest for the WES analysis.

In parallel, exome sequencing was carried out at the genomics facility at the University of Versailles Saint Quentin (Versailles, France), using Illumina technology and

HiSeq2500 and Nextseq sequencers. DNA libraries were built with a SureSelect Exome V6+UTR Capture Library Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions.

Sequence reads were trimmed to remove read-through adaptors and low-quality sequences (using fastp) (Chen *et al.*, 2018) and then aligned against the GRCh38/hg38 build of the human genome (using the bwa-mem algorithm) (Li, 2013). After the removal of PCR duplicates with Picard tools (<https://broadinstitute.github.io/picard/>), the bases were recalibrated using the GATK (v4) tool Baserecalibrator (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), as recommended by the Broad Institute Genome Team (DePristo *et al.*, 2011). Variants were then called with the GATK haplotype Caller (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), recalibrated with the GATK VariantRecalibrator tool (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), and annotated with ANNOVAR (<https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>) (Wang *et al.*, 2010).

In view of the known parental consanguinity, we assumed that a founder mutation had been transmitted in an autosomal-recessive manner. WES and bioinformatic analyses were performed to detect possible genetic variants causing the meiosis arrest in this NOA patient. We concentrated on homozygous and compound heterozygous mutations because of the consanguineous family history. We applied strict filters to select only: rare variants (with an allele frequency <1% in the general population according to GnomAD and 1000Genomes databases); variants affecting the encoded protein (insertions/deletions, missense, stop-loss, stop-gain, frameshift, splice acceptor/donor sites); and pathogenic variants on the encoded protein (according to SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), REVEL (Ioannidis *et al.*, 2016) and mutation taster (<https://www.mutationtaster.org>)). Then, we applied biological and literature filters to select variants affecting testis-enriched and/or spermatogenesis genes according to Gene-Tissue Expression (<https://gtexportal.org/home/>), Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), PubMed and Ensembl databases.

This strict pipeline led to the identification of a deleterious duplication (NM_014469.4:c.301dup ; p.Ser101LysfsTer29) in a gene called *RBMXL2*. The frameshift mutation resulted in a truncated protein, whose three-dimensional structure was predicted using PHYRE² software (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), as shown in Figure 1. The mutation deletes one alpha helix and the conserved RBM1CTR (C-terminal repeat in RBM1-like RNA-binding hnRNPs) domain (pfam08081) of *RBMXL2* protein (figure 1).

Next, we sought to determine whether the identified pathogenic variant altered the testicular spliceosome like in the mouse mutant (Ehrmann *et al.*, 2019). Unfortunately, we were unable to conduct molecular and transcriptomic analyses due to a lack of fresh testicular tissue from the patient. As a result, we only performed immunohistochemical analyses on paraffin-embedded testis tissue from the patient. Sample from patient was compared with a control sample from an individual with obstructive azoospermia and normal spermatogenesis. Immunohistochemistry was performed using the Benchmark XT Ventana Roche system with the XT ultraView DAB v3 revelation kit (Roche Life Science, Penzberg, Germany). To identify and locate the altered proteins in human testicular tissues, 4 µm sections of paraffin-embedded testis samples from a control subject and the patient were done with a microtome. The ribbons were deposited on slides (SuperFrost Plus type 25x75x1.0 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which were then dried at 56°C for 24 hours to ensure good adhesion of the tissue before staining. After the inhibition of endogenous peroxidases, sections of testicular tissue from the control and the patient were incubated with the primary antibodies (detailed in table S1) for 40 min. After several washing cycles, the antigen-antibody complex was visualized using a peroxidase/3,3'-diaminobenzidine detection system (rabbit/mouse). Slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated, and coverslipped for microscopy (magnification: x40). Each experiment included a negative control not exposed to the primary antibody.

First, the expression of RBMXL2 protein was studied in the testes of the patient comparing with a control man. In the seminiferous tubules of the healthy control, RBMXL2 was found to be highly expressed in the nucleus of spermatocytes and round spermatids (figure 2A). However, no expression of the protein was observed in the seminiferous tubules of the patient (figure 2B).

In addition, we observed an alteration in the expression of certain proteins in the testicular tissue of the patient (Figure 2):

- Lack of expression of ARL2 (figure 2D) and MEIOC (figure 2F) proteins, comparing with the nuclear expression in spermatogonia of the healthy control (figure 2C and 2E, respectively). The alteration in expression of the MEIOC protein is similar to the results obtained in *Rbmxl2*^{-/-} mice (Ehrmann *et al.*, 2019).
- Lack of expression of MEI1 (figure 2H), essential for double-strand breaks formation during the first stages of meiotic recombination. Normally, this protein is expressed in the nucleus of spermatocytes and round spermatids (figure 2G).
- Similar expression (in the nucleus of spermatocytes), between the patient (figure 2J) and the control (figure 2I), of the SYCE1 protein encoding for the central element of the synaptonemal complex. However, we observed for the patient a complete absence of expression of STAG3 protein (figure 2L), essential for chromatid cohesion (compared with the nuclear expression in spermatogonia and spermatocytes for the control (figure 2K)).
- Significant decrease of the expression of MLH1 protein, essential for double-strand breaks repair, in spermatogonia and spermatocytes of the patient (figure 2N) in comparison with the healthy control (figure 2M).

- No changes in the expression profile of DAZAP1 protein (an RNA binding protein involved in normal development and spermatogenesis in mice) between the patient and the control (figures 2O and 2P).

Overall, the results obtained show an alteration in the expression of proteins involved in the process of spermatogenesis and especially of key genes in meiosis such as MLH1, STAG3, MEI1, and MEIOC.

It can therefore be suggested that the c.301dup variant alters the testicular transcriptome, leading to altered expression of some key meiotic proteins. Taken together, these results suggest the conservation of the function of the *RBMXL2* gene in controlling the splicing of genes essential for human spermatogenesis.

Discussion

The precise causes of non-obstructive azoospermia are classified as idiopathic in more than 70% of male infertility cases. However, with the emergence of next-generation sequencing tools, dozens of candidate genes were identified to be linked to azoospermia. Among those genes, > 25 have been associated with the meiotic arrest phenotype (Cioppi *et al.*, 2021). Unfortunately, those findings didn't modify the clinical management of azoospermic patients with meiosis arrest who undergo surgical procedures (i.e., TESE) that turns out to be negative in the large majority of complete and homogeneous testicular phenotype. So, more functional studies are needed to identify the etiology of this specific testicular phenotype and how to avoid TESE procedures in case of complete meiosis arrest.

In this study, we performed whole-exome sequencing for a patient with high consanguinity background and displaying complete meiosis arrest. We successfully identified a deleterious duplication in the *RBMXL2* candidate gene that lead to a premature stop codon of the protein. This gene belongs to a family of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) that binds to nuclear RNAs during transcription

and regulates their splicing patterns (Ehrmann *et al.*, 2019)(Aldalaqan *et al.*, 2021). A previous study has showed that the absence of the testis-specific RNA binding protein *Rbmxl2* in mice causes germ cells apoptosis during the meiotic diplotene stage and absence of sperm production (Ehrmann *et al.*, 2019). In the same study, more detailed transcriptomic analyses show that in the absence of mouse *Rbmxl2*, the testicular spliceosome selects cryptic splice sites during male meiosis. As a result, important meiotic genes (*Meioc* and *Brca2*) that contain cryptic splice sites, normally repressed by RBMXL2, are affected when *Rbmxl2* is missing (Ehrmann *et al.*, 2019). This study suggests that alternative splicing might control fundamental aspects of germ cell biology and differentiation. Especially during the meiotic events, *Rbmxl2* is required to suppress cryptic splice site. Multiple studies has shown that spliceosome defects or cryptic splicing can lead to male infertility associated with non-obstructive azoospermia (Wu *et al.*, 2016) (Aldalaqan *et al.*, 2021).

The emergence of cryptic splice sites is well documented to have a considerable negative influence on gene expression (Marquez *et al.*, 2015) (Sibley *et al.*, 2016). It could take the form of new cryptic exons and polyadenylation sites disrupting protein coding sequences or the selection of cryptic splice sites that would shorten or extend exon lengths. This is consistent with the data that shows that RBM genes interact with splicing protein like Tra2b (Venables *et al.*, 2000) (Elliott *et al.*, 2000) (Nasim *et al.*, 2003) (Liu *et al.*, 2009). In our study, immunohistochemical examinations of our patient's testicular tissue in the absence of RBMXL2 protein yielded identical results. We found a complete lack of the proteins ARL2, MEIOC, STAG3, MEI1, and a considerable reduction in MLH1 protein expression. Overall, gene expression has been affected at all stages of spermatogenesis, starting from spermatogonia. According to Pubmed and the MGI database (<http://www.informatics.jax.org>), several of the genes affected by RBMXL2 protein deficiency in our study are annotated as critical for spermatogenesis and male infertility. The majority are particularly involved during meiosis (*MEIOC*) or in the meiotic recombination process (*STAG3*, *MEI1*, and *MLH1*). Yet, we found that the protein ARL2 was completely absent in patient's testis. The function of *ARL2* gene

during spermatogenesis is still unknown in the literature, while it is well recognised in female meiosis (Newman *et al.*, 2014) (Zhou *et al.*, 2021).

As a result, we believe that RBMXL2 protein is required for the expression of additional meiosis genes in the testis. However, further research is needed to confirm the link between RBMXL2 and meiotic genes splicing in humans, as immunohistochemistry alone isn't enough. Even though it is widely known that the lack of human fresh testicular cells limits such molecular and transcriptome investigations in humans.

We report here in our study a novel cause of non-obstructive azoospermia associated to meiotic arrest. Genetic alterations in *RBMXL2* were previously described in 2004 in the context of male infertility. A missense mutation (R100H) in an azoospermic patient and a deletion (G388del) in an oligoasthenozoospermic patient were discovered in infertile patients (Westerveld *et al.*, 2004). However, the two identified mutations are heterozygous and cannot explain alone this phenotype. Azoospermia is a rare type of infertility (1% in the general population). It is well recognized in the literature that homozygous mutations are more likely to cause a severe form of infertility, whereas heterozygous mutations may simply predispose to subfertility. Furthermore, as seen in our case, autosomal recessive diseases are easily detected in the context of consanguinity.

Based on our findings, we hypothesize that (i) RBMXL2 plays a critical role in regulating the testicular transcriptome not only in mice but also in humans; (ii) and that human male infertility caused by *RBMXL2* gene alterations may be linked to germ cell type-specific cryptic splicing.

References

- Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, Guerquin J, Gaillard J-C, Armengaud J, Langa F, *et al.* Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat Commun* 2016;**7**:10324.
- Aldalaqan S, Dalgliesh C, Luzzi S, Siachisumo C, Reynard LN, Ehrmann I, Elliott DJ. Cryptic splicing: common pathological mechanisms involved in male infertility and neuronal diseases. *Cell Cycle* 2021;**0**:1–9. Taylor & Francis.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 2018;**34**:i884–i890.
- Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of Azoospermia. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:3264.
- Cléry A, Jayne S, Benderska N, Dominguez C, Stamm S, Allain FH-T. Molecular basis of purine-rich RNA recognition by the human SR-like protein Tra2- β 1. *Nat Struct Mol Biol* 2011;**18**:443–450.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, Angel G del, Rivas MA, Hanna M, *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;**43**:491–498.
- Ehrmann I, Crichton JH, Gazzara MR, James K, Liu Y, Grellscheid SN, Curk T, Rooij D de, Steyn JS, Cockell S, *et al.* An ancient germ cell-specific RNA-binding protein protects the germline from cryptic splice site poisoning. In Blencowe BJ, Bronner ME, editors. *eLife* 2019;**8**:e39304. eLife Sciences Publications, Ltd.
- Elliott DJ. RBMY genes and AZFb deletions. *J Endocrinol Invest* 2000;**23**:652–658.
- Elliott DJ, Bourgeois CF, Klink A, Stévenin J, Cooke HJ. A mammalian germ cell-specific RNA-binding protein interacts with ubiquitously expressed proteins involved in splice site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:5717–5722.
- Elliott DJ, Dalgliesh C, Hysenaj G, Ehrmann I. RBMX family proteins connect the fields of nuclear RNA processing, disease and sex chromosome biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2019;**108**:1–6.

- Ghieh F, Barbotin A-L, Prasivoravong J, Ferlicot S, Mandon-Pepin B, Fortemps J, Garchon H-J, Serazin V, Leroy C, Marcelli F, *et al.* Azoospermia and reciprocal translocations: should whole-exome sequencing be recommended? *Basic and Clinical Andrology* 2021;**31**:27.
- Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:877–885.
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv:13033997 [q-bio]* [Internet] 2013;Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>.
- Liu Y, Bourgeois CF, Pang S, Kudla M, Dreumont N, Kister L, Sun Y-H, Stevenin J, Elliott DJ. The germ cell nuclear proteins hnRNP G-T and RBMY activate a testis-specific exon. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000707.
- Marquez Y, Höpfler M, Ayatollahi Z, Barta A, Kalyna M. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity. *Genome Res* 2015;**25**:995–1007.
- McQuillan R, Leutenegger A-L, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, Smolej-Narancic N, Janicijevic B, Polasek O, Tenesa A, *et al.* Runs of Homozygosity in European Populations. *Am J Hum Genet* 2008;**83**:359–372.
- Naro C, Cesari E, Sette C. Splicing regulation in brain and testis: common themes for highly specialized organs. *Cell Cycle* 2021;**20**:480–489.
- Nasim MT, Chernova TK, Chowdhury HM, Yue B-G, Eperon IC. HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:1337–1348.
- Newman LE, Zhou C, Mudigonda S, Mattheyses AL, Paradies E, Marobbio CMT, Kahn RA. The ARL2 GTPase Is Required for Mitochondrial Morphology, Motility, and Maintenance of ATP Levels. *PLOS ONE* 2014;**9**:e99270. Public Library of Science.
- Sibley CR, Blazquez L, Ule J. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet* 2016;**17**:407–421.

- Soh YQS, Mikedis MM, Kojima M, Godfrey AK, Rooij DG de, Page DC. Meioc maintains an extended meiotic prophase I in mice. *PLoS Genet* 2017;**13**:e1006704.
- Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, Mitchell AL, Prada CE, Grote L, Bao L, Martin LJ, Smolarek TA. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genetics in Medicine* 2013;**15**:70–78. Nature Publishing Group.
- Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ, Eperon IC. RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:685–694.
- Vog PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kieseewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, *et al.* Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996;**5**:933–943.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:e164.
- Wang PJ. X chromosomes, retrogenes and their role in male reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2004;**15**:79–83.
- Westerveld GH, Gianotten J, Leschot NJ, derVeen F van, Repping S, Lombardi MP. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-T (HNRNP G-T) mutations in men with impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction* 2004;**10**:265–269.
- Wierenga KJ, Jiang Z, Yang AC, Mulvihill JJ, Tsinoremas NF. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Genet Med* 2013;**15**:354–360.
- Wu H, Sun L, Wen Y, Liu Y, Yu J, Mao F, Wang Y, Tong C, Guo X, Hu Z, *et al.* Major spliceosome defects cause male infertility and are associated with nonobstructive azoospermia in humans. *PNAS* 2016;**113**:4134–4139. National Academy of Sciences.

Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, *et al.* X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *New England Journal of Medicine* 2015;**372**:2097–2107. Massachusetts Medical Society.

Zhou C-X, Wang Y, Shi L-Y, Wang Z-B, Ma Y, Li C-R, Zhang N-N, Zhang Y-X, Zhang F, Zhang D, *et al.* GTPases Arf5 and Arl2 function partially distinctly during oocyte meiosis. *J Cell Biochem* 2021;**122**:198–208.

Figures captions

Figure 1 : Three dimensional structure modelling of normal and mutated RBMXL2 protein (NP_055284.3) by PHYRE2 software (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Figure 2 : Immunohistochemistry analyses. Grey arrows indicates spermatogonia, Red arrows indicates spermatocytes, and Black arrows indicates round spermatids.

Supplemental data captions:

Table S1 : Primary antibodies used in the immunohistochemistry analyses and conditions of use.

Figure 1

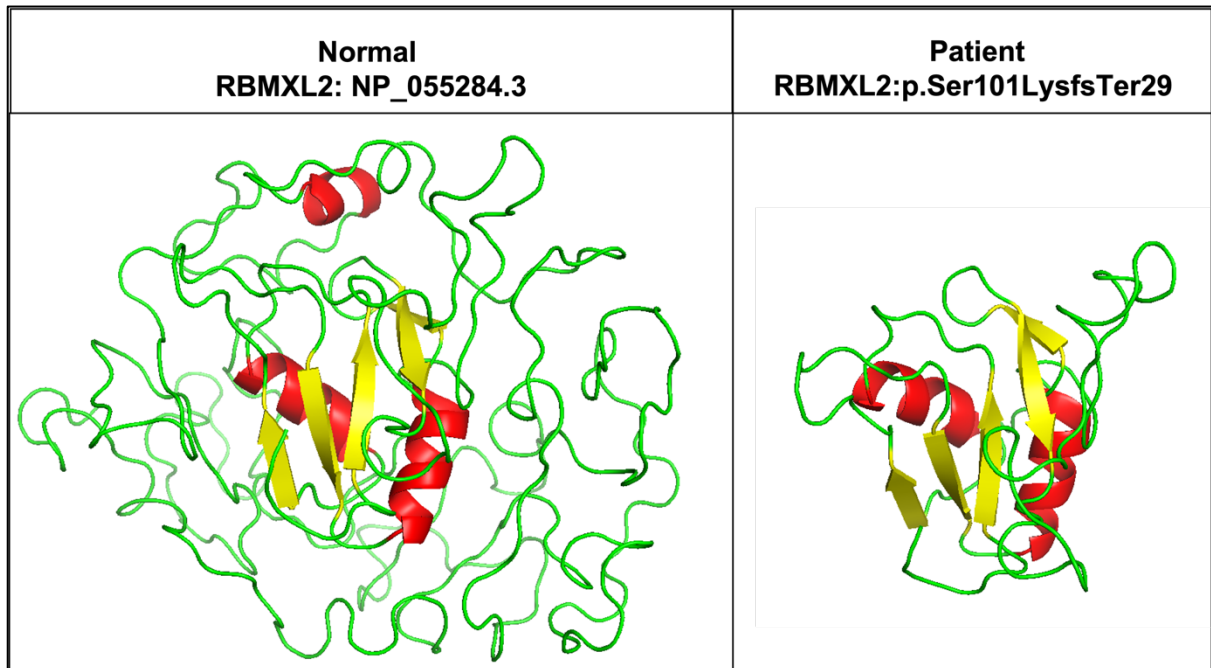


Figure 2

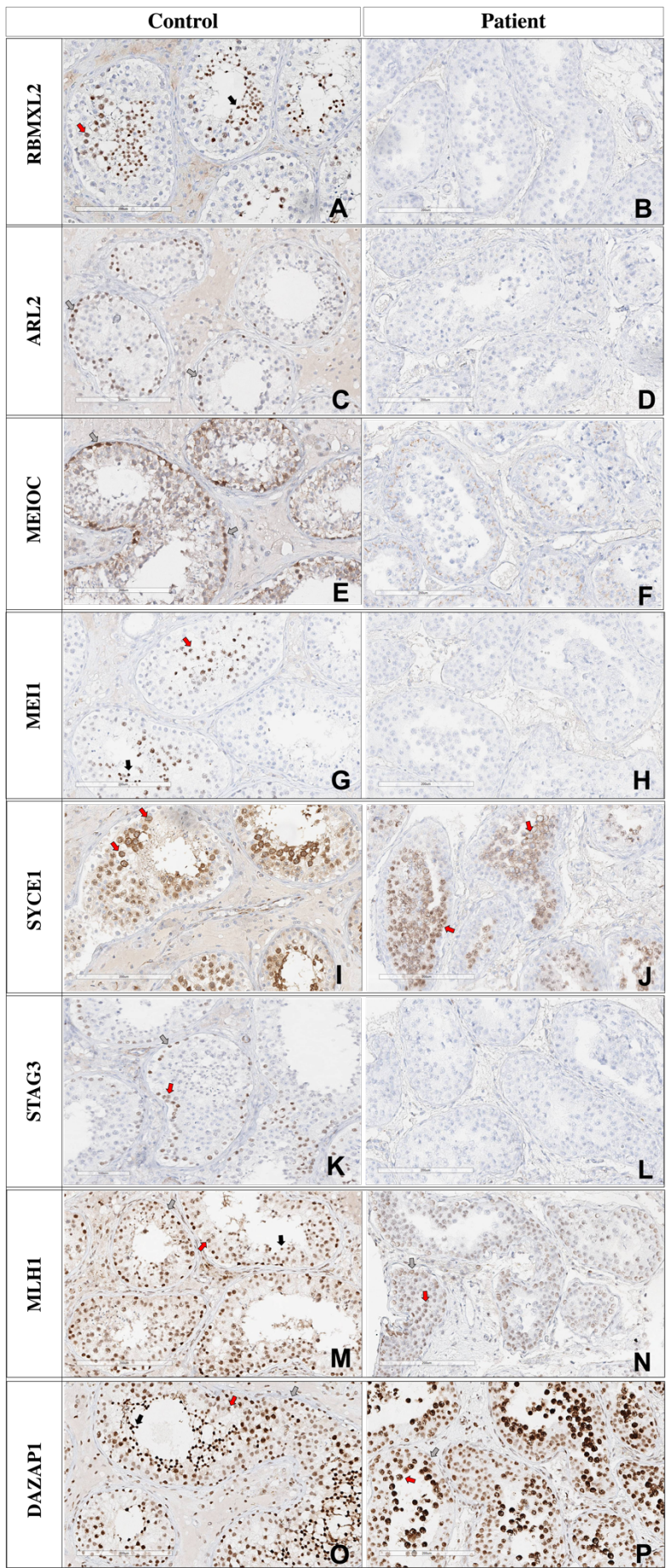


Table S1

Target	Species	Dilution	Reference	Supplier
MLH1	rabbit	1:50	MA5-32041	Invitrogen
SYCE1	rabbit	1:100	NBP1-88971	NovusBio
RBMXL2	rabbit	1:50	HPA038912	Sigma Aldrich
ARL2	rabbit	1:500	NBP1-91680	NovusBio
STAG3	rabbit	1/20	PA5-63556	Invitrogen
MEIOC	rabbit	1:200	HPA027266	Merck
MEI1	rabbit	1:10	HPA049240	Sigma Aldrich

Chapitre 2 : L'étude fonctionnelle d'une altération génétique humaine transposée dans un modèle murin

Article 5

Partial deletion within the meiosis-specific sporulation domain *Spo22* of *Tex11* is not associated to infertility in mice.

Farah Ghieh, Bruno Passet, Johan Castille, Elodie Poumerol, Pierre Calvel, Jean-Luc Vilotte, Eli Sellem, Eric Pailloux, François Vialard, Béatrice Mandon-Pépin

En cours de rédaction et sera soumis à *Plos One*

Objectifs et principaux résultats de l'étude

L'identification de nouveaux gènes/variants impliqués dans l'ANO due à l'AM demeure facile grâce aux nouvelles techniques de séquençage à haut débit (chapitre 1 des résultats). En revanche, la validation des variants candidats et des gènes associés aux phénotypes explorés représente actuellement un défi majeur. Comme nous l'avons montré dans le 2^{ème} article, pour certains patients, porteurs de variants délétères, il existe une spermatogenèse résiduelle permettant de retrouver des spermatozoïdes. L'altération de la spermatogenèse n'est donc pas complète. Pour confirmer le lien entre les causes génétiques découverts et le phénotype observé et caractériser la physiopathologie associée, les modèles animaux sont indispensables. La souris est le modèle le plus largement utilisé en recherche biomédicale, en particulier en biologie de la reproduction, en raison de sa remarquable affinité génétique avec l'homme.

En ANO, peu d'études ont confirmé le lien des variants identifiés chez les patients avec un modèle murin mimant la même altération génétique humaine. En 2015, Yatsenko et collaborateurs ont identifié, par SNP-CGH array, une délétion des exons 10-11-12 du gène *TEX11* chez 3 patients, 2 avec ANO et une avec atrophie testiculaire (Yatsenko *et al.*, 2015). Depuis, cette délétion est considérée comme la plus récurrente du gène *TEX11* mais aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour analyser son implication dans l'AM, alors qu'actuellement le gène *TEX11* est le premier gène à être analysé chez les patients atteints d'ANO due à l'AM.

Dans ce contexte, et grâce au système CRISPR/Cas9, nous avons réussi à générer des souris mâles et femelles mutantes qui portent la délétion exonique identifiée chez les deux sujets ANO. L'étude phénotypique des souris mâles mutantes *Tex11*^{Ex9-11del/Y} a permis de montrer qu'elles étaient fertiles et que leurs phénotypes spermatiques et testiculaires étaient similaires avec ceux observés chez les souris de type sauvage. Nous n'avons pas observé des différences significatives concernant : (1) la numération

spermatique par rapport au ratio du poids testiculaire/poids corporel, (2) la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes, (3) et l'histologie des tubes séminifères et d'épididyme entre les souris sauvages et les souris *Tex11^{Ex9-11del/Y}*. De plus, les deux génotypes avaient le même transcriptome et le même niveau d'expression du gène *Tex11*. Aucun gène essentiel à la spermatogenèse n'a été altéré chez les souris *Tex11^{Ex9-11del/Y}*. De plus, une expression normale de la protéine TEX11, par immunohistochimie, a été observée dans les spermatogonies et les spermatocytes primaires des tubes séminifères *Tex11^{Ex9-11del/Y}*.

Si la délétion exonique altère le domaine spécifique de la protéine SPO22, celle-ci n'affecte pas la reproduction ou la spermatogenèse murine. La délétion aboutit à la formation d'une protéine de taille plus réduite. Les analyses de conformation des protéines révèlent des divergences dans la structure 3D des protéines humaine et murine, ce qui suggère que ce gène possède un mode d'action différent entre les deux espèces. Une autre possibilité est que ce CNV soit bénin et qu'il ne soit pas à l'origine de l'arrêt de maturation.

Ces résultats mettent en évidence la nécessité de valider les variants candidats humaines *in vivo*.

Partial deletion within the meiosis-specific sporulation domain *Spo22* of *Tex11* is not associated to infertility in mice.

Farah Ghieh^{1,2}, Bruno Passet³, Johan Castille³, Elodie Poumerol¹, Pierre Calvel³, Jean-Luc Vilotte³, Eli Sellem⁴, Hendrick Mambu-Mambueni⁵, Henri-Jean Garchon⁵, Eric Pailhoux¹, François Vialard^{1,2,6}, Béatrice Mandon-Pépin^{1,2*}

1: Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350, Jouy-en-Josas, France

2: École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700, Maisons-Alfort, France

3: Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France

4: R&D Department, ALLICE, Paris, France

5: UMR1179, UVSQ, F-78180, Montigny le Bretonneux, France

6: Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy/Saint-Germain-en-Laye, F-78300, Poissy, France

* Correspondence:

Béatrice Mandon-Pépin

Beatrice.mandon-pepin@inrae.fr

Keywords: *Tex11*, maturation arrest, azoospermia, *Spo22*, functional validation, deletion, whole exome sequencing

Abstract

Azoospermia, characterized by the complete absence of spermatozoa in the semen, is a common cause of male infertility with an etiology that is poorly understood. Exome sequencing analysis of azoospermic men allowed the identification of prominent candidate genes of this severe form of male infertility, including the X-linked testis-expressed 11 (*TEX11*) gene.

Using CGH array, an exonic deletion (exons 10-12) of *TEX11* has been identified in two non-apparent azoospermic patients and described as a recurrent *TEX11* gene alteration. However, no functional validation of this genetic alteration was performed to investigate its impact on spermatogenesis and the occurrence of azoospermia phenotype. In this study, we therefore generated a mouse model carrying the *TEX11* deletion (*Tex11^{Ex9-11del/Y}*) by using a CRISPR/Cas9 system.

Surprisingly, hemizygous mutant male mice exhibited normal fertility and displayed normal sperm number, motility, and morphology. Further analysis of the mutant mouse line showed normal transcriptome between the two genotypes and no spermatogenesis genes were expressed differentially between *Tex11^{Ex9-11del/Y}* and WT mice. These results demonstrate that the exonic deletion doesn't affect spermatogenesis or fertility in mice and raise questions about its role in human azoospermia.

In summary, our study emphasizes the importance of functional confirmation of identified human variants that are supposed to cause spermatogenesis failure.

Introduction

Infertility is a major health problem that affects around 7% of men of reproductive age (Krausz et al, 2018). About 10% of infertile men are unable to conceive due to a complete absence of sperm in their ejaculate. This severe male infertility phenotype is defined by azoospermia and can result from primary testicular failure (non-obstructive azoospermia (NOA)), or obstruction of ejaculatory ducts (obstructive azoospermia: OA). Using assisted reproductive technologies (ARTs), patients can still be parents after testicular sperm extraction (TESE), when spermatozoa are found in testes. But, in case of complete germ cell maturation arrest or Sertoli cell-only syndrome (SCOS), no spermatozoa can be retrieved and an alternative solution, like sperm donation and adoption, should be considered.

A proportion of the azoospermic individuals can be explained by aberrations in the number and/or rearrangement of chromosomes (for review Cioppi *et al.*, 2021). However, the etiology and pathophysiology for the significant residual percentage of these infertile individuals, for whom single-gene variations could be the underlying causes, are still unknown. Recently, more than 40 genes have been linked to human non-obstructive azoospermia through genome-wide approaches (see for review Krausz et al, 2021; Houston et al, 2021). Among these genes, several have been recurrently reported, including *STAG3*, *SYCE1* and *TEX11* (Cioppi *et al.*, 2021; Houston *et al.*, 2021).

The X-linked gene *Tex11* (testis-expressed gene 11) is required for meiotic recombination and chromosomal synapsis in mice (Yang *et al.*, 2008; Adelman and Petrini, 2008). Alterations in *TEX11* have been first described using a high-resolution comparative genomic hybridization (CGH), reporting a loss of three exons of *TEX11* (exons 10-12; (c.652del237bp)) in two patients with azoospermia, with mixed testicular atrophy or meiotic arrest testis phenotype (Yatsenko *et al.*, 2015). This loss induces a 79 amino acids deletion within the SPO22 specific domain. In the same report, and after mutational screening, 5 other variants were also identified in the *TEX11* open

reading frame in a series of 289 azoospermic men (3 meiotic arrest, one mixed testicular atrophy and one partial meiotic arrest). Until this first series, mutations in the *TEX11* gene were regularly reported in the literature (Ji *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2015; An *et al.*, 2021; Nakamura *et al.*, 2017; Krausz *et al.*, 2020; Sha *et al.*, 2018). The discovery of *TEX11* mutations has piqued interest as a way to figure out what's causing azoospermia, especially due to maturation arrest, in men. *Tex11* knockout mice also resembled the patients' azoospermic phenotype (Yang *et al.*, 2008).

However, in most studies, reporting genes variant associated with sperm maturation arrest, rather than functional validation utilizing animal models with the same variant, in silico analysis or investigations of knockout mice were used to establish the pathogenicity. Thus far, only two transgenic mice mimicking human *TEX11* mutations have been reported (Wang *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2015). In addition, confirming identified human mutations is essential to (1) understand the mechanisms of azoospermia; and (2) create innovative therapies to correct these abnormalities. In this way and aiming to evaluate the causative role of the recurrent deletion of the three *TEX11* exons (c.652del237bp) in the observed azoospermia phenotype, and to study its pathogenesis, we have generated a mutant mouse line (*Tex11^{Ex9-11del/Y}*) carrying an equivalent deletion by using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) technology.

Results

***Tex11* targeting and deletion in the mouse**

To investigate the role of the exonic deletion of the *TEX11* candidate gene in the occurrence of human azoospermia (Yatsenko *et al.*, 2015), the three exons 9, 10 and 11 were deleted in mice by CRISPR/Cas9-mediated zygote (figure 1A). Using the primers presented in supplementary table S2, mutant offspring carrying the deletion were identified with genomic PCR (figure 1B). Notably, *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mutant mouse line

carried a total of 32673 bases deletion of the exons 9 to 11 of *Tex11* and its immediate upstream and downstream introns.

Tex11 intragenic deletions of exons 9 to 11 in mice were confirmed by means of quantitative PCR analysis (figure 1C and table S2).

Targeted exonic deletion of *Tex11* doesn't affect mouse fertility

Mating tests were performed, and continuous monitoring was conducted for 6 months to analyse the fertility of the mutant mice. Surprisingly, *Tex11*^{Ex9-11del/Y} males were fertile and produced litters (figure 2A). In addition, we found that the homozygous mutant female *Tex11*^{Ex9-11del/Ex9-11del} mice were fertile and exhibited litter sizes comparable to those of WT females (figure 2A). The average litter sizes revealed that all mutant males were able to sire normal numbers of pups when mated with heterozygous mutant females *Tex11*^{Ex9-11del/X} (9.15 ± 2.54 pups per litter), or with homozygous mutant females *Tex11*^{Ex9-11del/Ex9-11del} (9 ± 1.41 pups per litter). There was no statistically significant difference between the fecundity of mutant and wild-type males (9.8 ± 2.3) (figure 2A). These results suggest that the exonic deletion does not affect female or male reproduction.

Spermatogenesis and sperm parameters in mutant mice

To investigate the impact of *Tex11* deletion on the development of the testicles and spermatozoa, phenotypic analyses were carried out comparing same-aged WT and mutant male mice.

- No abnormal development or behavior was observed in any of the mutant generated in this study. No significant difference was observed between the wild-type and mutant *tex11* testes in their sizes, morphology, and weights (figure 2B, 2C).

- Histological examination was conducted to investigate potential pathological spermatogenic abnormalities derived from the deletion in the genome. As shown in figure 2D, sperm quantities in the lumen of the epididymis duct were not modified in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mice compared with WT mice. In addition, no abnormality was observed in terms of weight and histology of caudas epididymis between WT and *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mice (figure 2D, 2E). Furthermore, intact spermatogenic tubules and spermatogenic cells at all stages could be seen in the testes of *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mice compared to WT (figure 2F).

- The sperm parameters of 2 months-old *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mice testes were then compared to WT testes of the same age. Sperm concentration obtained from the cauda epididymis was similar between *Tex11^{Ex9-11del/Y}* and control mice with concentrations at 85.83 million/ml \pm 49.526, (n= 8) and 90.57 million/ml \pm 62.282 (n= 6), respectively (figure 3A), which is concordant with the unmodified testis/body weight ratio (figure 2C). Computer-assisted sperm analysis (CASA) also revealed that the motility of *Tex11^{Ex9-11del/Y}* spermatozoa was similar to that of WT spermatozoa with respectively rate at 20.36 \pm 8.27 (n= 8) and 17.27 \pm 7.92 (n= 6) (figure 3B). Other parameters such as the motile mean expressed as progressive spermatozoa, motile mean vap, beat cross frequency (bcf) or vsl were also similar (figure 3C, 3D, 3E, 3F). We further confirmed that the *Tex11* deletion did not affect the morphology of mature spermatozoa (figure 3G, 3H).

These results obtained with CASA thus showed that several sperm parameters such as sperm number, motility and morphology, weren't impacted by the exonic deletion in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mutant mice. Overall, the exonic *Tex11* deletion doesn't influence the spermatogenesis process.

Immunofluorescence analyses

The deletion resulted in the production of truncated TEX11 protein. We confirmed the expression of TEX11 in the testes of *Tex11^{del/Y}* mice by immunofluorescence assays

(figure 3I). Immunofluorescence analysis of testis sections indicated that in comparison to littermate controls, TEX11 protein appeared to be expressed normally in the *Tex11^{del/Y}* mutants. The results demonstrated TEX11 cytoplasmic/membranous expression in spermatogonia and spermatocytes in WT and *Tex11^{del/Y}* mice (figure 3I). Those results were concordant with the expression profile of TEX11 in prior studies (Yatsenko et al, 2015; Adelman et al, 2008). The exonic deletion did not affect then the expression of TEX11 in mutant mice.

Normal transcriptome in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* mouse testes

Tex11^{Ex9-11del/Y} testes exhibited a normal transcription pattern compared to WT testes. RNA sequencing analyses did not show any differences between the two genotypes, except for the presence of the exonic deletion in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* testes. We confirmed the presence of the TEX11 mRNA in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* testes lacking only the exons 9-10-11. We didn't identify any up-regulated or down-regulated genes in the absence of the three exons of interest.

Together, these results demonstrate that the exonic deletion doesn't affect the expression profile of spermatogenesis genes in the testes.

Discussion

High-throughput sequencing has improved diagnostic and research yields in the rare male infertility phenotypes, including non-obstructive azoospermia (NOA) which occurs in about 1% of men of reproductive age. It allowed the identification of new candidate genetic factors especially in patients from consanguineous families (for a recent review, see Houston *et al.*, 2021). The great majority of published studies prioritized identified variants according to the knock-out (KO) mouse model. Indeed,

the complete process of spermatogenesis and male infertility is complex and cannot be *in vitro* modeled, so as a result, animal models offer a viable alternative for testing. Because of their short reproductive cycle, big litter size, and relatively inexpensive housing conditions, mice are the most often used animal models in biomedical research, including reproductive biology. Most importantly, mice have genetic background and gametogenesis that is quite similar to that of humans.

Furthermore, their embryos are relatively easily manipulated. Many types of mouse models, including knockout/knockin, transgenic and chemically mutagenized mutant mice have become more popular for identifying and validating disease-associated genes and/or variants.

Tex11 was discovered to be the first X-encoded meiosis-specific factor in mice (Yang *et al.*, 2008). This gene encodes a 104-kDa protein with a tetratricopeptide (TPR) repeat pattern that mediates protein-protein interactions and is highly conserved in vertebrates. TEX11 promotes double strand breaks (DSBs) repair and forms foci on meiotic chromosomes along the synaptonemal complex in spermatocytes and oocytes during zygotene and early pachytene stages. It is therefore considered as a specific meiosis factor with transcripts found exclusively in the testes and abundant protein expression in the cytoplasm of type B spermatogonia and early spermatocytes (zygotene to pachytene). *Tex11*^{-/-} male mice are infertile due to meiotic arrest, chromosomal asynapsis at the pachytene stage and reduced crossover formation (Yang *et al.*, 2008). At the opposite, mutant mice males and females sharing an exon 3 deletion are fertile, but with delayed DSB repair in spermatocytes and reduced crossover formation (Adelman and Petrini, 2008).

Today, *TEX11* mutations are the first to search for in NOA men, as the most frequently altered gene reported (Yatsenko *et al.*, 2015, Sha *et al.*, 2018; Ji Z *et al.*, 2021, Yu *et al.*, 2021). Using 400K aCGH microarray, a 90-kb hemizygous loss on chromosome Xq13.2, that involved three exons (10-12), was first identify in two non-related patients with

azoospermia (Yatsenko *et al.*, 2015). This loss predicts a deletion of 79 amino acids within the meiosis-specific sporulation domain SPO22. To determine the role of the partial deletion of this domain, we produced a *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mutant mouse model. Unlike the human phenotype, we showed that this deletion doesn't impacted gametogenesis, *Tex11*^{Ex9-11del/Y} males and *Tex11*^{Ex9-11del/Ex9-11del} females were fertile. Furthermore, although some mutant mice model with normal fertility but decreased testicular size and sperm count have been reported (Zhang *et al.*, 2006; Schurmann *et al.*, 2002), *Tex11*^{Ex9-11del/Y} male exhibited normal testicular size, sperm count, motility, and morphology. Furthermore, transcriptome analysis between WT and *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mice were similar.

To explain such results, few hypotheses could be done:

(1) Remaining normal expression of the TEX11 protein in *Tex11*-mutant testes is sufficient for *Tex11* to be functionally normal. Afterall, TEX11 protein is always expressed in the mutant testes and the expression is comparable to that of control testes. So, we can suppose that the exonic deletion only alter the length of the protein without affecting its function.

(2) The sporulation specific protein 22 (Spo22) domain may not be required for TEX11 function in mice. The latter was thus named in reference to the Spo22 gene initially detected in yeast. This gene was recently named Zip4 by the Roeder laboratory (personal communication) and has an ortholog present in *Arabidopsis thaliana* plant (atZip4). There is a similarity of function between these proteins (Spo22 and atZip4) present in different organisms and the murine TEX11 protein. Thus, more in-depth research on the Spo22 and atZip4 mutants has been carried out. Zip4/Spo22 could contribute to the stability of chromosome pairing interactions beyond the pachytene stage, and could promote an environment in which a different, more stable connection could be formed. This connection could promote an appropriate disjunction of chromosomes. In addition, the Spo22 protein was identified as being part of the ZMM

group involved in the formation of crossing-over and the synaptonemal complex (Lynn *et al.*, 2007). The Zip4/Spo22 mutant in *S.cerevisiae* shows delayed meiotic progression, reduced spore viability and also decreased crossover formation due to a lack of synaptonemal complex formation (Tsubouchi *et al.*, 2006). Contrary to the phenotype observed in *S.cerevisiae*, the Zip4 mutants in *A.thaliana* have normal pairing of homologous chromosomes taking place before metaphase I but a reduction in the frequency of crossing over (Chelysheva *et al.*, 2007). So, this group of meiosis specific proteins, including Spo22 from budding yeasts, ZIP4 from plants and TEX11 from mammals play an important role in normal crossover formation and meiotic chromosome segregation. However, there is no data about the specific role of the SPO22 domain in mice. To our knowledge, this study is the first to analyze its role in mouse reproduction since the targeted deletion removes a large part of the SPO22 domain. As a result, we can assume that this domain isn't needed for mouse or mammal fertility, which is achieved by the TEX11 protein's normal function during meiosis.

(3) The exonic deletion isn't responsible of the human azoospermia phenotype. The deletion of exon 10 to 12 of *TEX11* has been identified for 2 azoospermic patients, one with a mixed testicular atrophy, and one with a maturation arrest (Yatsenko *et al.*, 2015). For both patients, no analyses have been done to confirm the absence of the complete TEX11 protein or its localization. Furthermore, patient's testicular phenotypes were different, with one of the carriers having a mixed phenotype which is associated to a partial spermatogenesis in few seminiferous tubules. The presence of mature germ cells in one of the deletion carriers could argue that this deletion may not lead to complete maturation arrest, and Spo22 domain not essential for gametogenesis. Then, this deletion should be reclassified as a VUS.

Among all identified TEX11 gene variants in the literature (supplementary table S4), and excluding the exonic deletion (Yatsenko *et al.*, 2015), few affected the SPO22 protein domain (table S4): c.1051G>T, c.1254dupA, c.857delA (Ji *et al.*, 2021); c.1246C>T (An *et al.*, 2021); c.84_651del (Krausz *et al.*, 2021); c.792+1G>A (Yatsenko *et*

al., 2015); c.731C>T, c.1258Ins (TT) (Yang *et al.*, 2015). Mice carrying the frameshift insertion (c.1258Ins (TT)) displayed meiotic arrest. In addition, transfected cells with the three mutations c.1051G>T, c.1254dupA and c.857delA showed only a reduced TEX11 protein expression using Western Blot, unlike the complete absence of TEX11 expression in the c.298delG (doesn't affect SPO22 domain) transfected cells (Ji *et al.*, 2021). The c.1246C>T in the SPO22 domain induce a premature stop codon, which may explain the infertility in the patient due to the complete absence of the expression of the protein (An *et al.*, 2021). According to our results and after the analysis of all identified *TEX11* mutations in the literature, we can therefore suggest that most genetic alterations in SPO22 domain can result in infertility only if the variant suppress the protein expression. More analyses are needed to functionally confirm if the mutations c.84-651del, c.792+1G>A and c.731C>T affect TEX11 protein expression.

(4) The difference between murine and human 3D protein conformation. Yatsenko *et al* have already estimated the effect of the identified exonic deletion on the human TEX11 tertiary structure (Yatsenko *et al.*, 2015). They found that the deletion of exons 10 to 12 removes nearly three alpha helixes in the SPO22 domain. We also modeled the human and murine TEX11 tertiary structures (figure 4) and estimated the potential effects of the exonic deletion on TEX11 conformation using the algorithm Phyre² and PyMOL. We even found that the exonic deletion suppresses approximately four alpha helixes in human TEX11 protein (figure 4A), and four and a half alpha helixes in murine TEX11 protein (figure 4B). In order to compare the two proteins conformations, we superimposed the two 3D structures on PyMOL (figure 4C) and we observed major differences between the two proteins. However, the core of the two structures present high similarities between the murine and human Tex11 proteins.

These results are in accordance with the alignment (figure 5) of the two proteins, using Multalin and Jalview softwares, where the percentage ID is only 51.09 % between the two full length TEX11 proteins. As a result of the differences in tertiary structures between mice and humans, we can postulate that protein interactions and mechanisms

of function of TEX11 protein during spermatogenesis may change between the two species.

We excluded the hypothesis of the incompatibility of mouse model for such strategy (discussed earlier). In addition, all available *Tex11* mouse models in the literature showed deleterious reproductive phenotypes (Yang *et al.*, 2008; Adelman and Petrini, 2008, Yang *et al.*, 2015), considering that exon 3 deletion delays DSB repair in spermatocytes and reduced crossover formation. Lastly, a *TEX11* frameshift variant identified in azoospermic patient (Yang *et al.*, 2015) has been validated on a mouse model (Wang *et al.*, 2021) which presented maturation arrest. Considering the large number of functional spermatogonial stem cells (SSCs) in the mice testes, a rectification, in SSCs, has been done, using the CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair (HDR), which successfully restored fertility into recipient mice.

In summary, we generated mutant mice carrying a human alteration in *TEX11* gene and demonstrated that these mice display normal fertility. Although the conserved *Tex11* gene is known to be essential to murine and human spermatogenesis, we could not identify any impact of the deletion on male or female reproduction. Our study highlights the importance of *in vivo* confirmation of identified human gene alterations to explain male infertility. If establishing a mouse model is not possible, a test on testicular tissue should be performed at the very least to confirm the absence of the altered protein.

Materials and Methods

Ethics statement

All experiments were approved by the INRAE Ethical Committee for Animal Experiments of the Jouy-en-Josas and authorized by the French Ministry for Higher Education, Research and Innovation.

Mice

Generation of the mutant *Tex11* transgenic mouse line, *Tex11^{Ex9-11del/Y}*, was achieved using CRISPR/Cas9 genome editing technology. To mimic, in mice, the deletion comprising exons 10 to 12 of isoform 1 (NM_001003811.1) of the *TEX11* gene identified in azoospermic patients with maturation arrest (Yatsenko et al., 2015), we first compared the human (NM_001003811.1) and murine (NM_031384) *TEX11* transcripts (supplemental table 1). Comparing human and murine isoforms 1, we found that exons 1 and 30 are divergent between the two species, and exon 3 is supernumerary in humans. However, the remainder of the murine and human *TEX11* gene shows strong sequence homology (supplemental table 1). Thus, the human deletion comprising exons 10, 11 and 12 of NM_001003811.1 was mimicked by the genomic deletion comprising murine exons 9, 10 and 11 of NM_031384 (supplemental figure 2 for sequence homology between human and murine exons of interest).

Using CRISPOR software (<http://crispor.tefor.net/crispor.cgi>), the design of the guide RNAs was carried out to completely remove the three exons (9, 10 and 11) and partially the 2 introns (introns 9 and 11) of the *Tex11* gene: 2 guides on each side of the desired deletion were designated to improve the cut efficiency (Han et al., 2014). Guide RNA sequences are shown in supplementary Table 2.

The RNA mix comprised an mRNA encoding for SpCas9-HF1 nuclease and the four sgRNA targeting exons 9 to 11 of the *Tex11* gene (NC_000086; NM_031384).

Cas9-encoding mRNA and the four sgRNAs were injected at a rate of 100 ng/μl each into one cell fertilized FVBN mouse eggs (Henaó-Mejia et al, 2016). The surviving injected eggs were transferred into two pseudo-pregnant recipient B6CBA/F1 mice (23 injected eggs/mouse). Two transgenic founder female mice were then crossed with wild-type FVBN male mice to establish transgenic lines. F1 heterozygous mice were crossed together in each line to obtain F2 hemizygous male or homozygous female mice, thus establishing the *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mouse lines.

All mice were housed at a temperature of 25°C under a 12h/12h light/dark cycle at the UE0907 unit (INRAE, Jouy-en-Josas, France), with *ad libitum* access to food. The animals were placed in an enriched environment to improve their receptiveness while respecting the 3R.

Mice genotyping

Genomic DNA was obtained from tail biopsy specimens of the resulting live pups and mice were genotyped by PCR amplification of *Tex11* exons 9,10 and 11 (see supplementary table 2) for genotyping oligonucleotides sequences and figure 1 for the location of *Tex11* three exons). Two sets of primers were used to genotype mice (supplementary table 2): one that amplified 622 bp to check the WT allele (primers Tex11_64241F and Tex11_64843R; supplementary table 2) and one that only amplified 600 bp if the exonic deletion is present (primers Tex11_50129F and Tex11_83418R; supplementary table 2).

PCR was performed with the Takara Ex Taq® DNA Polymerase kit, according to the manufacturer's instructions. The PCR conditions were 94°C 30s, 60°C 30s and 72°C 30s, with 35 amplification cycles.

Evaluation of mice fertility

Upon sexual maturation, F2 hemizygous mutant male mice were caged individually with two or three six-week-old wild-type FVBN female mice for a period of six months. Breeding cages were monitored daily and gestations, birth dates and litter sizes were recorded. During the fertility tests, the number of pups was counted at birth to assess the average litter size for each mouse line.

Testicular and sperm analyses for mutant male mice

After the fertility test, adult mutant male mice, and same-aged wild-type FVBN mice were euthanized by cervical dislocation to examine their testis weights, testicular histology, and sperm parameters. Testis tissues were dissected, measured for their weight and: fixed for histological analysis as indicated below, or flash frozen immediately in liquid nitrogen before storage at -80°C . The frozen tissues were used for the transcriptomic and molecular analyses described below. Cauda epididymis were also removed from mutant and wild-type mice and measured for their weight.

The evaluation of male fertility was completed using the CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis, at Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA, USA) to assess semen parameters in mutant $\text{Tex11}^{\text{Ex9-11del/Y}}$ and WT mice. Cauda epididymis from each mouse were removed and plunged in 100 μl TCF buffer (Tris, citrate, and fructose buffer) and fragmented with scissors to release spermatozoa. The samples were then incubated for 10 minutes at 37°C to collect spermatozoa. 4 μl aliquot was placed in a standardized four-chamber Leja counting slide (Leja products B.V. Nieuw-Vennep, the Netherlands). Ten microscope fields were analyzed on an automated stage, using the predetermined starting position within each chamber. Statistical analyses were performed on the ten analyzed fields containing at least 300 cells. Statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis test to compare sperm parameters of $\text{Tex11}^{\text{Ex9-11del/Y}}$ and WT male mice.

Histological analyses

For histological studies, fresh testicular and epididymal tissues from 8-week-old mice were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences reference 50-980-495) in phosphate buffer saline (PBS) at 4°C. After rinsing the tissue in PBS, they were stored in 70% ethanol at 4°C. Paraffin inclusions were then performed using a Citadel automat (Thermo Scientific Shandon Citadel 1000) according to a standard protocol. Tissues included in paraffin blocks were sectioned at 4 µm and organized on Superfrost Plus Slides (reference J1800AMNZ). Once dry, the slides were stored at 4°C. For histology, testes sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) by the @Bridge Platform (INRAE, Jouy-en-Josas) using an automatic Varistain Slide Stainer (Thermo Fisher Scientific). Periodic acid-Schiff staining (PAS) was used to determine seminiferous epithelium stages in testes.

Immunofluorescence analyses

Slides of sectioned tissues were deparaffinized for 10 minutes at 60°C and rehydrated in successive baths of xylene and ethanol at room temperature. The mouse on mouse (M.O.M) kit (BMK-2202, Vector laboratories) was used for immunofluorescence experiments. Slides were incubated for 1 hour in Blocking reagent, 5 minutes in working solution, and overnight with the primary antibodies at 4°C, diluted in working solution. The slides were then washed with PBS and incubated with secondary antibodies for 2h at room temperature. Diluted DAPI (1:1000 in PBS) was then applied to the slides for eight minutes. Primary and secondary antibodies are listed in supplementary table 3. The slides were then rinsed again with PBS and mounted with Vectashield Hard Set Mounting Medium for fluorescence. Images were taken using an inverted ZEISS AxioObserver Z1 microscope equipped with an ApoTome slider, a Colibri light source and AxioCam MRm camera. Images were analyzed using Axiovision software 4.8.2 (Carl Zeiss, Germany).

Total RNA extraction

Total RNA was extracted from testicular tissues of 2 months-old *Tex11^{del/Y}* (n=9) and wild-type mice (n=3) mice with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and using the TRIzol reagent (Invitrogen, 15596-026) according to the manufacturer's instructions. The testis tissues are crushed using a plunger in 600 µl of Trizol until complete homogenization and left to incubate for 5 minutes at room temperature. After the addition of 120 µl of chloroform, mixture, and centrifugation (15 minutes at 12000 g at 4°C), the aqueous phase containing the nucleic acids is collected and transferred to a new tube in which is added the same volume of 70% ethanol. The tubes are mixed, and each sample is loaded onto a RNeasy extraction column, and then centrifuged for 15 seconds at 8000 g. The liquid filtered by the column is removed; the nucleic acids remain fixed on the porous membrane of the extraction column. The total RNAs are then DNased to remove the DNA. For each sample, 350µl of RW1 rinse buffer (provided in the kit) is loaded onto the column. After centrifugation (15 s at 8000 g) and removal of the filtered liquid, 80 µl of DNase I solution (provided in the kit (Qiagen RNase Free DNase Set, 79254)) are deposited on the filter of the column. After 15 minutes of incubation at room temperature, the columns are rinsed with 350 µl of RW1 buffer (centrifugation for 15 s at 8000g) and the filtered liquid is removed. Two washing steps with 500 µl of RPE buffer (centrifugation for 15 s at 8000g) are then necessary before proceeding to the elution of the RNAs. Each column is then transferred to a new 1.5 ml tube and 31 µl of RNase free water are deposited on the column. After 1 minute of incubation and 1 minute of centrifugation at 8000 g, the eluate containing the total RNAs is recovered. The quality of extracted RNAs was verified on a 2100 BioAnalyzer (Matriks, Norway).

Expression analysis by RT-qPCR

Reverse transcription is carried out using the “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR” kit (Thermo Scientific). For each sample, 2 µl of RNA is used and for a final volume of 20 µl are added 4 µl of 5X Reaction Mix, 2 µl of Maxima Enzyme Mix, and sterilized water. The samples are then incubated for 10 minutes at 25 ° C, then 30 minutes at 50 ° C and finally 5 minutes at 85 ° C.

The step One system with Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher France) was used for qPCR, which was performed in duplicate for all tested genes. GAPDH was used as the reference gene. The primer sequences used for these experiments are listed in Supplementary Table 2. The PCR products were analyzed using GAPDH as the reference gene.

RNA sequencing

Samples with a RIN>8 were suitable for RNA-sequencing. This work benefited from the facilities and expertise of the UVSQ High-throughput Sequencing « GenΩmics » Platform (<https://www.sante.uvsq.fr/plateforme-de-genomique-genomics>) for stranded library preparation (New England Biolabs Preparation Kit, NEB #E7760, #E7765) and sequencing (Paired-end 2x75 cycles; NextSeq 500 Illumina). Twenty-five to 40 millions fragment per sample were generated. Demultiplexing was done (bcl2fastq2-2.18.12) and adapters were removed (Cutadapt1.15) at the UVSQ High-throughput Sequencing Platform. Only reads longer than 10 pb were used for analysis. Quality control of raw RNA-Seq data were processed by FastQC v0.11.5.

Transcriptomic analysis

Sequence libraries were aligned with the Ensembl 99 genome using TopHat (Trapnell et al., 2009), and gene table counts were obtained by applying featureCounts to these alignments (Liao et al., 2014). Data normalization and single-gene level analyses of differential expression were performed using DESeq2 (Love et al., 2014). Differences were considered to be significant for Benjamini-Hochberg adjusted p-values <0.05,

and absolute fold changes >2 (absolute $\text{Log}_2\text{FC} > 1$) (Benjamini and Hochberg, 1995). Raw RNA-seq data were deposited via the SRA Submission portal (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>), BioProject ID xxxxxxxx.

Statistics

Statistical analyses were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Error bars shown as standard deviation (s.d).

Modeling TEX11 structure

Structural TEX11 models were generated with the Phyre2 algorithm (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley LA et al, 2015). To visualize the three-dimensional (3D) structure of TEX11, we used of the PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger).

Acknowledgments

We thank Jan-Luc Vilotte for allowing the generation of the mouse model in his laboratory and all members of GABI unit.

We would like to thank the Genomics platform (UVSQ) for RNA-sequencing and bioinformatics analyses.

References

- Adelman CA, Petrini JHJ. ZIP4H (TEX11) Deficiency in the Mouse Impairs Meiotic Double Strand Break Repair and the Regulation of Crossing Over. *PLOS Genetics* 2008;**4**:e1000042. Public Library of Science.
- An M, Liu Y, Zhang M, Hu K, Jin Y, Xu S, Wang H, Lu M. Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2021;**38**:1997–2005.
- Chelysheva L, Gendrot G, Vezon D, Doutriaux M-P, Mercier R, Grelon M. Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 2007;**3**:e83. Public Library of Science.
- Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of Azoospermia. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:3264.
- Houston BJ, Conrad DF, O'Bryan MK. A framework for high-resolution phenotyping of candidate male infertility mutants: from human to mouse. *Hum Genet* 2021;**140**:155–182.
- Ji Z, Yao C, Yang C, Huang C, Zhao L, Han X, Zhu Z, Zhi E, Liu N, Zhou Z, *et al*. Novel Hemizygous Mutations of TEX11 Cause Meiotic Arrest and Non-obstructive Azoospermia in Chinese Han Population. *Front Genet* 2021;**12**:741355.
- Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, Pybus M, Friedrich C, Wyrwoll MJ, Casamonti E, *et al*. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med* 2020;**22**:1956–1966.
- Lynn A, Soucek R, Börner GV. ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work. *Chromosome Res* 2007;**15**:591–605.

- Nakamura S, Miyado M, Saito K, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Okada H, *et al.* Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology* 2017;**5**:824–831.
- Schürmann A, Kolling S, Jacobs S, Saftig P, Krauss S, Wennemuth G, Kluge R, Joost H-G. Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:2761–2768.
- Sha Y, Zheng L, Ji Z, Mei L, Ding L, Lin S, Wang X, Yang X, Li P. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Med Genet* 2018;**19**:63.
- Tsubouchi T, Zhao H, Roeder GS. The meiosis-specific zip4 protein regulates crossover distribution by promoting synaptonemal complex formation together with zip2. *Dev Cell* 2006;**10**:809–819.
- Wang Y-H, Yan M, Zhang X, Liu X-Y, Ding Y-F, Lai C-P, Tong M-H, Li J-S. Rescue of male infertility through correcting a genetic mutation causing meiotic arrest in spermatogonial stem cells. *Asian J Androl* 2021;
- Yang F, Gell K, Heijden GW van der, Eckardt S, Leu NA, Page DC, Benavente R, Her C, Höög C, McLaughlin KJ, *et al.* Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev* 2008;**22**:682–691.
- Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, Brown LG, Rozen S, Page DC, Wang PJ. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:1198–1210.
- Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, *et al.* X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med* 2015;**372**:2097–2107.
- Yu X-C, Li M-J, Cai F-F, Yang S-J, Liu H-B, Zhang H-B. A new TEX11 mutation causes azoospermia and testicular meiotic arrest. *Asian J Androl* 2021;**23**:510–515.

Zhang C, Yeh S, Chen Y-T, Wu C-C, Chuang K-H, Lin H-Y, Wang R-S, Chang Y-J, Mendis-Handagama C, Hu L, *et al.* Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:17718–17723.

Figures captions

Figure 1: Generation of *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mutant mice. (A) Schematic design of CRISPR/Cas9 deletion of the *Tex11* gene with the suppression of complete three exons and partial two introns. Grey boxes represent exons, red boxes represent targeted exons for the deletion, and lines represent introns.

(B) PCR genotyping of DNA of *Tex11* mutant mice. Hm= hemizygous mutant male mice or homozygous mutant female mice, Htz= heterozygous mutant female or male mice. (C) qPCR results of *Tex11* (exons 9-10-11) mRNA expression in WT and *Tex11* mutant testes. GAPDH was serving as internal control. Mutant mice showed no amplification of *Tex11* exons 9 to 11 products (below threshold). Normal mice displayed a Ct of $23,944 \pm 0,226$ (above threshold).

Figure 2: Analysis of spermatogenesis and basic factors related to male fertility.

(A) Average litter size of pups produced by WT or *Tex11*^{Ex9-11del/Y} male mice mated with WT, heterozygous or homozygous mutant female mice. (B) Testes of *Tex11*^{Ex9-11del/Y} and WT mice. (C) Testis/Body weight ratio of two months-old WT and mutant male mice. (D) Hematoxylin and Eosin (HE) staining of epididymis sections from 8-weeks-old WT and *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mice.

(E) Caudas epididymis weight of WT and *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mice. N = 8 males for *Tex11*-mutant mice and n = 6 for WT mice. There are no significant differences: [P = 0.57207 (litter size), 0.55289 (testis/body weight ratio), and 0.64439 (caudas epididymis weight)].

(F) Periodic acid-Schiff-stained sections show the histological structure of the testes from WT and *Tex11*^{Ex9-11del/Y} mice. Each image shows a stage of the seminiferous epithelial cycle, which is denoted by Roman numerals at the top of the image. Development of normal spermatocytes, round and elongated speratids can be seen in both control and mutant mice.

Scale bars: 50 μ m and 20 μ m.

Figure 3: Evaluation of sperm parameters. (A) Spermatozoa concentration ($10^6/\text{mL}$), (B) Percentage of sperm motility or (C) progressive spermatozoa (%) analyzed with computer-assisted sperm analysis system. VAP (D) , BCF (E), and VSL (F) indicates average path velocity, beat cross frequency and straight line velocity,, respectively. (G) and (H) represent spermatozoa morphological anomalies (% of coiled tail (G) and % of DMR (for distal midpiece reflex, abnormality of the sperm tail) (H)) analyzed in *Tex11^{Ex9-11del/Y}* and WT mice.

(I) TEX11 protein levels (in red) in the testes of *Tex11^{Ex9-11del/Y}* and WT mice were evaluated by immunofluorescence analysis. DAPI (blue) staining indicates the nucleus. Immunofluorescence with VASA antibody was achieved to identify male germ cells (green). Scale bars = 50 μm and 20 μm .

N = 8 males for *Tex11*-mutant mice and n = 6 for WT mice. There are no significant differences: [P = 0.69263 (sperm concentration), 0.90291 (sperm motility %), 0.47179 (progressive spermatozoa %), 0.65919 (VAP), 0.79847 (BCF), 0.40336 (VSL), 0.22742 (spermatozoa with coiled tail %), and 0.74521 (DMR %)].

Figure 4: Tertiary TEX11 protein structure prediction. (A) diagram of human TEX11 (blue) tertiary structure (NP_001003811.1). (B) diagram of murine *Tex11* (red) tertiary structure (NP_113561.2). The deleted segment is shown in yellow. (C) human (blue) and murine (red) TEX11 structures superimposed to compare them and search for similarities between the structures; the segment of SPO22 that is deleted is shown in yellow for human deletion and in orange for mutant mice deletion.

Diagrams of the tertiary structure models were modeled using Phyre² software (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015).

Figure 5: Sequence alignment of TEX11 proteins in human and mouse.

Comparison between human (NP_001003811.1) and mice (NP_113561.2) protein sequences using MulAlin tool (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Red indicates

a match between the two species; blue and black indicate differences between the two species.

Supporting information captions

Table S1 : Comparison of murine (NM_031384) and human (NM_001003811.1) TEX11 exons.

Figure S1: Alignment of human NM_001003811.2 and murine first Tex11 NM_031384 isoform. Percentage ID = 62.46 according to Jalview.

Figure S2: Alignment of human and murine deleted exons. (A) Alignment of human exon 10 (NM_001003811.2) and mouse exon 9 (NM_031384). Percentage ID= 71.28%. (B) Alignment of human exon 11 (NM_001003811.2) and mouse exon 10 (NM_031384). Percentage ID= 83.64%. (C) Alignment of human exon 12 (NM_001003811.2) and mouse exon 11 (NM_031384). Percentage ID= 71.84%.

Figure S3: Localisation of sgRNAs and genotyping primers in *TEX11* NM_001003811.1.

Table S2: List of primers used during this study (genotyping, RT-qPCR and gRNAs).

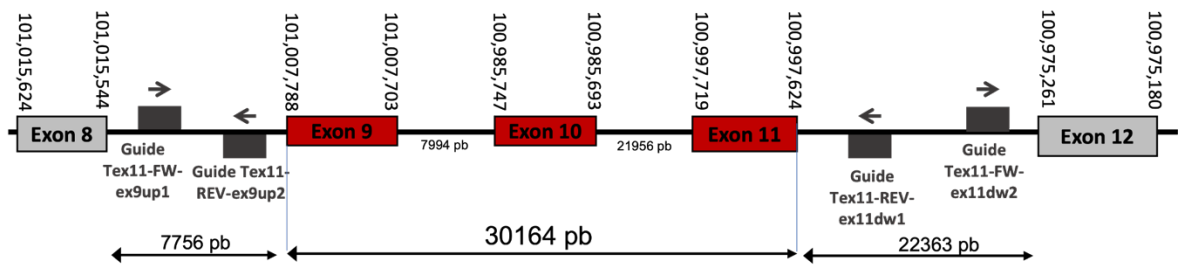
Table S3: List of antibodies and their condition of use.

Table S4: TEX11 mutations identified in the literature in non-obstructive azoospermia.

Figure 1

musChrX
NC_000086.7

+/- **A**



B

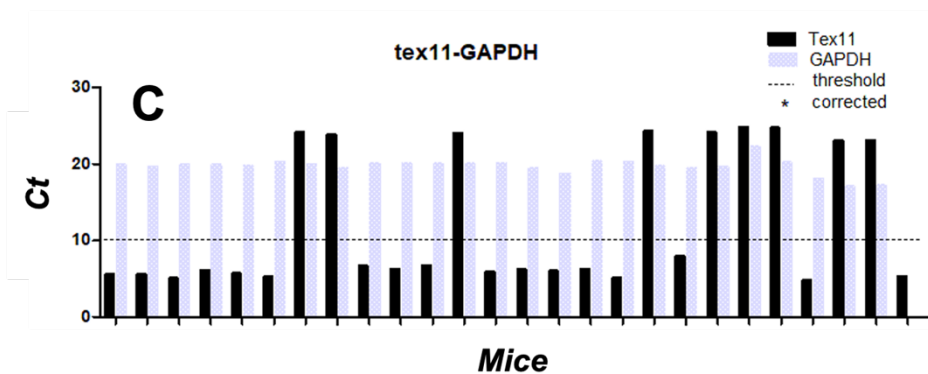
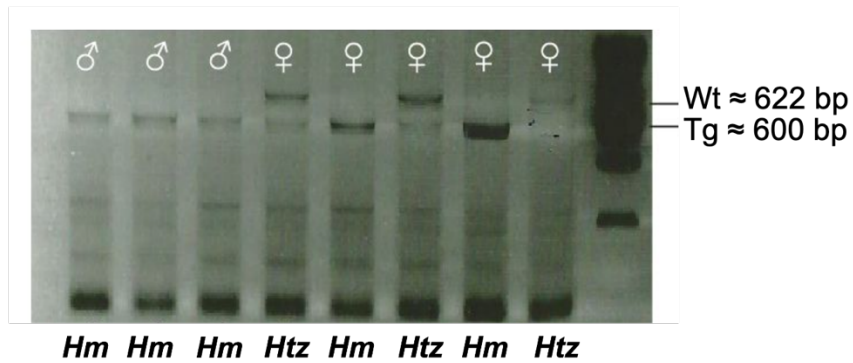
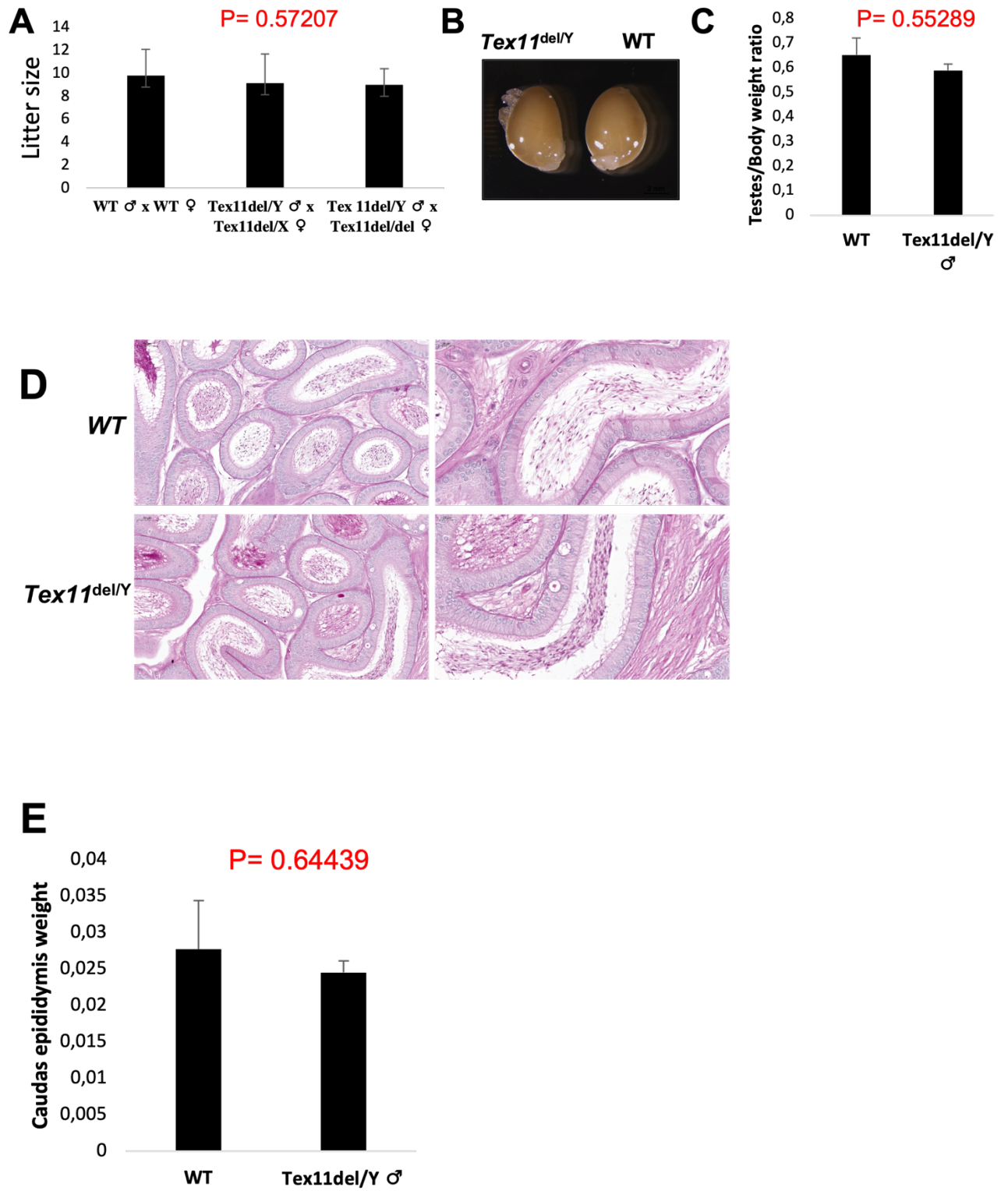


Figure 2



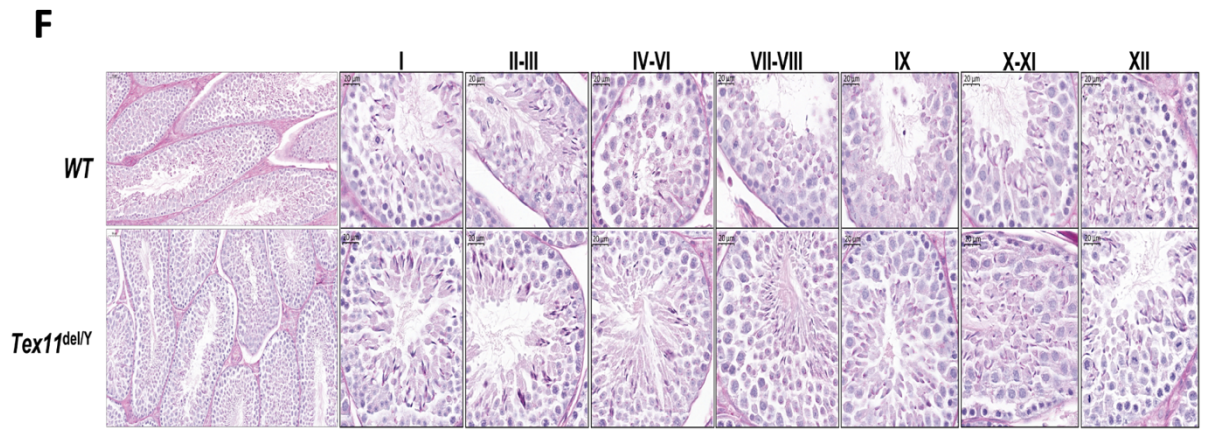
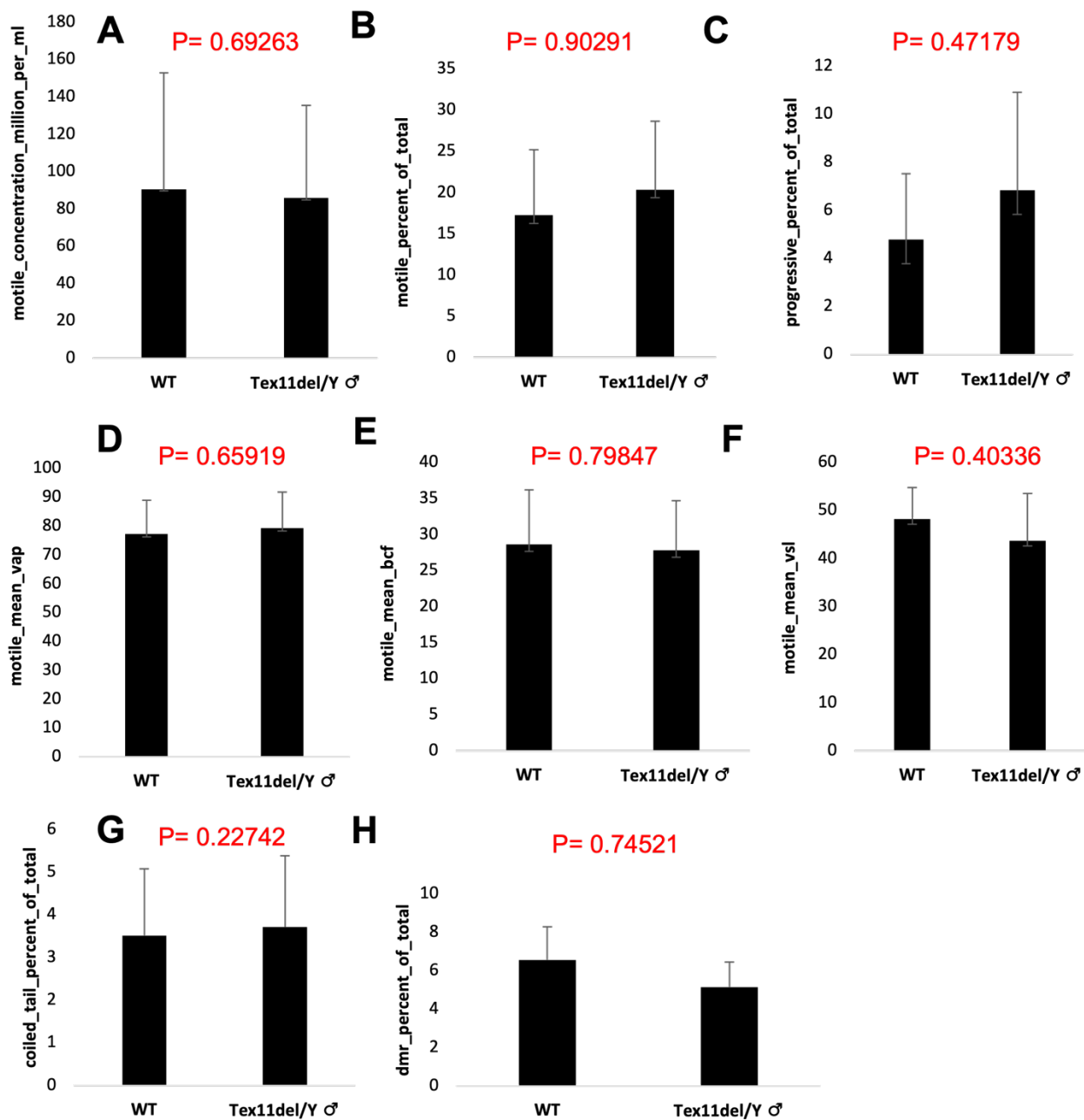


Figure 3



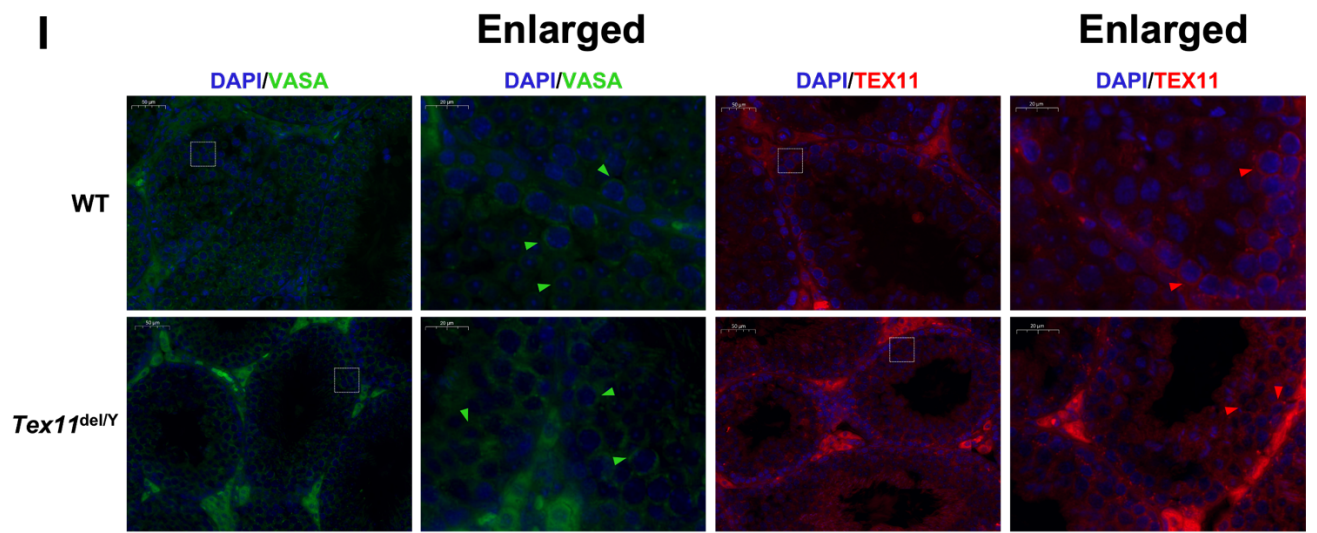


Figure 4

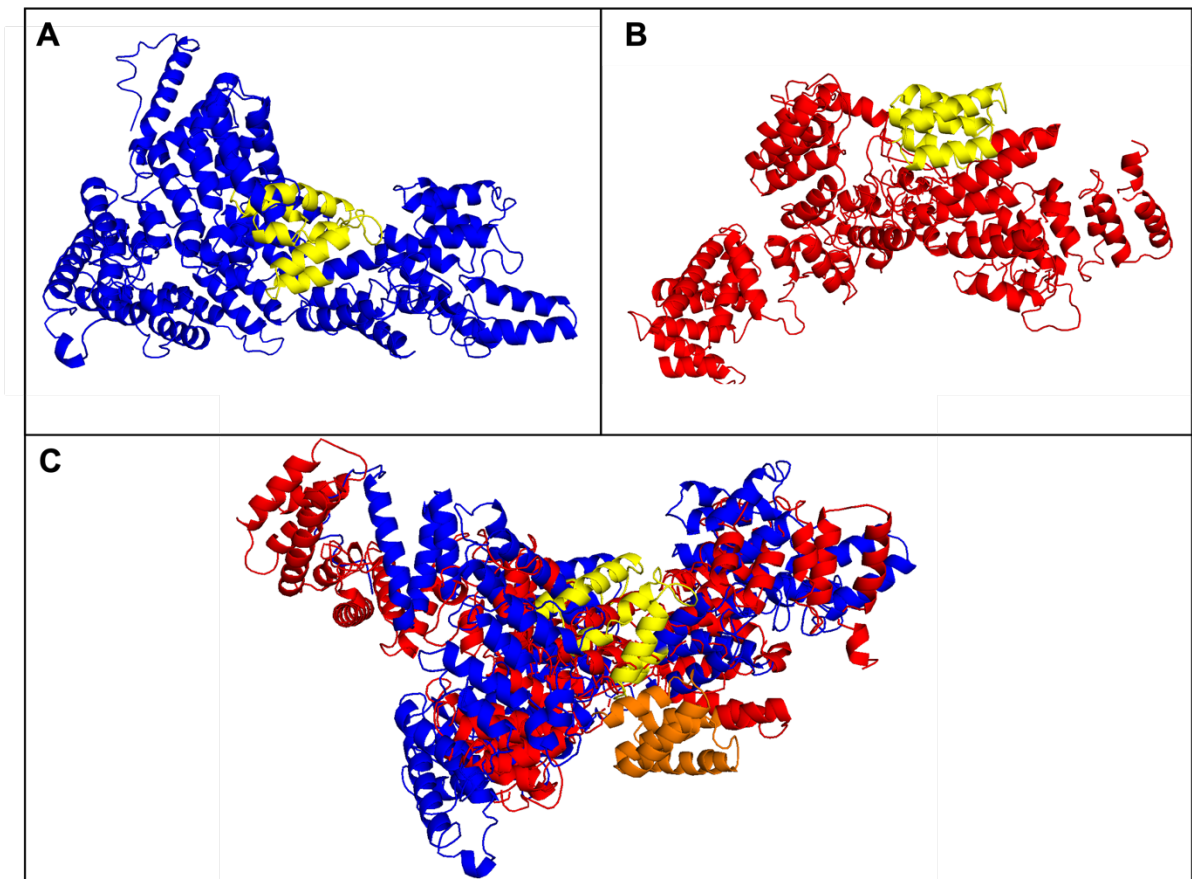


Figure 5

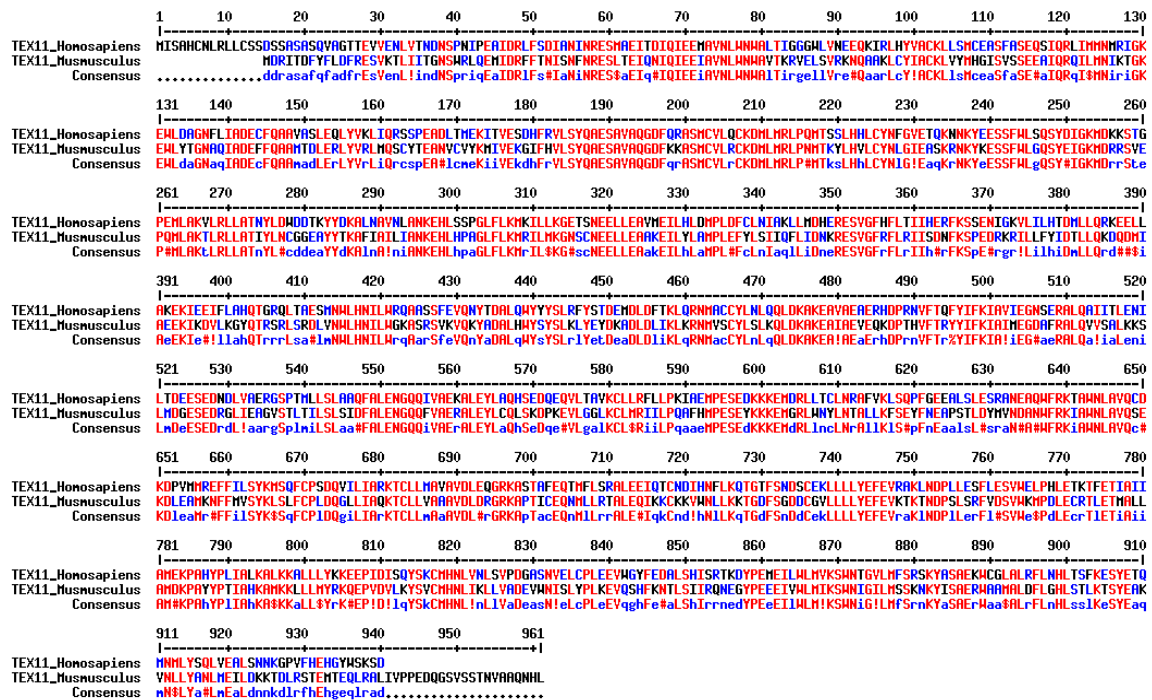


Table S1

		Souris mRNA var1 NM_031384		Human mRNA var1 NM_001003811.1	
EXONS	1	1-127	1	divergent	
	2	128-189	2	65-122	
			3	supernumerary	
	3	190-311	4	245-366	
	4	312-396	5	367-451	
	5	397-476	6	452-531	
	6	477-557	7	532-612	
	7	558-677	8	613-732	
	8	678-758	9	733-813	
	9	759-844	10	814-899	
	10	845-899	11	900-954	
	11	900-995	12	955-1050	
	12	996-1077	13	1051-1132	
	13	1078-1156	14	1133-1211	
	14	1157-1308	15	1212-1363	
	15	1309-1394	16	1364-1449	
	16	1395-1532	17	1450-1587	
	17	1533-1635	18	1588-1690	
	18	1636-1760	19	1691-1815	
	19	1761-1846	20	1816-1901	
	20	1847-1903	21	1902-1958	
	21	1904-1944	22	1959-1999	
	22	1945-2031	23	2000-2086	
	23	2032-2102	24	2087-2157	
	24	2103-2219	25	2158-2274	
	25	2220-2292	26	2275-2347	
	26	2293-2442	27	2348-2497	
	27	2443-2551	28	2498-2606	
	28	2552-2672	29	2607-2727	
	29	2673-2837	30	2728-2892	
30	2838-3250	31	divergent		

Figure S1



Figure S2

A

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     86
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Human  ACTTCAGTCTTCATCATCTCTGTTACAACTTTGGAGTAGAAACCCAGAGATATAAATATGAGAAAGTTCTTTCTGGCTTAG
Mouse  AAAAAATATCTTCATGTACTCTGTTACAACTTTGGCATAAGAGCAGCAGCGGATAAATACAAAGAGAGTTCTTTCTGGCTTAG
Consensus ACaaaAaaTCTTCATcaaCTCTGTTACAAcTTGGaaTAGAAaCaaacAAGaagATAAATAcaAAGaAGTTCaTTCTGGCTTaG
  
```

B

```

1      10     20     30     40     50     55
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Human_Exon11  CCAAAGCTATGATATTGGGAAGATGGATAAGAAATCTACTGGGCCAGAAATGCTG
Mouse_Exon10  CCAAAGCTATGAaATTGGGAAGATGGATAAGCGTCTGTGAGCCCAAAATGCTG
Consensus     CCAAAGCTATGAaATTGGGAAGATGGATAaGaaaTCTacTGaGCCAcAAATGCTG
  
```

C

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     96
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Human_Exon12  GCTAAAGTTCCTACGGCTATTAGCCACGAATTATTGGATTGGGATGACACCAATATATATGATTAAGGCTCTCAATGCTGTAAACCTAGCAAAACAG
Mouse_Exon11  GCTAAACAGCTCGGTACTAGCCACTATTTATTTGAAATGTGGTGGCAGGCATATTTACCAAGGCCCTTCAATGCTATACTCATTTGCAAAACAG
Consensus     GCTAAAacgCTaCGGcTAcTAGCCAcgRaTTATTTGaATTGgGaTGaCaaaaaATATTATaacAAGGCcCTCAaTGCTaTAAaCaTaGCAAAACAG
  
```

Figure S3

Amorçage avec Oligo de PCR up

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  ACCCTGGTTGATGTTCCAGTTACACACTATTACCTGCAATATAAATTTACTTTTACCACTGAGTCATATCCATGTGTAATGATATATATTTTCATTAGCCATATCATATTTTCATTTCA
18.2  CCAATTTCTGCATA--AATTTACTTTTCTACCACTGAGTCATATCCATGTGTAATGATATATATTTTCATTAGCCATATCATATTTTCATTTCA
Consensus .....CgaatTaaCTGCAaA...AATTTACTTTTCTACCACTGAGTCATATCCATGTGTAATGATATATATTTTCATTAGCCATATCATATTTTCATTTCA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  CTCACATGTTCTAGGATCAGGATGTTCCATTTCTGGTATTGTGACTAGAGTACTTAGCAATATCTCTATAGTAGGATATAGATCTTTAGGTATATGCTTAGAGAGTACTGCTAGGCTA
18.2  CTCACATGTTCTAGGATCAGGATGTTCCATTTCTGGTATTGTGACTAGAGTACTTAGCAATATCTCTATAGTAGGATATAGATCTTTAGGTATATGCTTAGAGAGTACTGCTAGGCTA
Consensus .....CgaatTaaCTGCAaA...GaaCTCaaagaagGGagTggGaaTaaTaccgaAaGaaat.....GaAGaTgTgAaAaacCaTgaGgTgTgGc...AacAaGtAcTcTgGtCa

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  TACAGTAG--ATCATTTCTAGCATTTGAAACAACTACTGCACACTGATTTCTATAGTAGCTGCAACCAATTTATGTACCCACATCAGTATATTAATGTTCCCTTTCTCATCCATACCAACGATTAT
18.2  TACAGTAG--ATCATTTCTAGCATTTGAAACAACTACTGCACACTGATTTCTATAGTAGCTGCAACCAATTTATGTACCCACATCAGTATATTAATGTTCCCTTTCTCATCCATACCAACGATTAT
Consensus .....TAcAGTAG_ATcgaTcTCTacCaTTCcgaacAAgaCT_CACcCaTTcCaAa...TAGCc_CAAaaA.....

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  TGTTTCTAGTCATTTGACTAGGTGAGATAAARATTTCAARATATTTGATTACATTTTCTGATATTAAGGATGTTGACATTCARAAATGATTTCTGGCCATTTACATTTCAATTTTG
18.2  TGTTTCTAGTCATTTGACTAGGTGAGATAAARATTTCAARATATTTGATTACATTTTCTGATATTAAGGATGTTGACATTCARAAATGATTTCTGGCCATTTACATTTCAATTTTG
Consensus .....

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  AGAATTTCTCTAGTTCTTGACCTAGGTTTAACTGGGTTGTTGTTTCTGATGCTAGGTTGTTTTTTGTTTTGTTTTTTGTTTCTTATCTAGACATTAACCCCTTGTGAGATATAGT
18.2  AGAATTTCTCTAGTTCTTGACCTAGGTTTAACTGGGTTGTTGTTTCTGATGCTAGGTTGTTTTTTGTTTTGTTTTTTGTTTCTTATCTAGACATTAACCCCTTGTGAGATATAGT
Consensus .....

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  TAGTAAAGCATTTTTTACTCTGAGGCTTCTCTTAACTCATGATATGTCCTTGCTATACAGAGGGCTTGGTTTCAATGATGTTCTATTGTCAGTGTGGTTTCAGTCTGACTATTAGT
18.2  TAGTAAAGCATTTTTTACTCTGAGGCTTCTCTTAACTCATGATATGTCCTTGCTATACAGAGGGCTTGGTTTCAATGATGTTCTATTGTCAGTGTGGTTTCAGTCTGACTATTAGT
Consensus .....

781    790    800    810    820    830    840    850    860    867
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
lex11  GTCTGTTGAGAAATCCTTCTCTGTATGAAATTTGAACATATTCCTACTTCTCTTTAGCAGATTTACGGTATCAGGCTTT
18.2  GTCTGTTGAGAAATCCTTCTCTGTATGAAATTTGAACATATTCCTACTTCTCTTTAGCAGATTTACGGTATCAGGCTTT
Consensus .....
  
```

Oligo PCR+séquenage

gRNAtex11-FW-ex9up1

Amorçage avec Oligo de PCR up

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

Tex11
18,2-up
Consensus
CCTCAGCCGATGTGCGTATCTGTACCCATCAGTTTAGGTTGGACAGCCTTCTGAGACATCACCAGTAGAGGAAAGTTTATGAGTTGTATCGGTGAGTAGTTTCATCTATGGGCACT

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

Tex11
18,2-up
Consensus
AGCTTGTTCCTTTTGGGCTGTGACAGGATGACATCAGAGTGGAGCATGGGATCGAGGGACCTAGTAACTTATAGCCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGAGGAAATGGGGAGAGGG
CACCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGGGAGGAAATGGGGAGAGGG
CACCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGGGAGGAAATGGGGAGAGGG

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

Tex11
18,2-up
Consensus
TGAAAGAGAGACAGCATGTGTAGAGCCCAAGCTCCTACTGTGTCTTCAGTAGTATTGCTCTCCCTTCCCTTAAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCTGTAGCCTGGGAGACACTCAAT
TGAAAGAGAGACAGCATGTGTAGAGCCCAAGCTCCTACTGTGTCTTCAGTAGTATTGCTCTCCCTTCCCTTAAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCAAAA

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

Tex11
18,2-up
Consensus
ACATGGGCTTTTGTATATTCAGATCCAAATTTAGCCTAGAACTATACATACATGCTTATATACTGGTGTGGGTGTATATGTACATGGTATATGTCACACTAGAAAACGTTTATATTA

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

Tex11
18,2-up
Consensus
CITTTGAGTGTGAGAAATGAGGAAATGACCATTAAGTCCAGTTAGACTGAGCTTCAGAGAGGACAGGTGAAAGACACAGTACTAGAACTTAGCACAGTAGAAATCGAGTTAAGTT

651 660 670 680 690 700

Tex11
18,2-up
Consensus
TACTATTTAGATATCTCTGTATTGTATCACACACATCGGTTC

Oligo PCR+séquence

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

18,2-up
18,2-du
Consensus
TCCGAGGATTTAGTGAAGTAGAGCGGAGAGGTCAGTGAACAGAGCTGAGCTAGTTATCAGGGAGAGGGAGGTGGGACTCAAAAGACAAAGTGCAGATAATTA AAAAACAAGTACCTTT

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

18,2-up
18,2-du
Consensus
AGTGTATTTAGAAAGAGGGAAAGTATTTTGGTATCTTGGACCATGATGGAGGATAAAATCCTTGTGTTGCTAGAAATAGACGAGGGCAGGGTTAGAGAAATGAGAGTCTACGCTTAGGA

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

18,2-up
18,2-du
Consensus
GTAGAAAGTTCCAAATTAGACGGACGAGCCAAAGTTGAAAAGAGTGGGAGCGGAAATAAAATGTCGATAGCAGGGAGAGTAGCATAGAGTTTATACTAGATGGATAGGTGATTTACCC

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

18,2-up
18,2-du
Consensus
CGCATTTTCGATA--AATTTACTTTCTTACACACTGAGTCATATCCATTGTTGTAAGTATTATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCACACTCA
TGGTGTATGTTCCAGTTACACTATTTACTGCAATATAAATTTACTTTTCTTACACACTGAGTCATATCCATTGTTGTAAGTATTATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCACACTCA
CgaaTTaaCTGCAaA...AATTTACTTTCTTACACACTGAGTCATATCCATTGTTGTAAGTATTATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCACACTCA

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

18,2-up
18,2-du
Consensus
CTAGTTATAGTCCCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGGGAAATGGGGAGGGGTGAGAGAGAGACAGCATGTGTAGAGCCCAAGTCTACTGTGCTCCTCAGTAGTATTGCTCT
CTAGTTATAGTCCCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGGGAAATGGGGAGGGGTGAGAGAGAGACAGCATGTGTAGAGCCCAAGTCTACTGTGCTCCTCAGTAGTATTGCTCT
CTAGTTATAGTCCCTGGGAGCCAAAGAGGGAGGGAGGGAAATGGGGAGGGGTGAGAGAGAGACAGCATGTGTAGAGCCCAAGTCTACTGTGCTCCTCAGTAGTATTGCTCT

651 660 670 680 690 695

18,2-up
18,2-du
Consensus
CTCCCTTCTCTTAAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCAAAA
TTGAGTGA---TAGTAGTCTGATT
cTcacTga...TaaaAGcTcAcc.....

Oligo PCR+séquence

Amorçage avec oligo de PCR dw

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  TTATTARATGGTTGAARTTCAGTTAGACATTCCTTTAGTAGTCCCTTTAGAAAACACACAGATTGTTACACTCTTCCTAGTACATARAGGTAAATTAARATTTTAAAGTATTCAATTTT
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GTTTTAGCTGCATTCATAGCTGTCTCAGCCCGATGTGGCTTATCTGTAACCCATCAAGTTTAGGTTGGACAGGCTTCTGAGACATCAACCCAGTAGAGGAAGTTTAAAGTGTATCGGTGA
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  AGTAGTTCCTACTATGGGCACTCAGCTTGTGCTTTTGGCATGTGACAGGAGTAGACATCAGAGTGGAGCATGGGATCAGGGGACCTAGTACCTATAGACCTGGGAGCCAAAGAGGGAGAG
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GGAGAGGAGGATGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACACATGTGTAGAGGCCAARACTACTGAGGACACAGTAGGACTTATGCTCTCCCTTCCCTTAGAGGCTCACCTCCCAATAGCC
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CTGTAGCTGGGAGACACTCTATACATGGGCTTTGTTGATTTTCAGATCCCAATATAGCACTAGAACATACATACATGCTTTATATACCTGGTGGGGTGTATATGATCGATGGTATATGT
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
651     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CACACTGAAAACGTTATATACCTTTGAGTGTGAGAAATGAGAGAAATGACCATATAAGTCCAGTTAGCTGAGCTTCAGAGGAGCAGAGTGAAGAGACACAGTACAGAAATCTAGCA
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781     790     800     810     820     830     840     850 854
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CAGTAGAAATCTGAGTAAAGTTACTATTTAGATTATCTCTGATTTGTATCACACACACATGGTGGTT
18,2-fw
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

gRNAtex11-FW-ex11dw2

Oligo PCR+séquence

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  ACCCTGGTGTATGTTCCAGTACACATTTAATTCGCAATTAATTTACCTTTTCTAACACACTGAGTCATATCCATGTGTAAGTATATATATTTTCATTAGCCATATCATATTTTCATTTTCA
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CTCACAGTTTCATAGGTATCAGGATGTTCCCATTTCTTGGTATTTGTGACTAGAGATCTTAGCAATATCTCTATAGTAGATATAGATCCCTTAGGTATATGTCTAGAGAGTACTGAGGTCA
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  TACAGTAGATCTATTCTAGCATTGACAACTACTGCACTGATTTCTATAGTAGCTGCACAGTTATGTACCCACATCAGTATATAAATGTTCCCTTCTCACATCCATCCAGCATTTAT
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GTTCTTAGTCATTTTGCATAGGTTGAGATAAATTTCAAAATATTTGATTTACATTTTCTGATTAATAGGATGTTGACATCAAAATGATATTTTGGCCATTTACCATTTCAAAATTTGA
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GAATTTTCTTAGTCTTTGACATAGTTTTAACTGGGTTGTTGTTTCTGATGCTAGTGTGTTTTTTGTTTTGTTTTTGTCTTATCTAGACATTAACCTTTGTCAGATATAGTT
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
651     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  AGTAAAGACTTTTTTTTACTCTGAGGCTTCTTAACTCATGATATGTCCTTGTATACAGAGGCTTTGGTTTCATGATGTTCTATTGTCAGTGTGGTTTCAGTACTGTACTTAGG
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781     790     800     810     820     830     840     850 856
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  TCCCTGTGAGAAATCTCTCTGTATGAAATGAAACATATCCCACTTCTCTTTTACAGATTTACGGTATCAGGCTT
18,2-up3'
18,2-du
Consensus
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

Oligo PCR+séquence

gRNAtex11-FW-ex9up1

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  TTAAATTAATGGTTGAAATTCAGTTAGACATCTCTTTAGTATGCCTTTAGAAAACACACAGATGTTACACTCTTTCTAGTACATAAAGGTAARATTAATATTTTAAAGTAAATTTACATTTT
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GTTTTGGAGTCATCATAGCTGTCTCAGCCGATGCGTTATCTGTACCCATCAGTTAGGTTGGACAGCCCTCTGAGACATCACCCAGTAGAGGAAGTTTAAATGAGTTGATCGGTGA
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  AGTAGTTCCTATATGGGACTCAGCTTGTGCTTTTGGCATGTGACAGGAGTACATCAGAGTGGAGCATGGGATCGAGGGACTAGTAACTAATAGCCTGGGAGCCCAAGAGAGGGAGAG
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....
CACCTGGGAGCCCAAGAGAGGGAGAG
CACCTGGGAGCCCAAGAGAGGGAGAG
CACCTGGGAGCCCAAGAGAGGGAGAG

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  GGAGAGGAGGARTGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCAACTACTGAGAGACAGTAGACATATGCTCTCCCTTCTCTTAAGGCTCACACTTCCAAATAGCC
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....
GGAGAGGAGGARTGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCAAA.t.ct...g...c...ag.a.tatgctctcccttctcttaaggctcaacctccaatagcc

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CTGTAGCCTGGGACACTTAATACATGGCTTTTGTGATATTCAGATCCAAATATAGCAGTATACATACATGCTTATATACCTGGTGTGGGTGTGTATGTACATGGTATGTGT
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....
c.....

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CACACTGAAAACGTTTATATTACTTTTGGAGTGTGGAAATGAGAAATATGACCATATAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTCAGAGGAGCAGATGGAAAGACAGTACTAGAAATCAGCA
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....

781    790    800    810    820    830    840    850 854
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11  CAGTAGAATCTGAGTAAAGTTACTATTTAGATTATCTCTGTATTTGATACACACACATCGGTGTT
18.2-up3'
18.2-du
Consensus
.....

```

gRNAtex11-REV-ex11dw1

gRNAtex11-REV-ex11dw2

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11-nut.  ACCTGGTGTATTTCCAGTTACACTATTACTGCBAATAAATTTACTTTCTTACACTGAGTCATATCCATTGTGTAATGTATATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCA
ant-seq-up  ATTTCTGCATB--AATTTACTTTCTTACACTGAGTCATATCCATTGTGTAATGTATATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCA
seg-du     AATTTACTTTCTTACACTGAGTCATATCCATTGTGTAATGTATATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCA
Consensus  ..t.ctgca.a...AATTTACTTTCTTACACTGAGTCATATCCATTGTGTAATGTATATATTTTCATAGCCATATCATATTTTCATTTTCA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11-nut.  CTCACTATTTCTATAGTCCCTGGGAGCCCAAGAGAGGAGAGGGAGAGGAGAAATGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCAACTACTGAGAGACAGTAGGACTATG
ant-seq-up  CTCACTATTTCTATAGTCCCTGGGAGCCCAAGAGAGGAGAGGGAGAGGAGAAATGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCA
seg-du     CTCACTATTTCTATAGTCCCTGGGAGCCCAAGAGAGGAGAGGGAGAGGAGAAATGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCAa...
Consensus  CTCACTATTTCTATAGTCCCTGGGAGCCCAAGAGAGGAGAGGGAGAGGAGAAATGGGGAGAGGGTGAAGAGAGAGACAGCATGTGTTAGAGGCACCAa...

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11-nut.  CTCTCCCTTCTCTTAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCTGTAGCCTGGGACACTAATACATGGCTTTTGTGATATTCAGATCCAAATATAGCAGTAAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
ant-seq-up  CTCTCCCTTCTCTTAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCTGTAGCCTGGGACACTAATACATGGCTTTTGTGATATTCAGATCCAAATATAGCAGTAAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
seg-du     CTCTCCCTTCTCTTAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCTGTAGCCTGGGACACTAATACATGGCTTTTGTGATATTCAGATCCAAATATAGCAGTAAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
Consensus  CTCTCCCTTCTCTTAAGGCTCACACTTCCAAATAGCCCTGTAGCCTGGGACACTAATACATGGCTTTTGTGATATTCAGATCCAAATATAGCAGTAAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11-nut.  TTATATACTGGTGTGGGTGTGTATGTACATGGTATATGTCACACTAGAAAACGTTTATATTACTTTTGGAGTGTGAAATGAGAAATATGACCATATAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
ant-seq-up  TTATATACTGGTGTGGGTGTGTATGTACATGGTATATGTCACACTAGAAAACGTTTATATTACTTTTGGAGTGTGAAATGAGAAATATGACCATATAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
seg-du     TTATATACTGGTGTGGGTGTGTATGTACATGGTATATGTCACACTAGAAAACGTTTATATTACTTTTGGAGTGTGAAATGAGAAATATGACCATATAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC
Consensus  TTATATACTGGTGTGGGTGTGTATGTACATGGTATATGTCACACTAGAAAACGTTTATATTACTTTTGGAGTGTGAAATGAGAAATATGACCATATAAGTCCCAAGTTAGACTGAGCTTC

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630 637
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
tex11-nut.  AGAGGAGCAGAGTGGAAAGACACAGTACTAGAAATCTAGCAGCAGTAAAGATCTGAGTAAAGTTACTATTTTAAATTTCTCTGTATTTGATACACACACATCGGTGTT
ant-seq-up  AGAGGAGCAGAGTGGAAAGACACAGTACTAGAAATCTAGCAGCAGTAAAGATCTGAGTAAAGTTACTATTTTAAATTTCTCTGTATTTGATACACACACATCGGTGTT
seg-du     AGAGGAGCAGAGTGGAAAGACACAGTACTAGAAATCTAGCAGCAGTAAAGATCTGAGTAAAGTTACTATTTTAAATTTCTCTGTATTTGATACACACACATCGGTGTT
Consensus  AGAGGAGCAGAGTGGAAAGACACAGTACTAGAAATCTAGCAGCAGTAAAGATCTGAGTAAAGTTACTATTTTAAATTTCTCTGTATTTGATACACACACATCGGTGTT

```

Oligo PCR+séquenceage

gRNAtex11-FW-ex9up1

Délétion de 32673bases

gRNAtex11-REV-ex11dw2

Oligo PCR+séquenceage

Table S2

Genotyping PCR primers				Size
Primer name	5'-Forward-3'	Primer name	5'-Reverse-3'	
Tex11_64241F	GTGCACCTTTCTGGGTGTTT	Tex11_64843R	GCACTTTTCAGGCAGGACTC	622bp(WT)
Tex11_50129F	ACCCTGGTTGATTGTTTCCA	Tex11_83418R	GAACACCGATGTGTGTGTGAT	600bp(Tg)

RT-qPCR Primers				Size
Primer name	5'-Forward-3'	Primer name	5'-Reverse-3'	
Tex11Ex11_81921F	GCTAAAACGCTGCGGTTACT	tex11Ex11_81977R	AGCAATGAAGGCCTTGGTATAA	78bp(WT)
qGAPDH-m F1	GCATCTCCCTCACAATTTCCA	qGAPDH-m R1	TGCAGCGAACTTTATTGATGGT	100bp

CRISPR/Cas9 Guide RNA	
gRNAs_5'_ex9-1 (fwd)	3'-CTCACTAGTTCATAGGTATC (AGG)-5'
gRNAs_5'_ex9-2 (rev)	3'-TCAACAGGACCTAATAGTAC (AGG)-5'
gRNAs_3'_ex11-1 (rev)	3'-AGATAACGCACATGCGGCTG (AGG)-5'
gRNAs_3'_ex11-2 (fwd)	5'-CCTAGTAACCTAATAGCACC (TGG)-3'

*PAM sequences are in brackets

Table S3

Primary antibody	Reference	Source	Dilution
ZIP4H/Tex11	AF5627 R&D Systems	Mouse	1/100
VASA/DDX4/MVH	Ab13840 Abcam	Rabbit	1/200
Secondary Antibody	Reference	Conjugate	Dilution
Anti-goat (red for Tex11)	A21468	594	1/200
Anti-rabbit (green for Vasa)	A21441	488	1/200

Table S4

Publication	Nucleotide change	Protein change	Patients number	Testicular phenotype	Sperm number	Varsome prediction	Frequency in GnomAD or ExAC	Alteration in SPO22 domain ?	Analysis of TEX11 expression immunohistochemistry or western blot)	Mouse model with the identified alteration
Krausz et al, 2021	c.84-651del	p.28del189	1	Meiotic arrest	No sperm		not reported	yes (deletion of approximately 189 amino acids)	Not performed	No, but immunofluorescence studies revealed that the seminiferous tubules of the patient lacked XY bodies, but some spermatocytes developed further than pachytene, suggesting metaphase arrest
Yu et al, 2021	c.196-199del	p.D66fs	1	Meiotic arrest	No sperm		not reported	no	Negative	No, but cellular model yes
Ji Z et al, 2021	c.298delG	p.V85Lfs*5	1	/	/	Pathogenic	not reported	no	Negative	No
Yang et al, 2015	c.394T>A	p.W132R	1	/	/	Likely benign	not reported	no	Not performed	Yes: normal fertility and meiosis: mutation not responsible to male infertility in humans according to Yang et al, 2015
Yatsenko et al, 2015	c.450C>T	p.A150A spl d	1	Mixed testicular atrophy	Few sperm	Benign	0.00172	no	Positive	No
Yang et al, 2015	c.450C>T	p.Ala150=	1	/	/	Benign	/	no	Not performed	No
Yang et al, 2015	c.469G>A	p.V157I	1	/	/	Benign	not reported	no	Not performed	No
Yatsenko et al, 2015	c.511A>G	p.M171V	1	Meiotic arrest	No sperm	Likely benign	4.57e-4	no	Not performed	No
Nakamura et al, 2017	c.511A>G	p.M171V	1	/	/	Likely benign	4.57e-4	no	Not performed	No
An M et al, 2021	c.511A>G	p.M171V	1	Maturation arrest	No sperm	Likely benign	0.0006	no	Not performed	No
Yang et al, 2015	c.560A>G	p.Q187R	1	/	/	Likely benign	not reported	no	Not performed	Yes: normal fertility and meiosis: mutation not responsible to male

										infertility in humans according to Yang et al, 2015
Yatsenko et al, 2015	c.652del237bp p.218del79aa		1	Mixed testicular atrophy	Few sperm		/	yes (deletion of approximately 79 amino acids)	Not performed	No
Yatsenko et al, 2015	c.652del237bp p.218del79aa		1	Meiotic arrest	No sperm		/	yes (deletion of approximately 79 amino acids)	Not performed	No
Yang et al, 2015	c.776C>T p.T259I		1	/	/	Likely benign	not reported	yes	Not performed	No
Yatsenko et al, 2015	c.792+1G>A p.L264 spl d		1	Meiotic arrest	No sperm	VUS	not reported	yes	Not performed	No
Ji Z et al, 2021	c.857delA p.K286Rfs*5		1	/	/	Pathogenic	not reported	yes	Positive (reduction)	No
Ji Z et al, 2021	c.1254dupA p.N418Kfs*10		1	Maturation arrest	No sperm		not reported	yes	Positive (reduction)	No
An M et al, 2021	c.1291C>T p.Q431X		1	/	/	Pathogenic	0	yes	Not performed	No
Yang et al, 2015	c.1303Ins(TT) p.446*		2*	Meiotic arrest for one brother	No sperm		/	yes	Not performed	yes (Wang et al, 2021): meiotic arrest in KI mice
An M et al, 2021	c.1382G>T p.R461M		1	/	/	Uncertain Significance	0	no	Not performed	No
Ji Z et al, 2021	c.1426-1C>T splicing		7*	Maturation arrest for one of them	No sperm		not reported	no	Not performed	No
Ji Z et al, 2021	c.1796+2T>G splicing		2*	Maturation arrest for one of them	No sperm	Pathogenic	not reported	no	Not performed	No

Yatsenko et al, 2015	c.1837+1G>C	p.R612 spl d	1	Meiotic arrest	No sperm	Pathogenic	not reported	no	Positive	No
Yatsenko et al, 2015	c.2092G>A	p.A698T	1	Partial Meiotic arrest	Few sperm	Likely Benign	0.000186	no	Not performed	No
An M et al, 2021	c.2285C>A	p.S762X	1	Maturation arrest	No sperm	Pathogenic	0	no	Not performed	No
Yang et al, 2015	c.2288T>C	p.V763A	1	Meiotic arrest at pachytene stage	No sperm	Benign	not reported	no	Not performed	yes: meiotic defects (asynapsis) but not complete meiotic arrest (reduction of sperm number, and normal meiotic recombination)
Yang et al, 2015	c.2363T>C	p.Tyr788=	1	/	/	Benign	/	no	Not performed	No
Sha et al, 2018	c.2613G>T	p.W871C	2 *	Meiotic arrest	No sperm	Likely Pathogenic	not reported	no	Positive	No
Ji Z et al, 2021	c.2613G>T	p.W871C	2 *	Maturation arrest for one of them	/		not reported	no	Positive	No

* : same family

Discussion générale et perspectives

L'azoospermie non-obstructive liée à l'AM est un excellent exemple de maladie monogénique, comme le démontre ce travail. En revanche, ce phénotype n'implique pas que des anomalies ne touchant qu'un ou quelques gènes comme cela est le cas pour la macrocéphalie spermatique avec le gène *AURKC* (*Aurora Kinase C*) (Dieterich *et al.*, 2007) et la globocéphalie spermatique avec *DYP19L2* (*Dpy-19 Like 2*) (Koscinski *et al.*, 2011). L'originalité de ce projet repose sur sa focalisation sur un phénotype testiculaire précis et spécifique de l'ANO : i.e. l'arrêt de maturation. Actuellement, la majorité des études publiées recherchaient les causes monogéniques dans des cohortes de patients avec ANO en incluant tous les phénotypes ou sans connaître le phénotype histologique testiculaire. En conséquence, il n'était pas certains que le phénotype testiculaire correspond bien aux variants/gènes candidats identifiés.

La réalisation d'une analyse complète de l'exome sur l'ensemble de nos patients : cas familial (article 1), cohorte (article 2), ou cas isolés (article 3 et 4), recrutés dans un programme de procréation médicalement assistée et présentant des ANO avec un AM, nous a permis de démontrer la présence de variants probablement pathogènes pour différents gènes ayant une expression testiculaires spécifiques ou non, et intervenant dans le blocage de la production des spermatozoïdes. Notre stratégie a montré avec succès une forte hétérogénéité génétique, qui s'explique par la complexité de la spermatogenèse et de la fonction testiculaire. À ce titre, cette atteinte se différencie des autres déjà bien décrite dans la littérature et associées à un défaut de la spermatogenèse où des mutations récurrentes ont été identifiées, même si celles-ci sont multigéniques comme dans le cas des anomalies multiples du flagelle (Nsota Mbango *et al.*, 2019; Sha *et al.*, 2019; Tu *et al.*, 2019).

Aujourd'hui, le plus grand défi dans la génétique des AM, n'est plus dans l'identification des variants de gènes, mais se situe sur (1) **la validation des mutations identifiées**, (2) **l'implémentation en routine du WES** et le (3) **développement d'une thérapie pour ces patients**.

Parmi les résultats obtenus dans ce travail thèse, nous avons identifié des altérations dans des gènes déjà décrits en ANO avec AM. Ceci renforce l'impact de ces gènes et de leurs variants dans ce phénotype de ANO. En revanche, certains gènes identifiés dans ce projet n'ont jamais été décrits dans la littérature, ni dans le processus de la spermatogenèse, ni dans le cadre d'ANO chez l'homme. Des études de réplification supplémentaires et/ou des preuves fonctionnelles seront nécessaires afin que ceux-ci soient classés comme associés « fortement » à l'infertilité masculine. Ceci a été le cas pour le gène *MEI1* (Ben Khelifa *et al.*, 2018), initialement rapporté pour la 1^{ère} fois dans ce travail, puis plusieurs fois ensuite et aujourd'hui considéré comme un gène majeur dans les ANO (Houston *et al.*, 2021).

Une des approches que nous avons utilisée pour la validation de l'impact d'un variant a été l'analyse immunohistochimique. Celle-ci présente néanmoins plusieurs écueils. Seule, elle ne semble pas suffisante pour affirmer l'association entre le génotype et le phénotype. Si l'absence d'expression de la protéine candidate peut être liée à l'absence de la protéine, surtout valable pour les protéines tronquées, elle peut-être aussi liée au fait que le point de blocage peut être plus précoce durant la spermatogenèse que le moment où la protéine est exprimée. Par conséquent l'absence de l'expression de la protéine n'est pas forcément liée au variant identifié, comme nous l'avons montré pour la protéine DNMT3B (Ghieh *et al.*, 2021). Autre point, il faut avoir accès au tissu testiculaire, or ceci n'est pas toujours le cas et ne le sera pas si l'analyse est réalisée en amont de la TESE.

Une des solutions de validation des variants serait la réalisation d'un modèle cellulaire mimant les étapes de la méiose et/ou de la spermatogenèse. Or, parce que les cellules souches spermatogéniques sont difficiles à cultiver, que les modèles cellulaires n'existent pas, et que la spermatogenèse est un mécanisme très conservé chez les mammifères, les modèles animaux semblent être le meilleur choix et en particulier pour la validation de variants impliqués dans les troubles de la méiose (AM). De nombreuses suppressions géniques permettant la modélisation des anomalies identifiées chez l'homme ont déjà été réalisées chez la souris. Avec le développement

de la technologie CRISPR/Cas9, les animaux modèles modifiés génétiquement sont obtenus plus rapidement et « facilement », que cela soit pour des souris knock-out ou knock-in. Afin de valider les mutations et les gènes potentiels identifiés par séquençage haut-débit, une stratégie de validation systématique des gènes basée sur la technologie CRISPR/Cas9 doit être mise en place en utilisant des modèles murins, dès lors qu'aucun modèle cellulaire n'est accessible.

Il est important de se rappeler, cependant, que le modèle murin n'est pas sans défaut et que, malgré les similitudes, les spermatogenèses murine et humaine ne sont pas les mêmes. Un exemple probant de cette différence, en supposant que la délétion a un impact chez l'homme, pourrait être le modèle mutant portant la délétion exonique *Tex11^{Ex9-11del/Y}* que nous avons généré dans le deuxième axe de recherche de ce travail de thèse (article 5). Cette étude a montré l'utilité de la validation fonctionnelle des altérations génétiques humaines en ANO mais aussi que la fonction du domaine « spécifique de la méiose » *Spo22*, s'avère non essentielle pour la spermatogenèse murine.

I. **Changer et améliorer progressivement la gestion Clinique**

Une fois les altérations génétiques validées, l'une des principales questions à aborder est de connaître l'avantage des tests génétiques en utilisant les techniques de séquençage à haut débit, type WES, pour la majorité des patients ANO, et en particulier ceux présentant un AM.

À première vue, l'ANO due à l'AM est une condition extrême. Pourtant, il y a une valeur ajoutée évidente dans la détermination d'une cause génétique exacte pour chaque patient : **une meilleure gestion de l'infertilité et amélioration des soins aux patients**. Ces connaissances permettront avant tout d'améliorer la prise en charge et le conseil génétique proposées au patient. La recherche génétique peut aider à prendre la décision d'envisager (ou non) une TESE, procédure qui n'est pas sans

risques, car invasive et donc susceptible d'être à l'origine de complications. Ceci doit être mis en regard des taux de succès de l'ensemble du processus : TESE -FIV-ICSI. Une étude récente sur 714 patients ANO a rapporté qu'il a été possible de récupérer des spermatozoïdes chez seulement 40,5% des ANO lors de leur première TESE et qu'au final seuls 13,4% de ces hommes finissent par devenir un père biologique (Vloeberghs *et al.*, 2015). Si le WES peut être hautement prédictif de l'AM, et de la probabilité de réussite d'une TESE, cette dernière pourra être évitée. En fonction de nos résultats ceci pourrait être déjà proposé en présence d'une forte consanguinité, et d'un variant génétique altérant la protéine sur un gène AM connu. Pour autant, il ne semble pas nécessaire de se limiter à l'étude d'un panel de gènes connus comme impliqués dans l'infertilité masculine, et ceci pour 2 raisons principales : (1) le rendement actuel de la détection de variants dans la pratique clinique reste modeste (Oud *et al.*, 2017) (Tüttelmann *et al.*, 2018) , même si des preuves accumulées, incluant notre projet, montrent que quelques gènes (*TEX11*, *SYCE1*, *STAG3*) sont altérés de manière « récurrente », et (2) en raison de la forte hétérogénéité génétique comme nous avons pu le montrer. Le WES s'avère donc plus utile qu'un panel ciblé dans ce phénotype, même si des précautions doivent être prises en raison des découvertes dites secondaires ou incidentales.

A. Découvertes secondaires ou « fortuites »

Étant donné que les technologies de séquençage à haut débit ont la capacité d'identifier toutes les mutations au sein d'un génome, elles peuvent révéler des découvertes secondaires ou fortuites, soit des variants non liés au phénotype clinique principal du patient (dans notre cas, l'infertilité masculine due à l'AM), mais qui présentent une valeur médicale et donc une utilité pour le patient. Le débat actuel parmi les généticiens et les cliniciens se concentre sur les questions suivantes :

1) les découvertes secondaires doivent-elles être révélés aux patients ? Certains ont fait valoir que les découvertes fortuites ne devraient pas du tout être signalées dès lors qu'ils ne correspondaient pas à l'indication de l'analyse, tandis que d'autres ont

préconisé que les variations de tous les gènes associés à une maladie pourraient être médicalement utiles et devraient être signalées (Angrist, 2011). L'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recommande d'examiner et de signaler les variants pathogènes dans une liste de 75 gènes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/>). Cette liste inclut des gènes liés à des conditions qui sont dites « actionnables », ce qui signifie qu'il existe des mesures qui peuvent être prises pour atténuer l'apparition ou la gravité de la pathologie liée. Ces gènes sont principalement liés au cancer et aux maladies cardiaques. L'ACMG recommande aux cliniciens d'alerter les patients sur la possibilité que le séquençage clinique puisse générer des découvertes fortuites qui pourraient nécessiter une évaluation plus approfondie.

2) quels types de découvertes secondaires doivent être révélés : les mutations « actionnables », les variants de signification inconnue, ou tous les variants ? L'ACMG a recommandé de restreindre les variants à déclarer comme découvertes fortuites à ceux correspondant à deux catégories descriptives : « Le variant a déjà été signalé et est une cause reconnue de pathologie pour le patient » ou « le variant n'a jamais été signalé mais est susceptible de provoquer le phénotype ou la pathologie ». Ainsi, l'ACMG a recommandé que seuls les variants ayant une probabilité plus élevée de provoquer une maladie soient signalés comme découvertes fortuites, bien que les données disponibles soient limitées dans de nombreux cas pour faire cette évaluation.

3) s'il n'y a pas de traitements pour une anomalie ou maladie détectée par le NGS, les résultats fortuits devraient-ils être révélés ?

Toutefois, le spectre spécifique de gènes ou de conditions qui devraient être considérés comme des découvertes fortuites à déclarer, ainsi que les critères de déclaration sous-jacents, sont fortement débattus (Ormondroyd *et al.*, 2018) (Grove *et al.*, 2014)). Les listes d'affections et de gènes associés (y compris la liste des gènes ACMG) ont été critiquées par le fait que les variants pourraient être classés

différemment ou pourraient être moins pénétrants et expressifs chez les personnes asymptomatiques.

Une étude récente (Saelaert *et al.*, 2019) a suggéré que les lignes directrices (internationales) pour la déclaration des découvertes fortuites dans les séquençages à haut débit cliniques pourraient n'être efficaces que si elles sont suffisamment détaillées en termes de critères appliqués et adaptées à la particularité de chaque cas individuel.

B. Prudence dans l'interprétation des variants

Une évaluation approfondie de la littérature publiée a révélé que tous les loci ou variants signalés ne se « qualifient » pas immédiatement pour être utilisés à des fins de diagnostic. Une récente analyse systématique de la littérature disponible sur les causes monogéniques de l'infertilité masculine est parvenue à la conclusion que seulement 92/521 (17,6%) des relations génotype/phénotype pathologique rapportées étaient fondées sur des preuves scientifiques adéquates réelles (Oud *et al.*, 2019). L'évaluation critique des gènes d'ANO pour la présente revue a révélé que même dans les bases de données de génétique médicale, OMIM, ClinVAR et HPO, il existe des loci mal classés concernant les preuves à impliquer dans l'ANO.

Dans l'ensemble, une coordination internationale est nécessaire pour développer des approches conjointes et des directives de diagnostic moléculaire pour le test des gènes liés à l'ANO et l'interprétation critique des variants identifiés dans le contexte clinique.

II. Caractérisation et mécanismes de l'arrêt de maturation spermatique

Chez la souris, l'incapacité à réparer correctement les CDBs méiotiques ou à appairer les chromosomes homologues conduit à un arrêt au cours de la prophase I au stade IV, appelé arrêt épithélial (de Rooij and de Boer, 2003)(Hamer *et al.*, 2008). Contrairement à la souris, les mécanismes de l'arrêt méiotique humain n'ont pas été

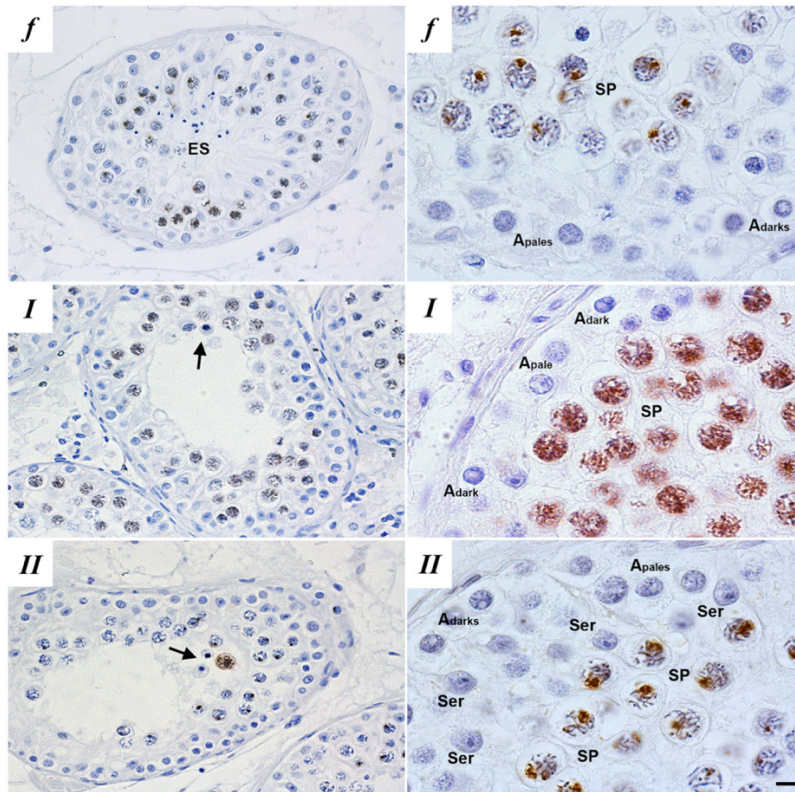


Figure 48 : Caractérisation des types d'arrêts de maturation chez l'homme.

La localisation immunohistochimique de γ H2AX dans des coupes de testicules inclus en paraffine d'hommes fertiles (f) et de patients présentant un arrêt de maturation révèle deux types de patients : un arrêt méiotique de type I (I) et de type II (II). Sont représentées : les cellules de Sertoli (Ser), les spermatides allongés (ES), les spermatogonies d' A_{pale} et d' A_{dark} , les spermatocytes (SP) et les spermatocytes apoptotiques (flèches). Barres d'échelle : 3 m (à gauche) ; 10 μ m (à droite). (Adaptée de Jan *et al.*, 2018).

complètement étudiés au niveau moléculaire et sont encore mal compris. Si environ 10 à 20 % des hommes atteints d'azoospermie non-obstructive ont un diagnostic d'arrêt méiotique complet ou incomplet (Su *et al.*, 1999); (Tsai *et al.*, 2012), l'étiologie reste inconnue pour la grande majorité des hommes, même si certains sont porteurs d'une aberration génétique connue (comme décrit dans le chapitre III) ou une mutation génétique unique associée à un arrêt méiotique (Ghieh *et al.*, 2021). Afin de mieux comprendre les mécanismes, il a été proposé une méthode d'exploration, dans le cadre d'arrêt de maturation (Jan *et al.*, 2018), basée sur la formation de la vésicule sexuelle par l'utilisation d'un anticorps contre γ H2AX sur les biopsies testiculaires. En général, avant l'achèvement de la synapsis des chromosomes homologues au stade zygotène, γ H2AX marque tous les axes des chromosomes non appariés. Par la suite, dans les spermatocytes pachytènes sains, l'expression de γ H2AX se limite à la vésicule sexuelle, dans lequel les chromosomes X et Y sont transcriptionnellement inactifs (vu précédemment). D'après cette évaluation immunohistologique, deux types d'arrêt méiotique ont été identifiés. Un premier où l'arrêt de la prophase méiotique était caractérisé par l'absence d'une vésicule sexuelle discernable et par une expression γ H2AX dispersée dans tout le noyau (**type I d'arrêt méiotique**), un second où il était observé une expression γ H2AX similaire à celle des témoins présentant une spermatogenèse normale (**type II arrêt méiotique**) (**figure 47**).

Afin d'étudier plus précisément la formation de la vésicule sexuelle et la synapsis des chromosomes homologues, des études d'immunofluorescence, avec des anticorps spécifiques de γ H2AX et SYCP3, ont été réalisées sur des étalements chromosomiques. Chez les patients de type I, une asynapsis sévère des chromosomes homologues est observée et caractérisée par une apparence de type zygotène de SYCP3, et une absence de la vésicule sexuelle, marquée par une coloration γ H2AX dispersée couvrant tous les chromosomes non appariés. En revanche, les spermatocytes les plus avancés des patients de type II, ont atteint une synapsis chromosomique complète et ont formé une vésicule sexuelle similaire aux témoins avec une spermatogenèse normale.

Afin d'évaluer davantage la progression méiotique, un marquage de MLH1 a été réalisé pour déterminer si la formation de crossing-over (CO) est perturbée. Comme prévu, les spermatocytes des patients de type I n'ont jamais dépassé un stade de type zygotène avec des chromosomes homologues asynaptiques et très peu de marquage MLH1 sur les axes chromosomiques marqués par SYCP3. Cependant, comme dans les contrôles avec une spermatogenèse normale, les spermatocytes les plus avancés des patients de type II semblaient plus au stade pachytène avec des chromosomes homologues entièrement appariés et des foyers MLH1 sur les axes chromosomiques marqués par SYCP3.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces différents types d'arrêt méiotique, la même étude a utilisé un protocole de séquençage monocellulaire de LDM et d'ARN (Jan *et al.*, 2017) pour générer les profils transcriptomiques des spermatocytes avec arrêt méiotique. Cette analyse a révélé que les spermatocytes arrêtés de type I et II sont transcriptionnellement distincts des spermatocytes normaux. Ainsi, sur la base de ces évaluations histologiques, cytologiques et moléculaires d'échantillons de testicules d'hommes en arrêt méiotique, il a été montré que les spermatocytes arrêtés de type I présentent un arrêt méiotique comparable à un arrêt de stade IV chez la souris, avec : une asynapsie sévère des chromosomes homologues, une formation du aberrante de la vésicule sexuelle, une expression accrue du gène *ZFY* codé par le chromosome Y, et semblent activer une voie d'endommagement de l'ADN conduisant à l'induction de p63, provoquant éventuellement l'apoptose des spermatocytes. Pour les spermatocytes arrêtés de type II, ceux-ci correspondent à un arrêt distinct du stade IV chez la souris, avec : une synapsis chromosomique normale, une morphologie normale de la vésicule sexuelle et une formation de crossing over méiotique, mais avec une expression réduite de plusieurs gènes régulateurs du cycle cellulaire et ne parviennent pas à inactiver le gène *ZFX* (Zinc Finger Protein X-Linked) codé par le chromosome X ce qui induit l'élimination des spermatocytes.

Une étude plus récente s'est intéressée à établir quels points de contrôle méiotiques sont activés chez les hommes présentant un échec sévère de la spermatogenèse, afin d'améliorer la caractérisation phénotypique des défauts méiotiques. L'analyse de 48 patients ayant AM, a montré que le point de contrôle de la métaphase est plus fréquemment activé que le point de contrôle du pachytène (Enguita-Marruedo *et al.*, 2019). Leur étude propose que l'arrêt méiotique chez l'homme survienne le plus souvent lors de la métaphase méiotique. Cet arrêt peut être incomplet, entraînant un faible nombre de spermatides, et se produit souvent en association avec une fréquence de crossing over réduite. Ceci contraste avec les observations chez la souris, où l'inactivation de gènes censés exercer des fonctions spécifiques à la prophase méiotique entraîne le plus souvent l'activation d'un ou des deux points de contrôle du pachytène. Les exemples sont les gènes requis pour la formation des CDBs (*Spo11*, *Mei4*), pour la réparation méiotique des CDBs (*Dmc1*, *Msh4*, *Msh5*, *Meiob*), et/ou pour l'appariement des chromosomes (complexe synaptonémal ou composants de la cohésine : *Sycp1*, *Sycp2*, *Sycp3*, *Smc1b*).

Enfin, les études immunologiques décrites constituent une approche hautement réalisable pour caractériser les phénotypes d'arrêt méiotique chez les hommes azoospermes. Cette approche peut faire la distinction entre l'échec de la réparation de l'appariement des chromosomes/CDBs et l'échec de la transition métaphase-anaphase. Ainsi, cette technique peut également être utilisée comme un outil pour présélectionner les patients pour le séquençage dans la recherche de gènes d'infertilité due à un AM, mais nécessite une harmonisation internationale ou à minima nationale.

III. Approches thérapeutiques ciblées dans l'ANO due à l'AM

La thérapie génique a déjà été appliquée dans le cadre de nombreux processus pathologiques humains (Ramos and Chamberlain, 2015);(Kupatt *et al.*, 2021);(Burney

and Davies, 2012);(Miah *et al.*, 2019);(Allan *et al.*, 2021). La technique consiste à permettre l'expression « normale » d'un gène muté ou absent, ou à réprimer son action en cas de surexpression. Cela nécessite une compréhension approfondie du défaut génétique spécifique qui sous-tend le processus pathologique et donc la validation fonctionnelle, sujet abordé au paragraphe précédent.

A l'heure actuelle, la thérapie génique dans la cadre de l'infertilité masculine a été couronnée de succès dans le modèle murin ayant pour résultat une descendance vivante sans déficit, suite à une thérapie dite « intégrative » permettant de restaurer la spermatogenèse de façon définitive par modification des cellules souches spermatogoniales (**figure 49**). Ceci n'est pas applicable dans la population humaine car elle passe par une modification de la lignée germinale, illégale chez l'homme dans la plupart des pays, pour des raisons éthiques ou eugéniques mais aussi du fait de l'absence du contrôle de l'insertion de matériel génétique dans le génome, même si les dernières évolutions semblent montrer un contrôle de plus en plus spécifique (Naeem *et al.*, 2020)(Coelho *et al.*, 2020). Dans le cadre des ANO par blocage de la maturation spermatiques, la production, même faible et transitoire de spermatozoïdes pourrait, en complément d'un traitement utilisant les techniques AMP déjà disponibles, permettre une parentalité.

Ainsi, parce qu'elle n'affecte qu'un seul organe et qu'une thérapie brève peut être envisagée, et en fonction de la durée de la spermatogenèse (74 jours chez l'homme), l'infertilité masculine est un excellent modèle pour le développement de thérapies correctives et transitoires. Ces bénéfices contrastent fortement avec d'autres maladies héréditaires multisystémiques pour lesquelles le traitement doit être poursuivi tout au long de la vie de la personne atteinte (Bish *et al.*, 2012). En revanche, des contraintes du traitement de l'infertilité masculine sera de trouver des molécules capables de cibler spécifiquement le testicule et de diffuser à travers la barrière hémato-testiculaire à des concentrations adéquates pour corriger le déficit.

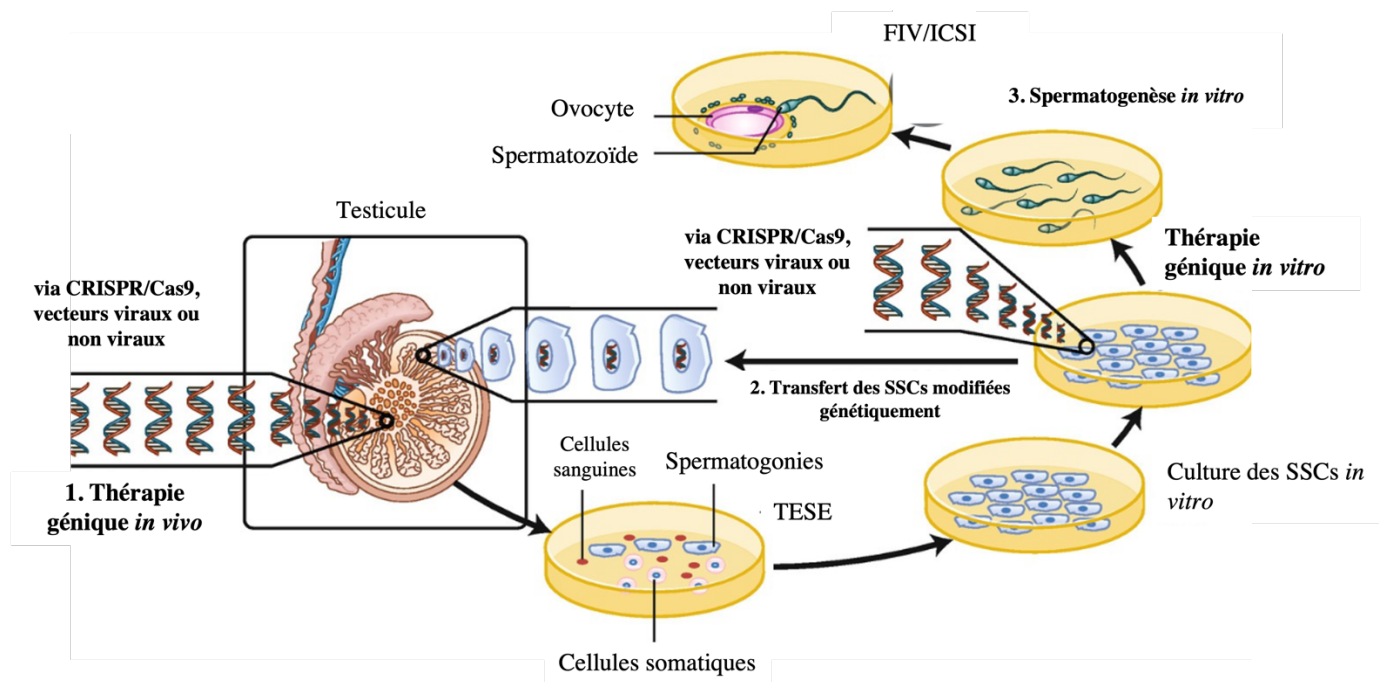


Figure 49 : Thérapie génique *in vitro* ou *in vivo* dans le cadre de l'infertilité masculine.
 (Adaptée de Carrell *et al.*, 2020)

Enfin, les approches thérapeutiques devront passer dans un 1^{er} temps par des expériences chez l'animal pour la mise au point et la validation, bien que la 1^{ère} étape puisse être remplacée par un modèle cellulaire aujourd'hui inexistant.

A. Thérapie génique via CRISPR/Cas9

L'implantation autologue de cellules souches spermatogoniales génétiquement modifiées est aujourd'hui la seule approche de thérapie génique développées en cas d'AM (Wang *et al.*, 2021). Cette stratégie consiste à extraire les cellules souches spermatogoniales, de les cultiver *in vitro* et à les éditer avec le système CRISPR/Cas9 (**figure 49**). Le transfert a été réalisé en injectant les cellules de façon rétrograde dans le rete-testis ou le canal déférent. Les cellules souches spermatogoniales injectées ont alors colonisé rapidement l'épithélium séminifère, aboutissant à des spermatozoïdes fonctionnels et l'obtention d'une descendance masculine indemne du déficit méiotique.

Deux points apparaissent aujourd'hui critiques : (1) le risque d'instabilité épigénétique induit par le stade de la culture *in vitro*, encore inconnu et son lien potentiel avec un risque cancérigène ; (2) les aléas liés à la technologie utilisée pour modifier le génome de ces cellules. En effet, le système CRISPR/Cas9 a le potentiel de provoquer un mosaïcisme embryonnaire ainsi que des effets hors cible aléatoires et imprévisibles qui pourraient être dommageables pour les patients. Des efforts importants ont été fait afin d'améliorer ce système, efforts nécessaires avant d'envisager son application chez l'homme. Des protéines Cas9 modifiées avec une spécificité améliorée pour la zone cible ont été développées, diminuant de façon importante la probabilité d'action hors cible (Lee *et al.*, 2018)(Goldberg *et al.*, 2021).

B. Thérapie génique via des vecteurs viraux

En raison d'une modification du génome et compte tenu des contraintes éthiques et juridiques, diverses options telles que l'utilisation de systèmes de vectorisation,

semblent intéressantes. Parmi plusieurs méthodes de transfection, les SSC ont été transfectées avec le plus de succès par des vecteurs viraux. Cette approche de thérapie génique nécessite l'emploi de plusieurs vecteurs capables de diffuser dans l'organe cible afin d'introduire une copie « normale » du gène muté impliqué dans la pathologie, ou de modifier l'expression du gène muté impliqué dans la pathologie (Kaufmann *et al.*, 2013).

Les rétrovirus (RV) ont été les premiers vecteurs utilisés pour transduire les SSC (Nagano *et al.*, 2000). Cependant, comme les RV ont une efficacité de transduction très faible, les lentivirus (LV) sont plus largement utilisés pour la transduction SSC. Contrairement aux RV conventionnels, les LV peuvent transduire des cellules qui ne se divisent pas, ce qui les rend utiles pour transduire des cellules souches tissulaires qui se divisent rarement ou ne se divisent pas du tout. Du fait d'une intégration possible au sein du génome de l'hôte, les RV et LV ont été délaissées au profit des adénovirus (AV), ne s'intégrant pas dans le génome. De plus, les AV peuvent être concentrés à des titres plus élevés, et transduisent les SSC plus efficacement que les LV (Takehashi *et al.*, 2007). Cependant, le problème majeur avec les AV est leur toxicité, car une exposition continue aux AV induit l'apoptose des cellules souches germinales. Ce problème de toxicité cellulaire a récemment été surmonté par les virus adéno-associés (AAV) (Watanabe *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 2018), présentant moins de toxicité. Leur limite est liée à la taille de l'insert relativement petite (~4,5 kb).

La thérapie génique pour l'infertilité masculine utilisant des vecteurs viraux a réussi dans les modèles murins. Chez des souris dépourvues du gène du ligand *ckit*, la transfection du gène normal dans des cellules de Sertoli a été réalisée en injectant un adénovirus ou un rétrovirus (virus lenti) dans les tubules séminifères. Les souris traitées ont développé de faibles niveaux de spermatogenèse et les spermatozoïdes résultants ont été utilisés avec succès pour l'ICSI et le transgène n'était pas présent dans la descendance. Plusieurs études ont récemment testé le potentiel du virus Sendai (SV) pour la transduction SSC ((Shiromoto *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2019; Shinohara and Kanatsu-Shinohara, 2020). Le SV est un virus à ARN à brin négatif non segmenté de la

famille des Paramyxoviridae (Li *et al.*, 2000; Whelan *et al.*, 2004). Le SV possède plusieurs caractéristiques uniques qui le rendent approprié pour la transduction de gènes, car il possède une large gamme d'hôtes et exprime des transgènes à des niveaux élevés. Étant donné que le SV n'a pas de phase d'ADN dans les cycles de réplication, le génome du virus ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte. Son utilité a été démontrée dans l'étude de Watanabe *et al.*, 2019, dans laquelle le SV a transduit des SSC de souris, de hamster, de lapin et de ouistiti ou des cellules de type SSC pour une longue durée *in vivo* après transplantation xénogénique chez des souris immunodéficientes (Watanabe *et al.*, 2019). Le SV a efficacement transduit des cellules souches germinales cultivées des spermatogonies avec une activité SSC enrichie et maintenu l'expression des gènes pendant au moins 5 mois. Il a également infecté des SSC fraîchement isolées de testicules adultes. Les cellules souches germinales transfectées ont réinitialisé la spermatogenèse après transplantation de spermatogonies dans des tubules séminifères de souris infertiles, suggérant que la transfection de SV n'interfère pas avec la progression de la spermatogenèse (Watanabe *et al.*, 2019). Néanmoins, une étude récente (Shinohara *et al.*, 2020) de la même équipe a démontré que les cellules souches germinales transfectées par SV (Watanabe *et al.*, 2019) ont progressivement perdu leur potentiel spermatogénique malgré la colonisation et la différenciation réussie. Pour cela, via un lentivirus (FV-LV) en utilisant une protéine de fusion (F) (protéine d'enveloppe du virus Sendai (SV) impliquée dans la fusion virion/membrane cellulaire), ils ont montré un transfert de gène efficace dans les SSC. Les FV-LV ont transduit les SSC cultivées plus efficacement que les LV classiques et ceci a permis une restauration de la fertilité. Les FV-LV pouvaient pénétrer non seulement la membrane basale des tubules séminifères, mais également la barrière hémato-testiculaire, ce qui a entraîné une transduction réussie à la fois des cellules germinales et des cellules somatiques testiculaires. Ainsi, les FV-LV fournissent une méthode efficace pour l'analyse fonctionnelle des gènes impliqués dans les SSC et la spermatogenèse.

C. Thérapie génique via des vecteurs non viraux

Les vecteurs viraux permettent une transfection très efficace et représentent la stratégie leader dans le domaine. Cependant, divers inconvénients ont été révélés, tels que la réponse immunitaire, l'inflammation, l'intégration génomique aléatoire et la taille limitée du matériel génétique pouvant être transporté (Günzburg and Salmons, 1995; Guo and Bartlett, 2004). Des supports synthétiques ont été envisagés afin de contourner ces limites. Les approches physico-chimiques ont récemment été proposées pour des systèmes d'administration non viraux tels que les lipides, l'ADN nu, les chromosomes, les plasmides, les polymères cationiques et les complexes conjugués (Uddin, 2007; Remes and Williams, 1992; Sung and Kim, 2019; Kim *et al.*, 2018).

Les méthodes chimiques non virales pour les systèmes de délivrance de gènes, non infectieuses, utilisent des composés synthétiques ou naturels pour former des particules qui facilitent le transfert de gènes dans les cellules. Le vecteur synthétique a la capacité d'interagir électrostatiquement avec l'ARN ou l'ADN et de se lier pour compacter l'information génétique dans l'accommodation de transferts génétiques plus importants (Sung and Kim, 2019). De plus, des vecteurs chimiques non viraux sont capables de pénétrer dans les cellules par endocytose. En général, il existe deux vecteurs non viraux : les liposomes et les polymères. Les vecteurs non viraux à base de liposomes les utilisent pour faciliter la délivrance de gènes par la formation de lipoplexes. Ceux-ci se forment spontanément lorsque l'ADN chargé négativement entre en contact avec des liposomes chargés positivement. Les vecteurs non viraux à base de polymères sont utilisés pour interagir avec l'ADN pour former des polyplexes. Parmi eux, les polymères cationiques (nanoparticules) représentent une classe importante de vecteurs qui répondent à la plupart des exigences pour l'application de délivrance de gènes (Nguyen *et al.*, 2009). Ils permettent (i) de complexer facilement les acides nucléiques en petites particules grâce à des interactions électrostatiques, (ii) de protéger l'ADN ou l'ARN contre la dégradation par les nucléases, et (iii) de les libérer dans la cellule. De plus, d'autres avantages peuvent être cités tels que la taille illimitée

du matériel génétique pouvant être livré, leur production facile suivant les bonnes pratiques de fabrication (BPF), et leur production à bas prix.

Cependant, seuls quelques polymères répondent à tous ces critères. De bons résultats ont été obtenus avec la polyamidoamine (Eichman *et al.*, 2000), le poly(aminoester) (Anderson *et al.*, 2005), la polylysine et ses peptides tidinylés (Midoux *et al.*, 2009), chitosan (Navaneetha Krishnan *et al.*, 2011), le poly(2 Ndiméthylaminoéthyl) méthacrylate (Agarwal *et al.*, 2012), et la polyéthylèneimine (PEI), qui peut présenter une architecture ramifiée ou linéaire (IPEI). Cette dernière est actuellement considérée comme le gold standard grâce à son efficacité de transfection (von Harpe *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2009; Lungwitz *et al.*, 2005; Bertrand *et al.*, 2011). Cependant, elle souffre d'un certain degré de cytotoxicité. En 2017, l'efficacité des ADN étrangers conjugués au complexe BMP (*particules magnétiques bactériennes*) -PEI (BPD) dans la promotion du transfert de gènes médié par les testicules chez la souris a été comparée à celle des ADN étrangers conjugués aux liposomes. Les résultats ont montré que grâce à l'injection dans les testicules, les clusters BPD ont atteint avec succès le noyau et le cytoplasme des cellules germinales et s'expriment dans les testicules des souris fondatrices du transgène. De plus, la motilité des spermatozoïdes récupérés de l'épididyme des souris fondatrices du complexe BPD a été significativement améliorée et préservée (moins de toxicité) par rapport au groupe de souris Lipo-ADN (Wang *et al.*, 2017).

Les modifications chimiques du squelette des PEI ont été largement étudiées pour améliorer à la fois sa viabilité cellulaire et/ou son efficacité de transfection (Dréan *et al.*, 2018; de Oliveira *et al.*, 2021). Une amélioration significative de la biocompatibilité de ces vecteurs a été rapportée, mais l'efficacité de la transfection reste faible par rapport à celle rapportée pour les virus.

Cela souligne cependant qu'il existe un manque d'un vecteur répondant à toutes les exigences de sécurité et d'efficacité de la thérapie génique ; tant qu'un tel vecteur n'est

pas disponible, la thérapie génique pour le traitement de l'infertilité masculine ne peut pas être considérée comme sûre.

Finalement, la maîtrise de ces approches thérapeutiques ciblées devrait permettre le développement d'essais cliniques personnalisés chez des patients ANO dans le but de restaurer de manière transitoire la spermatogenèse fonctionnelle et d'offrir à ces couples la possibilité d'avoir un enfant.

BIBLIOGRAPHIE

- Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, Guerquin J, Gaillard J-C, Armengaud J, Langa F, *et al.* Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat Commun* 2016;**7**:10324.
- Abel MH, Baban D, Lee S, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ. Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol* 2009;**42**:291–303.
- Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, Göb E, Alsheimer M, Benavente R, Boer E de, Novak I, *et al.* Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol* 2009;**187**:185–199.
- Adelman CA, Petrini JHJ. ZIP4H (TEX11) Deficiency in the Mouse Impairs Meiotic Double Strand Break Repair and the Regulation of Crossing Over. *PLOS Genetics* 2008;**4**:e1000042. Public Library of Science.
- Aeckerle N, Eildermann K, Drummer C, Ehmcke J, Schweyer S, Lerchl A, Bergmann M, Kliesch S, Gromoll J, Schlatt S, *et al.* The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod* 2012;**18**:477–488.
- Agarwal S, Roeder GS. Zip3 Provides a Link between Recombination Enzymes and Synaptonemal Complex Proteins. *Cell* 2000;**102**:245–255. Elsevier.
- Agarwal S, Zhang Y, Maji S, Greiner A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Materials Today* 2012;**15**:388–393.
- Ahmed EA, Vaart A van der, Barten A, Kal HB, Chen J, Lou Z, Minter-Dykhouse K, Bartkova J, Bartek J, Boer P de, *et al.* Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair (Amst)* 2007;**6**:1243–1254.
- Al-Awadi SA, Teebi AS, Krishna Murthy DS, Othman G, Sundareshan TS. Klinefelter's syndrome, mosaic 46,XX/46,XY/47,XXY/48,XXXYY/48,XXYY: a case report. *Ann Genet* 1986;**29**:119–121.
- Allan KM, Farrow N, Donnelley M, Jaffe A, Waters SA. Treatment of Cystic Fibrosis: From Gene- to Cell-Based Therapies. *Frontiers in Pharmacology* 2021;**12**:241.
- Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, Poorman-Allen P, Dresser ME, Eddy EM. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996;**104**:414–421.
- Alleva B, Smolikove S. Moving and stopping: Regulation of chromosome movement to promote meiotic chromosome pairing and synapsis. *Nucleus* 2017;**8**:613–624.
- Alphen MM van, Kant HJ van de, Rooij DG de. Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. *Radiat Res* 1988;**113**:473–486.
- Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *Journal of Andrology* 2008;**29**:469–487.
- Amer M, Haggag SE, Moustafa T, Abd El-Naser T, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum Reprod* 1999;**14**:3030–3034.

- An M, Liu Y, Zhang M, Hu K, Jin Y, Xu S, Wang H, Lu M. Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2021;**38**:1997–2005.
- Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β -amino esters). *Molecular Therapy* 2005;**11**:426–434. Elsevier.
- Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, Rooij DG de, Pelt AMM van, Page DC. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:14976–14980.
- Angrist M. You never call, you never write: Why return of “omic” results to research participants is both a good idea and a moral imperative. *Personalized medicine* 2011;**8**:651–657.
- Antao AM, Karapurkar JK, Lee DR, Kim K-S, Ramakrishna S. Disease modeling and stem cell immunoengineering in regenerative medicine using CRISPR/Cas9 systems. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020;**18**:3649–3665.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 2006;**442**:203–207.
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 2007;**318**:761–764.
- Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc’his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 2008;**31**:785–799.
- Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology* 2014;**2**:315–321.
- Aston KI, Conrad DF. A review of genome-wide approaches to study the genetic basis for spermatogenic defects. *Methods Mol Biol* 2013;**927**:397–410.
- Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castané E, Carrell DT. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod* 2010;**25**:1383–1397.
- Auger J, Eustache F, David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Androl* 2000;**10**:358–373. BioMed Central.
- Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, Tolun A. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet* 2014;**51**:239–244.
- Bache I, Assche EV, Cingoz S, Bugge M, Tümer Z, Hjorth M, Lundsteen C, Lespinasse J, Winther K, Niebuhr A, *et al.* An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur J Hum Genet* 2004;**12**:993–1000.
- Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Jayakody I, Taketo MM, Scherer G, Harley VR. Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev Biol* 2008;**314**:71–83.

- Baker PJ, O'Shaughnessy PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 2001;**122**:227–234.
- Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH, O'Shaughnessy PJ. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem* 1999;**260**:911–917.
- Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliott EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, *et al.* Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 1995;**82**:309–319.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, *et al.* Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 1996;**13**:336–342.
- Baltus AE, Menke DB, Hu Y-C, Goodheart ML, Carpenter AE, Rooij DG de, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006;**38**:1430–1434.
- Barchi M, Mahadevaiah S, Di Giacomo M, Baudat F, Rooij DG de, Burgoyne PS, Jasin M, Keeney S. Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:7203–7215.
- Barman HK, Rasal KD, Chakrapani V, Ninawe AS, Vengayil DT, Asrafuzzaman S, Sundaray JK, Jayasankar P. Gene editing tools: state-of-the-art and the road ahead for the model and non-model fishes. *Transgenic Res* 2017;**26**:577–589.
- Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat Microbiol* 2017;**2**:17092.
- Barrios F, Filipponi D, Pellegrini M, Paronetto MP, Di Siena S, Geremia R, Rossi P, De Felici M, Jannini EA, Dolci S. Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *J Cell Sci* 2010;**123**:871–880.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;**23**:1–8.
- Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, Bignon-Topalovic J, Mandelbaum J, Siffroi J-P, Christin-Maitre S, *et al.* Human Male Infertility Associated with Mutations in NR5A1 Encoding Steroidogenic Factor 1. *The American Journal of Human Genetics* 2010;**87**:505–512. Elsevier.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, Massy B de. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 2010;**327**:836–840.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 2000;**6**:989–998.

- Baudat F, Massy B de. Cis- and Trans-Acting Elements Regulate the Mouse Psmb9 Meiotic Recombination Hotspot. *PLoS Genetics* 2007;**3**:e100. Public Library of Science.
- Baudat F, Nicolas A. Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:5213–5218.
- Bellani MA, Romanienko PJ, Cairatti DA, Camerini-Otero RD. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci* 2005;**118**:3233–3245.
- Bellil H, Ghieh F, Hermel E, Mandon-Pepin B, Vialard F. Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic Clin Androl* 2021;**31**:9.
- Ben Khelifa M, Ghieh F, Boudjenah R, Hue C, Fauvert D, Dard R, Garchon HJ, Vialard F. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. *Hum Reprod* 2018;**33**:1034–1037.
- Bergougnoux A, Délétang K, Pommier A, Varilh J, Houriez F, Altieri JP, Koenig M, Férec C, Claustres M, Lalau G, *et al.* Functional characterization and phenotypic spectrum of three recurrent disease-causing deep intronic variants of the CFTR gene. *Journal of Cystic Fibrosis* 2019;**18**:468–475. Elsevier.
- Berkovits BD, Wolgemuth DJ. The Role of the Double Bromodomain-Containing BET Genes During Mammalian Spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2013;**102**:293–326.
- Bertrand E, Gonçalves C, Billiet L, Gomez JP, Pichon C, Cheradame H, Midoux P, Guégan P. Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem Commun* 2011;**47**:12547–12549. The Royal Society of Chemistry.
- Beurden WMO van, Roodnat B, Jong FH de, Mulder E, Molen HJ van der. Hormonal regulation of lh stimulation of testosterone production in isolated leydig cells of immature rats: The effect of hypophysectomy, fsh, and estradiol-17 β . *Steroids* 1976;**28**:847–866.
- Biesecker LG, Burke W, Kohane I, Plon SE, Zimmern R. Next-generation sequencing in the clinic: are we ready? *Nat Rev Genet* 2012;**13**:818–824.
- Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet* 2021;**140**:59–76.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, *et al.* The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 2000;**403**:909–913.
- Bish LT, Sleeper MM, Forbes SC, Wang B, Reynolds C, Singletary GE, Trafny D, Morine KJ, Sanmiguel J, Cecchini S, *et al.* Long-term restoration of cardiac dystrophin expression in golden retriever muscular dystrophy following rAAV6-mediated exon skipping. *Mol Ther* 2012;**20**:580–589.
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N. DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 1992;**69**:439–456. Elsevier.

- Bisig CG, Guiraldelli MF, Kouznetsova A, Scherthan H, Höög C, Dawson DS, Pezza RJ. Synaptonemal complex components persist at centromeres and are required for homologous centromere pairing in mouse spermatocytes. *PLoS Genet* 2012;**8**:e1002701.
- Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 2002;**514**:111–114.
- Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;**88**:622–626.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol* 2007;**176**:741–747.
- Bolcun-Filas E, Speed R, Taggart M, Grey C, Massy B de, Benavente R, Cooke HJ. Mutation of the Mouse Syce1 Gene Disrupts Synapsis and Suggests a Link between Synaptonemal Complex Structural Components and DNA Repair. *PLOS Genetics* 2009;**5**:e1000393. Public Library of Science.
- Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 1994;**23**:85–93.
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 2009;**28**:99–111.
- Börner GV, Kleckner N, Hunter N. Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis. *Cell* 2004;**117**:29–45. Elsevier.
- Boroujeni PB, Sabbaghian M, Totonchi M, Sodeifi N, Sarkardeh H, Samadian A, Sadighi-Gilani MA, Gourabi H. Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assist Reprod* 2018;**22**:185–192.
- Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, Guibourdenche J, Ciampi ML, Massin N, Martinerie L, Picard J-Y, Rey R, Lombès M, *et al.* Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:1818–1825.
- Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004;**431**:96–99.
- Bowles J, Feng C-W, Spiller C, Davidson T-L, Jackson A, Koopman P. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev Cell* 2010;**19**:440–449.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, *et al.* Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006;**312**:596–600.
- Bragt MPA van, Roepers-Gajadien HL, Korver CM, Bogerd J, Okuda A, Eggen BJL, Rooij DG de, Pelt AMM van. Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted

- to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reproduction* 2008;**136**:33–40.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 2007;**128**:1089–1103.
- Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV. Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* 2012;**485**:642–645.
- Broering TJ, Alavattam KG, Sadreyev RI, Ichijima Y, Kato Y, Hasegawa K, Camerini-Otero RD, Lee JT, Andreassen PR, Namekawa SH. BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J Cell Biol* 2014;**205**:663–675.
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, Rooij DG de, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004;**36**:647–652.
- Buhler C, Borde V, Lichten M. Mapping Meiotic Single-Strand DNA Reveals a New Landscape of DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Biology* 2007;**5**:e324. Public Library of Science.
- Burney TJ, Davies JC. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 2012;**5**:29–36.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:207–216.
- Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 2003;**144**:3722–3731.
- Byskov AG, Saxén L. Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. *Dev Biol* 1976;**52**:193–200.
- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 1989;**5**:70–76.
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:507–512.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;**305**:609–613.
- Carmell MA, Girard A, Kant HJG van de, Bourc'his D, Bestor TH, Rooij DG de, Hannon GJ. MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell* 2007;**12**:503–514.
- Carothers AD, Filippi G. Klinefelter's syndrome in Sardinia and Scotland. Comparative studies of parental age and other aetiological factors in 47,XXY. *Hum Genet* 1988;**81**:71–75.
- Carpi A, Sabanegh E, Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2009;**91**:963–970.

- Carrell DT, Aston KI. The search for SNPs, CNVs, and epigenetic variants associated with the complex disease of male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2011;**57**:17–26.
- Carrell DT, Guo J, Aston KI. The Potential of CRISPR/Cas Gene Editing to Correct Male Infertility. In Arafa M, Elbardisi H, Majzoub A, Agarwal A, editors. *Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians* [Internet] 2020;; p. 347–367. Springer International Publishing: Cham Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-37972-8_22.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, *et al*. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002;**296**:922–927.
- Chapelle A de la, Hortling H, Niemi M, Wennström J. XX Sex Chromosomes in a Human Male. *Acta Medica Scandinavica* 1964;**175**:25–38.
- Chassot A-A, Le Rolle M, Jolivet G, Stevant I, Guigonis J-M, Da Silva F, Nef S, Pailhoux E, Schedl A, Ghyselinck NB, *et al*. Retinoic acid synthesis by ALDH1A proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci Adv* 2020;**6**:eaaz1261.
- Chelysheva L, Gendrot G, Vezon D, Doutriaux M-P, Mercier R, Grelon M. Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 2007;**3**:e83. Public Library of Science.
- Chen S-R, Liu Y-X. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* 2015;**149**:R159-167.
- Chen X, Li X, Guo J, Zhang P, Zeng W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;**8**:35.
- Chen YI, Payne AH, Kelch RP. FSH stimulation of Leydig cell function in the hypophysectomized immature rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;**153**:473–475.
- Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey M-C, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, *et al*. Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Congenital Absence of the Vas Deferens. *New England Journal of Medicine* 1995;**332**:1475–1480. Massachusetts Medical Society.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001;**28**:82–86.
- Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, Takamune K, Noce T, Nakatsuji N. Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *PNAS* 2006;**103**:15894–15899. National Academy of Sciences.
- Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of Azoospermia. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:3264.

- Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 2000;**63**:1825–1838.
- Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 1966;**118**:509–524.
- Clermont Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Anat* 1969;**126**:57–71.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;**52**:198–236.
- Clermont Y, Antar M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am J Anat* 1973;**136**:153–165.
- Clermont Y, Leblond CP. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am J Anat* 1959;**104**:237–273.
- Cléry A, Jayne S, Benderska N, Dominguez C, Stamm S, Allain FH-T. Molecular basis of purine-rich RNA recognition by the human SR-like protein Tra2- β 1. *Nat Struct Mol Biol* 2011;**18**:443–450.
- Clifton DK, Bremner WJ. The Effect of Testicular X-irradiation on Spermatogenesis in Man. *Journal of Andrology* 1983;**4**:387–392.
- Coelho MA, De Braekeleer E, Firth M, Bista M, Lukasiak S, Cuomo ME, Taylor BJM. CRISPR GUARD protects off-target sites from Cas9 nuclease activity using short guide RNAs. *Nat Commun* 2020;**11**:4132.
- Cohen PE, Holloway JK. Predicting Gene Networks in Human Oocyte Meiosis. *Biology of Reproduction* 2010;**82**:469–472.
- Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A, Koopman P. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* 2009;**326**:112–120.
- Cooke HJ, Saunders PTK. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 2002;**3**:790–801.
- Cool J, Carmona FD, Szucsik JC, Capel B. Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sex Dev* 2008;**2**:128–133.
- Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, Ferlin A, Foresta C, Jannini EA, Maggi M, *et al.* Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2017;**23**:265–275.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004;**36**:653–659.
- Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. [Genetics of male infertility: the new players]. *Med Sci (Paris)* 2012;**28**:497–502.
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Kozieradzki I, Landers R, *et al.* Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 2003;**300**:1291–1295.

- Cromie GA, Hyppa RW, Cam HP, Farah JA, Grewal SIS, Smith GR. A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genet* 2007;**3**:e141.
- Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annu Rev Genet* 2018;**52**:131–157.
- Daniel K, Lange J, Hached K, Fu J, Anastassiadis K, Roig I, Cooke HJ, Stewart AF, Wassmann K, Jasin M, *et al.* Meiotic homologous chromosome alignment and its surveillance are controlled by mouse *HORMAD1*. *Nat Cell Biol* 2011;**13**:599–610.
- Davies B, Baumann C, Kirchhoff C, Ivell R, Nubbemeyer R, Habenicht U-F, Theuring F, Gottwald U. Targeted Deletion of the Epididymal Receptor HE6 Results in Fluid Dysregulation and Male Infertility. *Molecular and Cellular Biology* 2004;**24**:8642–8648. American Society for Microbiology.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2885–2894.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;**6**:245–250.
- De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, Antony C, Moreira PN, Enright AJ, O'Carroll D. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 2011;**480**:259–263.
- De Vries M, Ramos L, Housein Z, De Boer P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biology Open* 2012;**1**:446–457.
- Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2002;**2**:819–830.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 1998;**94**:387–398.
- Di Persio S, Saracino R, Fera S, Muciaccia B, Esposito V, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, *et al.* Spermatogonial kinetics in humans. *Development* 2017;**144**:3430–3439.
- Diagouraga B, Clément JAJ, Duret L, Kadlec J, Massy B de, Baudat F. PRDM9 Methyltransferase Activity Is Essential for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation at Its Binding Sites. *Mol Cell* 2018;**69**:853–865.e6.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sèle B, Jouk P-S, *et al.* Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007;**39**:661–665.
- Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)* 2015;**14**:479–503.
- DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B. FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development* 2006;**133**:1519–1527.

- Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M. SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 2007;**12**:863–872.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:3264–3268.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;**346**:1258096.
- Dréan M, Debuigne A, Jérôme C, Goncalves C, Midoux P, Rieger J, Guégan P. Poly(N-methylvinylamine)-Based Copolymers for Improved Gene Transfection. *Macromol Biosci* 2018;**18**:e1700353.
- Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction* 2019;**157**:R53–R72.
- Eaker S, Cobb J, Pyle A, Handel MA. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev Biol* 2002;**249**:85–95.
- Edlinger B, Schlögelhofer P. Have a break: Determinants of meiotic DNA double strand break (DSB) formation and processing in plants. *Journal of experimental botany* 2011;**62**:1545–1563.
- Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1981;**141**:408–416.
- Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* 2006;**132**:673–680.
- Ehrmann I, Crichton JH, Gazzara MR, James K, Liu Y, Grellscheid SN, Curk T, Rooij D de, Steyn JS, Cockell S, *et al.* An ancient germ cell-specific RNA-binding protein protects the germline from cryptic splice site poisoning. In Blencowe BJ, Bronner ME, editors. *eLife* 2019;**8**:e39304. eLife Sciences Publications, Ltd.
- Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JJ. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol Today* 2000;**3**:232–245.
- Eildermann K, Aeckerle N, Debowski K, Godmann M, Christiansen H, Heistermann M, Schweyer S, Bergmann M, Kliesch S, Gromoll J, *et al.* Developmental Expression of the Pluripotency Factor Sal-Like Protein 4 in the Monkey, Human and Mouse Testis: Restriction to Premeiotic Germ Cells. *CTO* 2012;**196**:206–220. Karger Publishers.
- Elliott DJ, Best A, Dalgliesh C, Ehrmann I, Grellscheid S. How does Tra2 β protein regulate tissue-specific RNA splicing? *Biochem Soc Trans* 2012;**40**:784–788.
- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PTK, Vogt PH, *et al.* Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *PNAS* 1997;**94**:3848–3853. National Academy of Sciences.
- Elliott DJ, Venables JP, Newton CS, Lawson D, Boyle S, Eperon IC, Cooke HJ. An evolutionarily conserved germ cell-specific hnRNP is encoded by a retrotransposed gene. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2117–2124.

- Endo T, Mikedis MM, Nicholls PK, Page DC, Rooij DG de. Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 2019;**9**:775.
- Enguita-Marruedo A, Sleddens-Linkels E, Ooms M, Geus V de, Wilke M, Blom E, Dohle GR, Looijenga LHJ, Cappellen W van, Baart EB, *et al.* Meiotic arrest occurs most frequently at metaphase and is often incomplete in azoospermic men. *Fertil Steril* 2019;**112**:1059-1070.e3.
- Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2015;**17**:459–470.
- Fang Q, Chen X-L, Zhang L, Li Y-B, Sun T-Z, Yang C-X, Chang J-F, Yang X-M, Sun F. The essential roles of Mps1 in spermatogenesis and fertility in mice. *Cell Death Dis* 2021;**12**:1–13.
- Fawcett DW. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 1956;**2**:403–406.
- Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res* 2018a;**29**:207–214.
- Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research* 2018b;**29**:207–214.
- Feng J, Wu X, Zhang Y, Yang X, Ma G, Chen S, Luo S, Zhang Y. A novel mutation (–195C>A) in the promoter region of CFTR gene is associated with Chinese Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Gene* 2019;**719**:144007.
- Ferlin A, Rocca MS, Vinanzi C, Ghezzi M, Di Nisio A, Foresta C. Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. *Fertil Steril* 2015;**104**:163-169.e1.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 2003;**4**:497–508.
- Flannigan R, Schlegel PN. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2017;**44**:26–37.
- Frost RJA, Hamra FK, Richardson JA, Qi X, Bassel-Duby R, Olson EN. MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:11847–11852.
- Fukuda T, Hedinger C, Groscurth P. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res* 1975;**161**:55–70.
- Fullerton G, Hamilton M, Maheshwari A. Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? *Hum Reprod* 2010;**25**:588–597.
- Gao Y, Lui W-Y. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Regulates Cell Junction Restructuring via Smad-Mediated Repression and Clathrin-Mediated Endocytosis of Nectin-like Molecule 2 (Nectin-2). *PLOS ONE* 2013;**8**:e64316. Public Library of Science.
- Garcia V, Phelps SEL, Gray S, Neale MJ. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 2011;**479**:241–244.

- Garcia-Quevedo L, Blanco J, Sarrate Z, Català V, Bassas L, Vidal F. Hidden mosaicism in patients with Klinefelter's syndrome: implications for genetic reproductive counselling. *Hum Reprod* 2011;**26**:3486–3493.
- Gassei K, Orwig KE. SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PLoS One* 2013;**8**:e53976.
- Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte A-L, *et al.* Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012;**31**:3809–3820.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 2010;**277**:599–604.
- Geremia R, Boitani C, Conti M, Monesi V. RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differ* 1977;**5**:343–355.
- Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO, Petes TD. Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:11383–11390.
- Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet* 2016;**135**:851–867.
- Geyer CB, Inselman AL, Sunman JA, Bornstein S, Handel MA, Eddy EM. A missense mutation in the Capza3 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice. *Dev Biol* 2009;**330**:142–152.
- Ghieh F, Barbotin A-L, Leroy C, Marcelli F, Swierkowsky-Blanchard N, Serazin V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Will whole-genome sequencing become the first-line genetic analysis for male infertility in the near future? *Basic Clin Androl* 2021;**31**:21.
- Giebler M, Greither T, Müller L, Möisinger C, Behre HM. Altered PIWI-LIKE 1 and PIWI-LIKE 2 mRNA expression in ejaculated spermatozoa of men with impaired sperm characteristics. *Asian J Androl* 2018;**20**:260–264.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012;**20**:490–497.
- Gill ME, Hu Y-C, Lin Y, Page DC. Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:7443–7448.
- Ginalski K, Rychlewski L, Baker D, Grishin NV. Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:2305–2310.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006;**442**:199–202.
- Goh G, Choi M. Application of Whole Exome Sequencing to Identify Disease-Causing Variants in Inherited Human Diseases. *Genomics Inform* 2012;**10**:214–219.

- Goldberg GW, Spencer JM, Giganti DO, Camellato BR, Agmon N, Ichikawa DM, Boeke JD, Noyes MB. Engineered dual selection for directed evolution of SpCas9 PAM specificity. *Nat Commun* 2021;**12**:349.
- Goldman AS, Hultén MA. Meiotic analysis by FISH of a human male 46,XY,t(15;20)(q11.2;q11.2) translocation heterozygote: quadrivalent configuration, orientation and first meiotic segregation. *Chromosoma* 1993a;**102**:102–111.
- Goldman ASH, Hultén MA. Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11) (p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *CGR* 1993b;**63**:16–23. Karger Publishers.
- Gomes Fernandes M, He N, Wang F, Van Iperen L, Eguizabal C, Matorras R, Roelen BAJ, Chuva De Sousa Lopes SM. Human-specific subcellular compartmentalization of P-element induced wimpy testis-like (PIWIL) granules during germ cell development and spermatogenesis. *Hum Reprod* 2018;**33**:258–269.
- Gopal S, Rodrigues AL, Dordick JS. Exploiting CRISPR Cas9 in Three-Dimensional Stem Cell Cultures to Model Disease. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2020;**8**:692.
- Gopinathan L, Szmyd R, Low D, Diril MK, Chang H-Y, Coppola V, Liu K, Tessarollo L, Guccione E, Pelt AMM van, *et al.* Emi2 Is Essential for Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep* 2017;**20**:697–708.
- Gou L-T, Kang J-Y, Dai P, Wang X, Li F, Zhao S, Zhang M, Hua M-M, Lu Y, Zhu Y, *et al.* Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis. *Cell* 2017;**169**:1090-1104.e13.
- Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol* 2013;**133**:e11.
- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degan BM, Rokhsar DS, Bartel DP. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 2008;**455**:1193–1197.
- Grove ME, Wolpert MN, Cho MK, Lee SS-J, Ormond KE. Views of Genetics Health Professionals on the Return of Genomic Results. *J Genet Couns* 2014;**23**:531–538.
- Gruchy N, Vialard F, Decamp M, Choiset A, Rossi A, Le Meur N, Moïrot H, Yardin C, Bonnet-Dupeyron MN, Lespinasse J, *et al.* Pregnancy outcomes in 188 French cases of prenatally diagnosed Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 2011;**26**:2570–2575.
- Gu A, Ji G, Shi X, Long Y, Xia Y, Song L, Wang S, Wang X. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod* 2010;**25**:2955–2961.
- Günzburg WH, Salmons B. Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1995;**1**:410–417.
- Guo ZS, Bartlett D. Vaccinia as a vector for gene delivery. *Expert opinion on biological therapy* 2004;**4**:901–917.

- Gurkan H, Aydin F, Kadioglu A, Palanduz S. Investigation of mutations in the synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) gene among azoospermic infertile male patients in the Turkish population. *Andrologia* 2013;**45**:92–100.
- Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**179**:47–74.
- Habu T, Taki T, West A, Nishimune Y, Morita T. The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:470–477.
- Hached K, Xie SZ, Buffin E, Cladière D, Rachez C, Sacras M, Sorger PK, Wassmann K. Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* 2011;**138**:2261–2271.
- Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014;**29**:66–75.
- Hales BF, Grenier L, Lalancette C, Robaire B. Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;**91**:652–665.
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Höög C. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 2006;**119**:4025–4032.
- Hamer G, Novak I, Kouznetsova A, Höög C. Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology* 2008;**69**:333–339.
- Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, *et al.* SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000;**91**:403–407.
- Hansson V, Weddington SC, French FS, McLean W, Smith A, Nayfeh SN, Ritzén EM, Hagenäs L. Secretion and role of androgen-binding proteins in the testis and epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1976;17–33.
- Hao S-L, Ni F-D, Yang W-X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 2019;**706**:201–210.
- Harpe A von, Petersen H, Li Y, Kissel T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J Control Release* 2000;**69**:309–322.
- Hartung F, Puchta H. Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**:1548–1554.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002;**129**:1983–1993.
- Hayashi K, Lopes SMC de S, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovskiy A, Miska EA, *et al.* MicroRNA Biogenesis Is Required for Mouse

- Primordial Germ Cell Development and Spermatogenesis. *PLOS ONE* 2008;**3**:e1738. Public Library of Science.
- Hays E, Majchrzak N, Daniel V, Ferguson Z, Brown S, Hathorne K, La Salle S. Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells. *Andrology* 2017;**5**:299–312.
- Heinlein CA, Chang C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology* 2002;**16**:2181–2187.
- Hempfling AL, Lim SL, Adelson DL, Evans J, O'Connor AE, Qu ZP, Kliesch S, Weidner W, O'Bryan MK, Bergmann M. Expression patterns of HENMT1 and PIWIL1 in human testis: implications for transposon expression. *Reproduction* 2017;**154**:363–374.
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod* 2009;**24**:1704–1716.
- Herrán Y, Gutiérrez-Caballero C, Sánchez-Martín M, Hernández T, Viera A, Barbero JL, Álava E de, Rooij DG de, Suja JÁ, Llano E, *et al.* The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J* 2011;**30**:3091–3105.
- Hibi H, Ohori T, Yamada Y, Honda N, Asada Y. PROBABILITY OF SPERM RECOVERY IN NON-OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIC PATIENTS PRESENTING WITH TESTES VOLUME LESS THAN 10 ml/FSH LEVEL EXCEEDING 20 mIU/ml. *Archives of Andrology* 2005;**51**:225–231. Taylor & Francis.
- Hilscher W, Hilscher B. Kinetics of the male gametogenesis. *Andrologia* 1976;**8**:105–116.
- Hiruma Y, Sacristan C, Pachis ST, Adamopoulos A, Kuijt T, Ubbink M, Castelmur E von, Perrakis A, Kops GJPL. CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* 2015;**348**:1264–1267.
- Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev* 1995;**9**:1728–1739.
- Hopkins J, Hwang G, Jacob J, Sapp N, Bedigian R, Oka K, Overbeek P, Murray S, Jordan PW. Meiosis-specific cohesin component, Stag3 is essential for maintaining centromere chromatid cohesion, and required for DNA repair and synapsis between homologous chromosomes. *PLoS Genet* 2014;**10**:e1004413.
- Horn HF, Kim DI, Wright GD, Wong ESM, Stewart CL, Burke B, Roux KJ. A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 2013;**202**:1023–1039.
- Houston BJ, Conrad DF, O'Bryan MK. A framework for high-resolution phenotyping of candidate male infertility mutants: from human to mouse. *Hum Genet* 2021;**140**:155–182.

- Hsieh C-L, Xia J, Lin H. MIWI prevents aneuploidy during meiosis by cleaving excess satellite RNA. *EMBO J* 2020;**39**:e103614.
- Huang C, Guo T, Qin Y. Meiotic Recombination Defects and Premature Ovarian Insufficiency. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:652407.
- Hu Z, Xia Y, Guo X, Dai J, Li H, Hu H, Jiang Y, Lu F, Wu Y, Yang X, *et al.* A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet* 2012;**44**:183–186.
- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. *Cell Tissue Kinet* 1971;**4**:335–349.
- Hummelen PV, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ. Meiotic Segregation, Recombination, and Gamete Aneuploidy Assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) Reciprocal Translocation Carrier by Three- and Four-Probe Multicolor FISH in Sperm. *The American Journal of Human Genetics* 1997;**61**:651–659.
- Hustedt N, Saito Y, Zimmermann M, Álvarez-Quilón A, Setiaputra D, Adam S, McEwan A, Yuan JY, Olivieri M, Zhao Y, *et al.* Control of homologous recombination by the HROB-MCM8-MCM9 pathway. *Genes Dev* 2019;**33**:1397–1415.
- Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, Nussenzweig A, Camerini-Otero RD, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev* 2011;**25**:959–971.
- Iguchi N, Tobias JW, Hecht NB. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006a;**103**:7712–7717.
- Iguchi N, Yang S, Lamb DJ, Hecht NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 2006b;**43**:382–384.
- Inaba K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* 2003;**20**:1043–1056.
- Ishishita S, Matsuda Y, Kitada K. Genetic evidence suggests that Spata22 is required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Sci Rep* 2014;**4**:6148.
- Izawa D, Pines J. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 2012;**199**:27–37.
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;**183**:302–303.
- Jamsai D, O'Bryan MK. Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl* 2011;**13**:139–151.
- Jan SZ, Jongejan A, Korver CM, Daalen SKM van, Pelt AMM van, Repping S, Hamer G. Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development* 2018;**145**:dev160614.
- Jan SZ, Vormer TL, Jongejan A, Röling MD, Silber SJ, Rooij DG de, Hamer G, Repping S, Pelt AMM van. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development* 2017;**144**:3659–3673.
- Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;**142**:62–65.

- Jeanes A, Wilhelm D, Wilson MJ, Bowles J, McClive PJ, Sinclair AH, Koopman P. Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. *Reproduction* 2005;**130**:509–516.
- Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod* 1998;**13**:1230–1234.
- Ji Z, Gao H, Yu H. CELL DIVISION CYCLE. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 2015;**348**:1260–1264.
- Ji Z, Yao C, Yang C, Huang C, Zhao L, Han X, Zhu Z, Zhi E, Liu N, Zhou Z, *et al.* Novel Hemizygous Mutations of TEX11 Cause Meiotic Arrest and Non-obstructive Azoospermia in Chinese Han Population. *Front Genet* 2021;**12**:741355.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;**337**:816–821.
- Jirásek JE. Genital ducts and external genitalia: development and anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1971;**7**:131–139.
- Joshi M, Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2020;**18**:103.
- Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Hassold T. Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 2004;**81**:205–209.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;**258**:818–821.
- Kan Z, Garrett-Engele PW, Johnson JM, Castle JC. Evolutionarily conserved and diverged alternative splicing events show different expression and functional profiles. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:5659–5666.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004;**429**:900–903.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of Human Seminal Plasma on Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa**Supported by grants from the International Planned Parenthood Federation (to R. Y.) and the Ford Foundation (to A. L.). *Fertility and Sterility* 1979;**31**:321–327.
- Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 1998;**203**:323–333.
- Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:2272–2280.

- Kato Y, Katsuki T, Kokubo H, Masuda A, Saga Y. Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat Commun* 2016;**7**:11272.
- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 1998;**393**:688–692.
- Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013;**5**:1642–1661.
- Keeney S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Current Topics in Developmental Biology* [Internet] 2001;**52**:; p. 1–53. Academic Press.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 1997;**88**:375–384.
- Kerr JB, Sharpe RM. Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology* 1985;**116**:2592–2604.
- Khan MJ, Pollock N, Jiang H, Castro C, Nazli R, Ahmed J, Basit S, Rajkovic A, Yatsenko AN. X-linked ADGRG2 mutation and obstructive azoospermia in a large Pakistani family. *Sci Rep* 2018;**8**:16280.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015;**10**:845–858.
- Kherraf Z-E, Conne B, Amiri-Yekta A, Kent MC, Coutton C, Escoffier J, Nef S, Arnoult C, Ray PF. Creation of knock out and knock in mice by CRISPR/Cas9 to validate candidate genes for human male infertility, interest, difficulties and feasibility. *Mol Cell Endocrinol* 2018;**468**:70–80.
- Kichine E, Msaidie S, Bokilo AD, Ducourneau A, Navarro A, Levy N, Terriou P, Collignon P, Boetsch G, Chiaroni J, *et al.* Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G->T and c.-107G->C do not correlate with male infertility. *J Med Genet* 2008;**45**:255–256.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. *Fed Proc* 1978;**37**:2512–2516.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004;**67**:271–284.
- Kim H, Park HJ, Choi H, Chang Y, Park H, Shin J, Kim J, Lengner CJ, Lee YK, Kim J. Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Reports* 2019;**12**:518–531.
- Kim SW, Nam J-P, Kim S, Sung YK. Recent Development of Bio-Reducible Polymers for Efficient Gene Delivery System. *Journal of Cancer Treatment and Diagnosis* [Internet] 2018;**2**..
- Kleene KC. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 2001;**106**:3–23.
- KLINFELTER HF JR, REIFENSTEIN EC JR, ALBRIGHT F JR. Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased

- Excretion of Follicle-Stimulating Hormone¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1942;**2**:615–627.
- Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou H, Kolodner RD, Kucherlapati R, Pollard JW, Edelman W. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev* 2000;**14**:1085–1097.
- Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013;**155**:27–38.
- Kolas NK, Svetlanov A, Lenzi ML, Macaluso FP, Lipkin SM, Liskay RM, Grealley J, Edelman W, Cohen PE. Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J Cell Biol* 2005;**171**:447–458.
- Kolb BA, Stanczyk FZ, Sokol RZ. Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertil Steril* 2000;**74**:234–238.
- Koopman P, Ashworth A, Lovell-Badge R. The ZFY gene family in humans and mice. *Trends Genet* 1991;**7**:132–136.
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990;**348**:450–452.
- Koscinski I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez de la Calle J, Schmitt F, Ben Khelifa M, Ray PF, Ray P, *et al.* DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:344–350.
- Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev Cell* 2010;**19**:675–686.
- Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *PNAS* 2006;**103**:2647–2652. National Academy of Sciences.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:2474–2479.
- Kousta E, Papathanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones (Athens)* 2010;**9**:218–131.
- Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet* 2017;**136**:637–655.
- Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, Pybus M, Friedrich C, Wyrwoll MJ, Casamonti E, *et al.* Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med* 2020;**22**:1956–1966.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;**74**:679–691.

- Kretser DM de, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin S-Y, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004;**225**:57–64.
- Kumar R, Bourbon H-M, Massy B de. Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev* 2010;**24**:1266–1280.
- Kumar R, Oliver C, Brun C, Juarez-Martinez AB, Tarabay Y, Kadlec J, Massy B de. Mouse REC114 is essential for meiotic DNA double-strand break formation and forms a complex with MEI4. *Life Sci Alliance* 2018;**1**:e201800259.
- Kupatt C, Windisch A, Moretti A, Wolf E, Wurst W, Walter MC. Genome editing for Duchenne muscular dystrophy: a glimpse of the future? *Gene Ther* 2021;**28**:542–548.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, *et al.* Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 2004;**131**:839–849.
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, *et al.* DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 2008;**22**:908–917.
- Kuromori T, Azumi Y, Hayakawa S, Kamiya A, Imura Y, Wada T, Shinozaki K. Homologous chromosome pairing is completed in crossover defective atzip4 mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**370**:98–103.
- Lane S, Kauppi L. Meiotic spindle assembly checkpoint and aneuploidy in males versus females. *Cell Mol Life Sci* 2019;**76**:1135–1150.
- La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, Bourc'his D, Bestor TH, Trasler JM. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Developmental Biology* 2007;**7**:104.
- La Salle S, Palmer K, O'Brien M, Schimenti JC, Eppig J, Handel MA. Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells. *Biol Reprod* 2012;**86**:45.
- La Salle S, Trasler JM. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev Biol* 2006;**296**:71–82.
- Lee JK, Jeong E, Lee J, Jung M, Shin E, Kim Y, Lee K, Jung I, Kim D, Kim S, *et al.* Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun* 2018;**9**:3048.
- Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects†. *Biology of Reproduction* 2017;**97**:522–536.
- Lenz P, Luetjens CM, Kamischke A, Kühnert B, Kennerknecht I, Nieschlag E. Mosaic status in lymphocytes of infertile men with or without Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 2005;**20**:1248–1255.
- Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, *et al.* A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol* 2000;**74**:6564–6569.

- Li X, Sun T, Wang X, Tang J, Liu Y. Restore natural fertility of Kitw/Kitwv mouse with nonobstructive azoospermia through gene editing on SSCs mediated by CRISPR-Cas9. *Stem Cell Res Ther* 2019;**10**:271.
- Libby BJ, Reinholdt LG, Schimenti JC. Positional cloning and characterization of Mei1, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *PNAS* 2003;**100**:15706–15711. National Academy of Sciences.
- Liebe B, Alsheimer M, Höög C, Benavente R, Scherthan H. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell* 2004;**15**:827–837.
- Liebe B, Petukhova G, Barchi M, Bellani M, Braselmann H, Nakano T, Pandita TK, Jasin M, Fornace A, Meistrich ML, *et al.* Mutations that affect meiosis in male mice influence the dynamics of the mid-preleptotene and bouquet stages. *Exp Cell Res* 2006;**312**:3768–3781.
- Lin H, Wang W, Li Y, Chen X, Yang D, Zhang Q. Triggering final oocyte maturation with reduced doses of hCG in IVF/ICSI: a prospective, randomized and controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;**159**:143–147.
- Lin L, Achermann JC. Steroidogenic Factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and Disorders of Testis Development. *SXD* 2008;**2**:200–209. Karger Publishers.
- Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 2008;**322**:1685–1687.
- Lin ZY-C, Hirano T, Shibata S, Seki NM, Kitajima R, Sedohara A, Siomi MC, Sasaki E, Siomi H, Imamura M, *et al.* Gene expression ontogeny of spermatogenesis in the marmoset uncovers primate characteristics during testicular development. *Developmental Biology* 2015;**400**:43–58.
- Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, *et al.* Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 2002;**31**:385–390.
- Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *J Control Release* 2017;**266**:17–26.
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 1998;**20**:377–380.
- Liu T, Huang J. Replication protein A and more: single-stranded DNA-binding proteins in eukaryotic cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016;**48**:665–670.
- Liu X, Winey M. The MPS1 family of protein kinases. *Annu Rev Biochem* 2012;**81**:561–585.
- Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, Sarquella J, Vives A, Ruiz-Castañé E, Oliva R, *et al.* Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet* 2014;**22**:754–761.
- Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, Deursen J van, Nussenzweig A, Paull TT, *et al.* MDC1 maintains genomic stability

- by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 2006;**21**:187–200.
- Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, *et al.* Mutations in NR5A1 Associated with Ovarian Insufficiency. *New England Journal of Medicine* 2009;**360**:1200–1210. Massachusetts Medical Society.
- Loveland KL, Dias V, Meachem S, Rajpert-De Meyts E. The transforming growth factor- β superfamily in early spermatogenesis: potential relevance to testicular dysgenesis. *International Journal of Andrology* 2007;**30**:377–384.
- Lu C, Xu M, Wang R, Qin Y, Wang Y, Wu W, Song L, Wang S, Shen H, Sha J, *et al.* Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermia-associated genes. *Molecular Human Reproduction* 2014a;**20**:178–183.
- Lu C, Xu M, Wang R, Qin Y, Wang Y, Wu W, Song L, Wang S, Shen H, Sha J, *et al.* Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermia-associated genes. *Mol Hum Reprod* 2014b;**20**:178–183.
- Lu Y, Oura S, Matsumura T, Oji A, Sakurai N, Fujihara Y, Shimada K, Miyata H, Tobita T, Noda T, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice†. *Biology of Reproduction* 2019;**101**:501–511.
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;**60**:247–266.
- Luo M, Yang F, Leu NA, Landaiche J, Handel MA, Benavente R, La Salle S, Wang PJ. MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat Commun* 2013;**4**:2788.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994;**77**:481–490.
- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993;**75**:1287–1295.
- Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, Zhu H, Han DY, Harris RA, Coarfa C, Gunaratne PH, *et al.* GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000635.
- Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 Is Required for Differentiation of the Mouse Male Germline1. *Biology of Reproduction* 2008;**79**:696–703.
- Maciejowski J, George KA, Terret M-E, Zhang C, Shokat KM, Jallepalli PV. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* 2010;**190**:89–100.
- MacLean G, Abu-Abed S, Dollé P, Tahayato A, Chambon P, Petkovich M. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative

- expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mechanisms of Development* 2001;**107**:195–201.
- MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 2007;**148**:4560–4567.
- Macqueen A, Hochwagen A. Checkpoint mechanisms: The puppet masters of meiotic prophase. *Trends in cell biology* 2011;**21**:393–400.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, Boer P de, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 2001;**27**:271–276.
- Mäkelä J-A, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev* 2019;**40**:857–905.
- Manic G, Corradi F, Sistigu A, Siteni S, Vitale I. Molecular Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint by Kinases and Phosphatases. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017;**328**:105–161.
- Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, Dennefeld C, Féret B, Vernet N, Codreanu C-A, Chambon P, Ghyselinck NB. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci* 2008;**121**:3233–3242.
- Marquez Y, Höpfler M, Ayatollahi Z, Barta A, Kalyna M. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exons and their role in proteome plasticity. *Genome Res* 2015;**25**:995–1007.
- Marston AL, Wassmann K. Multiple Duties for Spindle Assembly Checkpoint Kinases in Meiosis. *Front Cell Dev Biol* 2017;**5**:109.
- Martínez J, Bonache S, Carvajal A, Bassas L, Larriba S. Mutations of SYCP3 are rare in infertile Spanish men with meiotic arrest. *Fertil Steril* 2007;**88**:988–989.
- Mateo S de, Sassone-Corsi P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: role of the Germ Granule. *Semin Cell Dev Biol* 2014;**29**:84–92.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *PNAS* 1993;**90**:3368–3372. National Academy of Sciences.
- McKim KS, Hayashi-Hagihara A. mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev* 1998;**12**:2932–2942.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, Kretser DM de, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007;**22**:2–16.
- Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, Kretser DM de, Loveland KL. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000;**220**:225–237.
- Meikar O, Ros MD, Korhonen H, Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* 2011;**142**:195–209. BioScientifica.

- Meistrich M, Hess R. Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2013;**927**:299–307.
- Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J. The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum Mol Genet* 2002;**11**:1647–1658.
- Menees TM, Ross-MacDonald PB, Roeder GS. MEI4, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis. *Mol Cell Biol* 1992;**12**:1340–1351.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, Rooij DG de, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000;**287**:1489–1493.
- Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;**11**:31–46.
- Miah KM, Hyde SC, Gill DR. Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 2019;**13**:709–725.
- Midoux P, Pichon C, Yaouanc J-J, Jaffrès P-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* 2009;**157**:166–178.
- Mikuz G. [The multitasking Sertoli cell]. *Pathologie* 2019;**40**:318–324.
- Miraghazadeh A, Sadighi Gilani MA, Reihani-Sabet F, Ghaheri A, Borjian Boroujeni P, Zamanian M. Detection of Partial AZFc Microdeletions in Azoospermic Infertile Men Is Not Informative of MicroTESE Outcome. *Int J Fertil Steril* 2019;**12**:298–302.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 1997;**124**:1653–1664.
- Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, *et al.* Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *PNAS* 2016;**113**:7704–7710. National Academy of Sciences.
- Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* 2015;**350**:442–445.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 2002;**115**:1611–1622.
- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 2007;**120**:1017–1027.
- Mohr S, Stryker JM, Lambowitz AM. A DEAD-Box Protein Functions as an ATP-Dependent RNA Chaperone in Group I Intron Splicing. *Cell* 2002;**109**:769–779. Elsevier.

- Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, Marzi L, Cohen-Solal A, Georg I, Klattig J, *et al.* The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* 2009;**136**:1813–1821.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, *et al.* Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev* 2013;**27**:1680–1692.
- Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005;**130**:761–781.
- Moretti E, Anichini C, Sartini B, Collodel G. Sperm ultrastructure and meiotic segregation in an infertile 47, XYY man. *Andrologia* 2007;**39**:229–234.
- Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K, Han M, Watanabe Y. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *Journal of Cell Biology* 2012;**198**:165–172.
- Moses MJ. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 1956;**2**:215–218.
- Muller S, Pandey RR, Pillai RS. Les piARN forgent un système immunitaire pour le génome. *Med Sci (Paris)* 2013;**29**:487–494. Éditions EDK, Groupe EDP Sciences.
- Muñoz X, Navarro M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Association of PIWIL4 genetic variants with germ cell maturation arrest in infertile Spanish men. *Asian J Androl* 2014;**16**:931–933.
- Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, Ahmad I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells* 2020;**9**:1608.
- Nagano M, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Lett* 2000;**475**:7–10.
- Nakamura S, Miyado M, Saito K, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Okada H, *et al.* Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology* 2017;**5**:824–831.
- Navaneetha Krishnan S, Ambigapathi M, Sekaran S, Devi M, Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International journal of biological macromolecules* 2011;**48**:234–238.
- Navarro-Costa P. Sex, rebellion and decadence: The scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012;**1822**:1851–1863.
- Nel-Themaat L, Jang C-W, Stewart MD, Akiyama H, Viger RS, Behringer RR. Sertoli cell behaviors in developing testis cords and postnatal seminiferous tubules of the mouse. *Biol Reprod* 2011;**84**:342–350.
- Nel-Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer RR. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice. *Dev Dyn* 2009;**238**:1100–1110.

- Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016;**59**:10–26.
- Nguyen DN, Green JJ, Chan JM, Longer R, Anderson DG. Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination. *Adv Mater* 2009;**21**:847–867.
- Nguyen N, Judd LM, Kalantzis A, Whittle B, Giraud AS, Driel IR van. Random mutagenesis of the mouse genome: a strategy for discovering gene function and the molecular basis of disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;**300**:G1–G11.
- Niederberger CS, Shubhada S, Kim SJ, Lamb DJ. Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis. *World J Urol* 1993;**11**:120–128.
- Noguchi J, Ozawa M, Nakai M, Somfai T, Kikuchi K, Kaneko H, Kunieda T. Affected homologous chromosome pairing and phosphorylation of testis specific histone, H2AX, in male meiosis under FKBP6 deficiency. *J Reprod Dev* 2008;**54**:203–207.
- Norris DO, Carr JA. Chapter 10 - The endocrinology of mammalian reproduction. In Norris DO, Carr JA, editors. *Vertebrate Endocrinology (Sixth Edition)* [Internet] 2021;; p. 315–369. Academic Press: San Diego Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128200933000101>.
- Nsota Mbango J-F, Coutton C, Arnoult C, Ray PF, Touré A. Genetic causes of male infertility: snapshot on morphological abnormalities of the sperm flagellum. *Basic Clin Androl* 2019;**29**:2.
- Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:504–513.
- Oakberg EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec* 1971;**169**:515–531.
- Oakberg EF. Effects of radiation on the testis. *Endocrinology* 1974;233–243. United States.
- Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007a;**307**:368–379.
- Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007b;**307**:368–379.
- Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 1994;**15**:1–8.
- Obermann H, Samalecos A, Osterhoff C, Schröder B, Heller R, Kirchhoff C. HE6, a two-subunit heptahelical receptor associated with apical membranes of efferent and epididymal duct epithelia. *Mol Reprod Dev* 2003;**64**:13–26.
- O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation. *Spermatogenesis* 2011;**1**:14–35. Taylor & Francis.
- Offenberg HH, Schalk JA, Meuwissen RL, Aalderen M van, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 1998;**26**:2572–2579.

- Okabe M. Mechanism of Fertilization: A Modern View. *Exp Anim* 2014;**63**:357–365.
- Okubo K, Ogura K, Ichioka K, Terada N, Matsuta Y, Yoshimura K, Arai Y, Honda T, Umeoka K, Nakahori T, *et al.* [Testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia: results with conventional and microsurgical techniques]. *Hinyokika Kyo* 2002;**48**:275–280.
- Oliveira FA de, Albuquerque LJC, Delecourt G, Bennevault V, Guégan P, Giacomelli FC. Current Designs of Polymeric Platforms towards the Delivery of Nucleic Acids inside the Cells with Focus on Polyethylenimine. *Curr Gene Ther* 2021;
- Oliver-Bonet M, Turek PJ, Sun F, Ko E, Martin RH. Temporal progression of recombination in human males. *Molecular Human Reproduction* 2005;**11**:517–522.
- Ormondroyd E, Mackley MP, Blair E, Craft J, Knight JC, Taylor JC, Taylor J, Watkins H. “Not pathogenic until proven otherwise”: perspectives of UK clinical genomics professionals toward secondary findings in context of a Genomic Medicine Multidisciplinary Team and the 100,000 Genomes Project. *Genet Med* 2018;**20**:320–328.
- Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982;**203**:485–492.
- O’Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 2006a;**29**:90–95; discussion 105-108.
- O’Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell – differentiation, function and regulation. *International Journal of Andrology* 2006b;**29**:90–95.
- O’Shaughnessy PJ, Fowler PA. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 2011;**141**:37–46.
- Ostrer H, Huang HY, Masch RJ, Shapiro E. A cellular study of human testis development. *Sex Dev* 2007;**1**:286–292.
- Ottesen AM, Aksglaede L, Garn I, Tartaglia N, Tassone F, Gravholt CH, Bojesen A, Sørensen K, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, *et al.* Increased number of sex chromosomes affects height in a nonlinear fashion: A study of 305 patients with sex chromosome aneuploidy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2010;**152A**:1206–1212.
- Oud MS, Ramos L, O’Bryan MK, McLachlan RI, Okutman Ö, Viville S, Vries PF de, Smeets DFCM, Lugtenberg D, Hehir-Kwa JY, *et al.* Validation and application of a novel integrated genetic screening method to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Hum Mutat* 2017;**38**:1592–1605.
- Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers LELM, Ramos L, Veltman JA. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Human Reproduction* 2019;**34**:932–941.
- Pachis ST, Kops GJPL. Leader of the SAC: molecular mechanisms of Mps1/TTK regulation in mitosis. *Open Biol* 2018;**8**:180109.
- Page SL, Hawley RS. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;**20**:525–558.

- Pagin A, Bergougnoux A, Girodon E, Reboul M-P, Willoquaux C, Kesteloot M, Raynal C, Bienvenu T, Humbert M, Lalau G, *et al.* Novel ADGRG2 truncating variants in patients with X-linked congenital absence of vas deferens. *Andrology* 2020;**8**:618–624.
- Palmer N, Talib SZA, Kaldis P. Diverse roles for CDK-associated activity during spermatogenesis. *FEBS Letters* 2019;**593**:2925–2949.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, Zhu X, Neale MJ, Jasin M, Socci ND, *et al.* A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* 2011;**144**:719–731.
- Paronetto MP, Sette C. Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 2010;**33**:2–12.
- Parvanov ED, Petkov PM, Paigen K. Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* 2010;**327**:835.
- Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, Monteil L, Gaston V, Bujan L, Courtade-Saïdi M, *et al.* Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:437–442.
- Petes TD. Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:360–369.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;**365**:1663–1678.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;**20**:207–211.
- Piprek RP. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol* 2010;**54**:779–786.
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1998;**1**:697–705.
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:5354–5365.
- Plug AW, Peters AH, Xu Y, Keegan KS, Hoekstra MF, Baltimore D, Boer P de, Ashley T. ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nat Genet* 1997;**17**:457–461.
- Powers NR, Parvanov ED, Baker CL, Walker M, Petkov PM, Paigen K. The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLoS Genet* 2016;**12**:e1006146.
- Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2014;**59**:5–15.

- Rabinovici J, Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 1990;**11**:532–557.
- Rahman MS, Pang M. New Biological Insights on X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;**7**:388.
- Raju GAR, Chavan R, Deenadayal M, Gunasheela D, Gutgutia R, Haripriya G, Govindarajan M, Patel NH, Patki AS. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyperstimulation. *J Hum Reprod Sci* 2013;**6**:227–234.
- Ramaswamy S, Razack BS, Roslund RM, Suzuki H, Marshall GR, Rajkovic A, Plant TM. Spermatogonial SOHLH1 nucleocytoplasmic shuttling associates with initiation of spermatogenesis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Molecular Human Reproduction* 2014;**20**:350–357.
- Ramos J, Chamberlain JS. Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs* 2015;**3**:1255–1266.
- Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996;**347**:1290–1293.
- Remes A, Williams DF. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* 1992;**13**:731–743.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 2004;**6**:555–562.
- Ribeiro J, Dupaigne P, Petrillo C, Ducrot C, Duquenne C, Veaute X, Saintomé C, Busso D, Guerois R, Martini E, *et al*. The meiosis-specific MEIOB–SPATA22 complex cooperates with RPA to form a compacted mixed MEIOB/SPATA22/RPA/ssDNA complex. *DNA Repair* 2021;**102**:103097.
- Robay A, Abbasi S, Akil A, El-Bardisi H, Arafa M, Crystal RG, Fakhro KA. A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. *Arab J Urol* 2018;**16**:53–64.
- Robert T, Nore A, Brun C, Maffre C, Crimi B, Bourbon H-M, Massy B de. The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* 2016;**351**:943–949.
- Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcelli F, Rigot J-M, Mitchell V. [Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann Pathol* 2010;**30**:182–195.
- Robinson P, Krawitz P, Mundlos S. Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clinical Genetics* 2011;**80**:127–132.
- Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 2000;**16**:395–403.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;**273**:5858–5868.

- Rohayem J, Fricke R, Czeloth K, Mallidis C, Wistuba J, Krallmann C, Zitzmann M, Kliesch S. Age and markers of Leydig cell function, but not of Sertoli cell function predict the success of sperm retrieval in adolescents and adults with Klinefelter's syndrome. *Andrology* 2015;**3**:868–875.
- Rohozinski J, Lamb DJ, Bishop CE. UTP14c is a recently acquired retrogene associated with spermatogenesis and fertility in man. *Biol Reprod* 2006;**74**:644–651.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 2013;**28**:462–470.
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 2000;**6**:975–987.
- Rooij DG de. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet* 1973;**6**:281–287.
- Rooij DG de, Boer P de. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* 2003;**103**:267–276.
- Rooij DG de, Griswold MD. Questions About Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *Journal of Andrology* 2012;**33**:1085–1095.
- Roovers EF, Rosenkranz D, Mahdipour M, Han C-T, He N, Chuva de Sousa Lopes SM, Westerlaken LAJ van der, Zischler H, Butter F, Roelen BAJ, *et al.* Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. *Cell Rep* 2015;**10**:2069–2082.
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, Rooij DG de, Burgoyne PS, Turner JMA. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 2010;**20**:2117–2123.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010;**205**:117–131.
- Sachs C, Robinson BD, Andres Martin L, Webster T, Gilbert M, Lo H-Y, Rafii S, Ng CK, Seandel M. Evaluation of candidate spermatogonial markers ID4 and GPR125 in testes of adult human cadaveric organ donors. *Andrology* 2014;**2**:607–614.
- Saelaert M, Mertes H, Moerenhout T, De Baere E, Devisch I. Criteria for reporting incidental findings in clinical exome sequencing – a focus group study on professional practices and perspectives in Belgian genetic centres. *BMC Medical Genomics* 2019;**12**:
- Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* 2007;**21**:1603–1608.
- Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 2012;**139**:15–31.
- Salihu HM, Aliyu MH. Sperm retrieval in infertile males: Comparison between testicular sperm extraction and testicular sperm aspiration techniques. *Wien Klin Wochenschr* 2003;**115**:370–379.

- Santos T de los, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J, Hollingsworth NM. The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* 2003;**164**:81–94.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:9275–9282.
- Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germline. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:182–195.
- Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, Tajima A. Replication Study and Meta-Analysis of Human Nonobstructive Azoospermia in Japanese Populations1. *Biology of Reproduction* [Internet] 2013;**88**.
- Schimenti J. Synapsis or silence. *Nat Genet* 2005;**37**:11–13.
- Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999a;**14**:131–135.
- Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999b;**14**:131–135.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 2000;**127**:65–73.
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet* 2011;**7**:e1002088.
- Sciurano RB, Luna Hisano CV, Rahn MI, Brugo Olmedo S, Rey Valzacchi G, Coco R, Solari AJ. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Human Reproduction* 2009;**24**:2353–2360.
- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997;**88**:265–275.
- Sehorn MG, Sung P. Meiotic recombination: an affair of two recombinases. *Cell Cycle* 2004;**3**:1375–1377.
- Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W, Reik W. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 2012;**48**:849–862.
- Sengupta P, Borges E, Dutta S, Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum Exp Toxicol* 2018;**37**:247–255. SAGE Publications Ltd STM.
- Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 2001;**24**:306–310.
- Sha Y, Liu W, Wei X, Zhu X, Luo X, Liang L, Guo T. Biallelic mutations in Sperm flagellum 2 cause human multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) phenotype. *Clinical Genetics* 2019;**96**:385–393.

- Sha Y, Zheng L, Ji Z, Mei L, Ding L, Lin S, Wang X, Yang X, Li P. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Med Genet* 2018;**19**:63.
- Shang Y, Zhu F, Wang L, Ouyang Y-C, Dong M-Z, Liu C, Zhao H, Cui X, Ma D, Zhang Z, *et al.* Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. In Watt FM, editor. *eLife* 2017;**6**:e28199. eLife Sciences Publications, Ltd.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003a;**125**:769–784. Society for Reproduction and Fertility.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003b;**125**:769–784.
- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001;**121**:655–666.
- Shima Y, Matsuzaki S, Miyabayashi K, Otake H, Baba T, Kato S, Huhtaniemi I, Morohashi K. Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. *Molecular Endocrinology* 2015;**29**:1581–1593.
- Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, *et al.* Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Mol Endocrinol* 2013;**27**:63–73.
- Shinohara T, Kanatsu-Shinohara M. Transgenesis and Genome Editing of Mouse Spermatogonial Stem Cells by Lentivirus Pseudotyped with Sendai Virus F Protein. *Stem Cell Reports* 2020;**14**:447–461.
- Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, *et al.* GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA* 2013;**19**:803–810.
- Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, *et al.* The TDRD9-MIWI2 Complex Is Essential for piRNA-Mediated Retrotransposon Silencing in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell* 2009;**17**:775–787. Elsevier.
- Sibley CR, Blazquez L, Ule J. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet* 2016;**17**:407–421.
- Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, Carani C, Meschede D, Behre HM, Horst J, *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.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf A-M, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;**346**:240–244.

- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;**423**:825–837.
- Skinner MK, Fritz IB. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;**82**:114–118.
- Smagulova F, Gregoretto IV, Brick K, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV. Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature* 2011;**472**:375–378.
- Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 2012;**484**:339–344.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2008;**109**:323–330.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;**20**:399–407.
- Soper SFC, Heijden GW van der, Hardiman TC, Goodheart M, Martin SL, Boer P de, Bortvin A. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev Cell* 2008;**15**:285–297.
- Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Bouffant RL, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J, *et al.* MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. *PLOS Genetics* 2013;**9**:e1003784. Public Library of Science.
- Stanzione M, Baumann M, Papanikos F, Dereli I, Lange J, Ramlal A, Tränkner D, Shibuya H, Massy B de, Watanabe Y, *et al.* Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IHO1 (CCDC36) in mice. *Nat Cell Biol* 2016;**18**:1208–1220.
- Stern L, Kleene KC, Gold B, Hecht NB. Gene expression during mammalian spermatogenesis. III. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Exp Cell Res* 1983;**143**:247–255.
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. SYCP3 mutations are uncommon in patients with azoospermia. *Fertil Steril* 2005;**84**:1019–1020.
- Strikoudis A, Cieślak A, Loffredo L, Chen Y-W, Patel N, Saqi A, Lederer DJ, Snoeck H-W. Modeling of Fibrotic Lung Disease Using 3D Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 2019;**27**:3709–3723.e5.
- Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol* 1999;**161**:112–116.

- Subramanian VV, Hochwagen A. The Meiotic Checkpoint Network: Step-by-Step through Meiotic Prophase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;**6**:a016675.
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 2001;**154**:925–936.
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 2004;**279**:27816–27823.
- Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* 1997;**272**:7940–7945.
- Sung Y, Kim S. Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomater Res* 2019;**23**:8.
- Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, Rogers N, Knowler K, Rowley L, Eyre H, *et al.* Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;**121**:328–341.
- Suzuki A, Saga Y. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 2008;**22**:430–435.
- Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development* 2007;**134**:77–83.
- Sweeney C, Murphy M, Kubelka M, Ravnik SE, Hawkins CF, Wolgemuth DJ, Carrington M. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* 1996;**122**:53–64.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 1983;**33**:25–35.
- Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:2596–2601.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, *et al.* Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 2008;**453**:534–538.
- Tanaka H, Iguchi N, Toyama Y, Kitamura K, Takahashi T, Kaseda K, Maekawa M, Nishimune Y. Mice Deficient in the Axonemal Protein Tektin-t Exhibit Male Infertility and Immotile-Cilium Syndrome Due to Impaired Inner Arm Dynein Function. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:7958–7964.
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 2000;**14**:841–853.
- Tang L, Zeng W, Clark RK, Dobrinski I. Characterization of the porcine testis-expressed gene 11 (Tex11). *Spermatogenesis* 2011;**1**:147–151.

- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB. RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 1999;**147**:207–220.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991;**6**:811–816.
- 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.
- Touré A, Martinez G, Kherraf Z-E, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet* 2021;**140**:21–42.
- Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? *Hum Reprod* 1999;**14 Suppl 1**:71–81.
- Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2017;**5**:544–553. Elsevier.
- Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997;**12**:80–86.
- Tsai M-C, Cheng Y-S, Lin T-Y, Yang W-H, Lin Y-M. Clinical characteristics and reproductive outcomes in infertile men with testicular early and late maturation arrest. *Urology* 2012;**80**:826–832.
- Tsubouchi T, Zhao H, Roeder GS. The meiosis-specific zip4 protein regulates crossover distribution by promoting synaptonemal complex formation together with zip2. *Dev Cell* 2006;**10**:809–819.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 2003;**301**:1239–1241.
- Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K, Koga M, Takeyama M, Fujioka H, Okuyama A. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* 2002;**17**:2924–2929.
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:6236–6240.
- Tu C, Nie H, Meng L, Yuan S, He W, Luo A, Li H, Li W, Du J, Lu G, *et al.* Identification of DNAH6 mutations in infertile men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Sci Rep* 2019;**9**:15864.
- Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 2007;**134**:1823–1831.
- Turner JMA, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GVR, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng C-X. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 2004;**14**:2135–2142.

- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Ellis PJI, Mitchell MJ, Burgoyne PS. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental Cell* 2006;**10**:521–529.
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng C-X, Burgoyne PS. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 2005;**37**:41–47.
- Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A. Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Med Genet* 2018;**30**:12–20.
- Tyler-Smith C, Krausz C. The will-o'-the-wisp of genetics--hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med* 2009;**360**:925–927.
- Uddin SN. Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007;**2**:58–67.
- Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 2006;**313**:320–324.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction* 1996;**11**:1–26.
- Venables JP, Cooke HJ. Lessons from knockout and transgenic mice for infertility in men. *J Endocrinol Invest* 2000;**23**:584–591.
- Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ, Eperon IC. RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:685–694.
- Venables JP, Eperon I. The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr Opin Genet Dev* 1999;**9**:346–354.
- Vernet N, Condrea D, Mayere C, Féret B, Klopfenstein M, Magnant W, Alunni V, Teletin M, Souali-Crespo S, Nef S, et al. Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci Adv* 2020;**6**:eaaz1139.
- Vernet N, Mahadevaiah SK, Rooij DG de, Burgoyne PS, Ellis PJI. Zfy genes are required for efficient meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in spermatocytes. *Hum Mol Genet* 2016;**25**:5300–5310.
- Vialard F, Bailly M, Bouazzi H, Albert M, Pont JC, Mendes V, Bergere M, Gomes DM, Mazancourt P de, Selva J. The High Frequency of Sperm Aneuploidy in Klinefelter Patients and in Nonobstructive Azoospermia Is Due to Meiotic Errors in Euploid Spermatocytes. *Journal of Andrology* 2012;**33**:1352–1359.
- Vihko KK, LaPolt PS, Nishimori K, Hsueh AJ. Stimulatory effects of recombinant follicle-stimulating hormone on Leydig cell function and spermatogenesis in immature hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1991;**129**:1926–1932.
- Vloeberghs V, Verheyen G, Haentjens P, Goossens A, Polyzos NP, Tournaye H. How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod* 2015;**30**:1790–1796.

- Vloeberghs V, Verheyen G, Santos-Ribeiro S, Staessen C, Verpoest W, Gies I, Tournaye H. Is genetic fatherhood within reach for all azoospermic Klinefelter men? *PLoS One* 2018;**13**:e0200300.
- Vog PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, *et al.* Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996;**5**:933–943.
- Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992;**89**:491–496.
- Vorona E, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, Endocrinological, and Epigenetic Features of the 46,XX Male Syndrome, Compared with 47,XXY Klinefelter Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;**92**:3458–3465.
- Vrielynck N, Chambon A, Vezon D, Pereira L, Chelysheva L, De Muyt A, Mézard C, Mayer C, Grelon M. A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* 2016;**351**:939–943.
- Vries FAT de, Boer E de, Bosch M van den, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu J-G, Zeeland AA van, Heyting C, Pastink A. Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 2005;**19**:1376–1389.
- Vries SS de, Baart EB, Dekker M, Siezen A, Rooij DG de, Boer P de, Riele H te. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev* 1999;**13**:523–531.
- Wang C, Sun G, Wang Y, Kong N, Chi Y, Yang L, Xin Q, Teng Z, Wang X, Wen Y, *et al.* Bacterial magnetic particles improve testes-mediated transgene efficiency in mice. *Drug Deliv* 2017;**24**:651–659.
- Wang PJ. X chromosomes, retrogenes and their role in male reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2004;**15**:79–83.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 2001;**27**:422–426.
- Wang W, Yang Y, Gao Y, Xu Q, Wang F, Zhu S, Old W, Resing K, Ahn N, Lei M, *et al.* Structural and mechanistic insights into Mps1 kinase activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009;**13**:1679–1694.
- Wang W, Zhang X-H, Wang W-H, Liu Y-L, Zhao L-H, Xue S-L, Yang K-H. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:901–910.
- Wang Y-H, Yan M, Zhang X, Liu X-Y, Ding Y-F, Lai C-P, Tong M-H, Li J-S. Rescue of male infertility through correcting a genetic mutation causing meiotic arrest in spermatogonial stem cells. *Asian J Androl* 2021;
- Wartenberg H. Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia." *Andrologia* 1976;**8**:117–130.

- WARTENBERG H. Differentiation and development of the testes. *The testis* 1989;67–118. Raven Press Ltd.
- Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. Adeno-associated virus-mediated delivery of genes to mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2017;**96**:221–231.
- Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. In Vivo Genetic Manipulation of Spermatogonial Stem Cells and Their Microenvironment by Adeno-Associated Viruses. *Stem Cell Reports* 2018;**10**:1551–1564.
- Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Sendai virus-mediated transduction of mammalian spermatogonial stem cells†. *Biol Reprod* 2019;**100**:523–534.
- Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, *et al.* MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell* 2011;**20**:364–375.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, *et al.* Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 2008;**453**:539–543.
- Wen Q, Tang EI, Xiao X, Gao Y, Chu DS, Mruk DD, Silvestrini B, Cheng CY. Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis—the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue Barriers* 2016;**4**:e1265042. Taylor & Francis.
- Western PS, Miles DC, Bergen JA van den, Burton M, Sinclair AH. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 2008;**26**:339–347.
- Whelan SPJ, Barr JN, Wertz GW. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;**283**:61–119.
- White JA, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam SP, Jones G, Petkovich M. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:6403–6408.
- Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 1982;**20**:9–10.
- Winter JP de, Vanderstichele HM, Timmerman MA, Blok LJ, Themmen AP, Jong FH de. Activin is produced by rat Sertoli cells in vitro and can act as an autocrine regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology* 1993;**132**:975–982.
- Winters T, McNicoll F, Jessberger R. Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO J* 2014;**33**:1256–1270.
- Wu S, Yan M, Ge R, Cheng CY. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. *Trends Mol Med* 2020;**26**:215–231.
- Wu Y-N, Chen K-C, Wu C-C, Lin Y-H, Chiang H-S. SLC9A3 Affects Vas Deferens Development and Associates with Taiwanese Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *BioMed Research International* 2019;**2019**:e3562719. Hindawi.

- Wu Y-N, Lin Y-H, Chiang H-S. 758 - SLC9A3 is a novel pathogenic gene in Taiwanese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *European Urology Supplements* 2018;**17**:e1092.
- Xi R, Kim T-M, Park PJ. Detecting structural variations in the human genome using next generation sequencing. *Brief Funct Genomics* 2010;**9**:405–415.
- Xu H, Beasley MD, Warren WD, Horst GTJ van der, McKay MJ. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* 2005;**8**:949–961.
- Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng C-X, Furth PA. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 2003;**130**:2001–2012.
- Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol* 2011;**192**:781–795.
- Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**382**:498–508.
- Yang B, Wang J, Zhang W, Pan H, Li T, Liu B, Li H, Wang B. Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology* 2017;**5**:954–957.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 2006;**173**:497–507.
- Yang F, Gell K, Heijden GW van der, Eckardt S, Leu NA, Page DC, Benavente R, Her C, Höög C, McLaughlin KJ, *et al.* Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev* 2008;**22**:682–691.
- Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, Brown LG, Rozen S, Page DC, Wang PJ. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:1198–1210.
- Yarali H, Polat M, Bozdogan G, Gunel M, Alpas I, Esinler I, Dogan U, Tiras B. TESE-ICSI in patients with non-mosaic Klinefelter syndrome: a comparative study. *Reprod Biomed Online* 2009;**18**:756–760.
- Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, *et al.* X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med* 2015;**372**:2097–2107.
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1998;**1**:707–718.
- Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 2006;**133**:1495–1505.
- Young SAM, Miyata H, Satouh Y, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. *J Cell Sci* 2016;**129**:4379–4387.

- Young SAM, Miyata H, Satouh Y, Kato H, Nozawa K, Isotani A, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis. *Int J Mol Sci* 2015;**16**:24732–24750.
- Yu X-C, Li M-J, Cai F-F, Yang S-J, Liu H-B, Zhang H-B. A new TEX11 mutation causes azoospermia and testicular meiotic arrest. *Asian J Androl* 2021;**23**:510–515.
- Yuan L, Liu J-G, Hoja M-R, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 2002;**296**:1115–1118.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 2000;**5**:73–83.
- Yuan P, Liang ZK, Liang H, Zheng LY, Li D, Li J, Zhang J, Tian J, Lai LH, Zhang K, et al. Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles. *Andrology* 2019;**7**:329–340.
- Zakharyevich K, Ma Y, Tang S, Hwang PY-H, Boiteux S, Hunter N. Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions. *Mol Cell* 2010;**40**:1001–1015.
- Zare-Abdollahi D, Safari S, Mirfakhraie R, Movafagh A, Bastami M, Azimzadeh P, Salsabili N, Ebrahimzadeh W, Salami S, Omrani MD. Mutational screening of the NR5A1 in azoospermia. *Andrologia* 2015;**47**:395–401.
- Zhang C, Gao L, Xu EY. LncRNA, a new component of expanding RNA-protein regulatory network important for animal sperm development. *Semin Cell Dev Biol* 2016;**59**:110–117.
- Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2015;**61**:187–193.
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML. Nucleoprotein Transitions During Spermiogenesis in Mice with Transition Nuclear Protein Tnp1 and Tnp2 Mutations1. *Biology of Reproduction* 2004;**71**:1016–1025.
- Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol* 2009;**9**:38.
- Zheng K, Xiol J, Reuter M, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Stark A, Sachidanandam R, Pillai RS, Wang PJ. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *PNAS* 2010;**107**:11841–11846. National Academy of Sciences.
- Zhu X, Zhi E, Li Z. MOV10L1 in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons during spermatogenesis. *Reproduction* 2015;**149**:R229–R235. Bioscientifica Ltd.
- Zickler D, Kleckner N. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 1998;**32**:619–697.

ANNEXES

Liste des publications non incluses dans la thèse

Article S1

Farah G, Béatrice M-P, François V. Male Infertility and Genetic screening: Guidelines in 2021. *Archives of Clinical and Biomedical Research* 2021;**5**:68–75. Fortune Journals.

Article S2

Ghieh F, Barbotin A-L, Leroy C, Marcelli F, Swierkowsky-Blanchard N, Serazin V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Will whole-genome sequencing become the first-line genetic analysis for male infertility in the near future? *Basic Clin Androl* 2021;**31**:21.

Article S3

Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Genetic defects in human azoospermia. *Basic Clin Androl* 2019;**29**:4.

Article S4

Bellil H, Ghieh F, Hermel E, Mandon-Pepin B, Vialard F. Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic Clin Androl* 2021;**31**:9.

Article S5

Jaillard S, McElreavy K, Robevska G, Akloul L, Ghieh F, Sreenivasan R, Beaumont M, Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Neyroud A-S, *et al.* STAG3 homozygous missense variant causes primary ovarian insufficiency and male non-obstructive azoospermia. *Molecular Human Reproduction* 2020;**26**:665–677. Oxford University Press (OUP).

Article S6

Dard R, Moreau M, Parizot E, Ghieh F, Brehier L, Kassis N, Serazin V, Lamaziere A, Racine C, Di Clemente N, Vialard F, Janel N. DYRK1A overexpression in mice downregulates the gonadotropic axis and disturbs early stages of spermatogenesis. *Genes* (publié).

Research Article

Male Infertility and Genetic screening: Guidelines in 2021

Ghieh Farah^{1,2}, Mandon-Pepin Béatrice^{1,2}, Vialard François^{1,2,3*}

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350, Jouy-en-Josas, France

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700, Maisons-Alfort, France

³Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy-St Germain en Laye, F-78300, Poissy, France

***Corresponding Author:** Vialard François, MS, Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350, Jouy-en-Josas, France; E-mail: francois.vialard@uvsq.fr

Received: 17 December 2020; **Accepted:** 30 December 2020; **Published:** 19 January 2021

Citation: Ghieh Farah, Mandon-Pepin Béatrice, Vialard François. Male infertility and Genetic screening: Guidelines in 2021. Archives of Clinical and Biomedical Research 5 (2021): 68-75.

Abstract

For many years, genetic screening for male infertility was limited to a few analyses: karyotyping, screening for Y microdeletions, and tests for the most frequent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene variants. The development of new technologies, such as chromosome microarray or new genome sequencing, has broadened access to whole-genome analyses. Over the last decade, many genetic defects have been described, and new strategies seem to emerge. Hence, by focusing on peripheral (rather than central) failures of spermatogenesis, the objectives of the present study were to review the latest data on clinical practice (rather than the physiopathology of these genetic abnormalities) and

suggest new guidelines for the genetic screening of male infertility.

Keywords: Male infertility; Gene defect; Guidelines; *CFTR*; *AURKC*; *DPY19L2*; *AZF*; Klinefelter

Introduction

The World Health Organization (WHO) considers infertility (defined as the inability to conceive after 12 months of sexual intercourse without the use of contraceptives) to be a major health concern. In about half of these couples, infertility is of male origin [1]. Semen analysis is the first-line test for infertile couples and can often reveal congenital or acquired

causes of male infertility; these notably include quantitative and/or qualitative abnormalities in spermatogenesis, which affect the sperm count, motility and/or morphology. These abnormalities lead to oligo/azoospermia, asthenospermia, and teratozoospermia, respectively. 47,XXY aneuploidy diagnosis for the Klinefelter syndrome [2], karyotype analysis has been proposed to infertile patients, and many series have reported other types of chromosome rearrangements [3]. Many of these anomalies involve the sex chromosomes or autosomal Robertsonian translocations. Lower the sperm count, higher the frequency of chromosomal anomalies; this is mainly due to Klinefelter syndrome, which is observed in 15% of men with azoospermia. Karyotyping revealed that Y chromosome rearrangements - especially those involving long arm deletions - are associated with infertility. It was suggested that these conditions were due to an azoospermic factor (AZF), and three regions (AZFa, AZFb and AZFc) were subsequently identified [4]. During the same period, it was found that almost all men with cystic fibrosis (CF) had a congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD). It has further been hypothesized that isolated CBAVD (OMIM#277180) is due to a distinct genetic entity associated with an elevated frequency of CF gene mutations [5] – now known as *CFTR*-related disease. Until that period, many studies had reported an association between genetic polymorphisms and male infertility but routine clinical applications of this knowledge were lacking. In parallel, a variety of different syndromes and single nucleotide variants (SNVs) associated with male infertility were described but the vast majority of these variants were private. With the emergence of whole-genome molecular analyses and the assessment of cohorts of men with homogeneous teratozoospermia, a number of autosomal recessive

causes have been reported. Firstly, a homozygous SNV in the gene coding for aurora kinase C (*AURKC*) was reportedly responsible for most cases of macrozoospermia in a population of consanguineous men from North Africa [6]. Later, some men with globozoospermia were found to have a homozygous deletion of the dpy-19-like 2 gene (*DPY19L2*), or compound heterozygotes for *DPY19L2* defects [7]. Initially, the strategy was based on a candidate gene approach that combined SNP array analysis with conventional molecular biology. The paradigm for genetic testing has now been changed totally by the development of next-generation sequencing technologies, such as whole-exome sequencing. At present, many SNVs have been reported in men with multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF), azoospermia, and other disorders. However, in contrast to macrozoospermia and globozoospermia (where *AURKC* and *DPY192* mutations in sperm account for most of the genetic defects), other syndromes are genetically heterogeneous. Hence, it appears to be necessary to define genetic testing guidelines as a function of the sperm phenotype, with a view to determining the etiology of these male infertilities and then choosing the best treatment strategy.

Quantitative defects

Azoospermia

Azoospermia is defined as the total absence of spermatozoa in the ejaculate in two successive semen examinations. It accounts for around 10% of cases of male infertility, and affects about 1% of the men in the general population [8-10]. The condition can be classified as non-obstructive azoospermia (NOA, associated with spermatogenesis failure, and accounting for 60% of cases) or obstructive azoospermia (OA, characterized by normal

spermatogenesis and an obstruction in the seminal tract, and accounting for the remaining 40%) [11,12].

In almost all cases of azoospermia, the combination of testicular sperm extraction (TESE) with *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) gives the patient an opportunity to become a father [13].

Sperm can be retrieved successfully from more than 95% of men with OA. The most challenging question for men with congenital bilateral or unilateral absence of the vas deferens (OMIM #277180) is the need to fully sequence the *CFTR* gene in both the man and his partner, in order to evaluate the risk of CF in the offspring [14]. Given that almost 80% of men with CBAVD carry one or two *CFTR* mutations [14], it is impossible to consider aTESE before genetic testing and counseling. Furthermore, a general check-up on the patient's respiratory and pancreatic functions appears to be useful. However, a quarter of men lacking a known *CFTR* mutation have a defect in the *AGDRG2* gene associated with X-linked CBAVD (OMIM #300985) [15]. No recurrent *CFTR* and *ADGRG2* mutations have been reported, however, although various candidate genes (such as *PANK2* and *SLC9A3*) have been suggested in the literature [16].

For men with NOA, the sperm retrieval rate is around 40 to 50%. Many genetic defects are associated with this condition, and sperm extraction may be contraindicated by the results of genetic testing in some of these. The first-line analysis is based on karyotyping and Y chromosome microdeletion screening [3,17]. A 46,XX karyotype (usually 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2) results from an unbalanced *de novo* X-Y translocation and the translocation of the sex-determining region of the Y

chromosome to the X chromosome) contraindicates TESE. The second one contraindication is AZFa and/or AZFb microdeletion, leading respectively to Sertoli-cell-only syndrome and sperm maturation arrest [18]. Although other chromosome abnormalities (such as Klinefelter syndrome), do not constitute a contraindication to TESE, genetic counselling is required to evaluate the risk of an unbalanced karyotype in the offspring; this mainly applied to reciprocal or Robertsonian translocations and inversions. Karyotyping leads to a diagnosis in more than 15% of cases, and so it has been hypothesized that most of the genetic causes of male infertility have yet to be characterized - probably because of the large number of genes involved [19]. The emergence of whole-exome sequencing has led to a great increase in the number of different gene defects reported [16]. Initially, only *TEX11* (an X linked coding gene) was reported recurrently reported in the literature. However, recurrent abnormalities in genes such as *SYCE1*, *MEI1*, *STAG3*, *TEX14*, and *TEX15* have now been described [20,21]. Many of the latter (except *TEX11*) have been identified in consanguineous families, and are meiosis-specific and are observed in men with sperm maturation arrest, a condition in which sperm cannot be retrieved by TESE. In view of (i) the development of genetic analysis software that facilitates the interpretation of test results and (ii) decreases in the cost of whole-exome sequencing, whole-exome sequencing analysis needs to be rapidly implemented in clinical practice - especially for consanguineous men, after karyotyping and Y chromosome microdeletion screening. The identification of gene defects also facilitates a discussion of the risk/benefit balance of TESE with the patient.

Oligospermia

For men with a low sperm count, karyotyping alone should be suggested as a guide to the etiology. Subsequent genetic counseling can evaluate the risk for the offspring (see the previous paragraph) as a function of the type of chromosomal segregation during meiosis.

Quantitative defects

Teratozoospermia

Here, we only considered homogeneous teratozoospermia, i.e. conditions in which more than 99% of spermatozoa are affected: macrozoospermia, globozoospermia, acephalic sperm, and MMAF.

Macrozoospermia

Macrozoospermia (MIM # 243060, also referred to as macrocephalic sperm head syndrome) was first described in 1977 [22]. The spermatozoa have large, abnormally shaped heads, and multiple flagella (usually four). The condition leads to primary infertility, with no chance of paternity. All spermatozoa are aneuploid, with 96 chromosomes in general – regardless of the technique used for sperm selection [23]. According to the literature data, this syndrome is due to *AURKC* mutations. In North African populations, a founding event led to a recurrent missense SNV (c.144delC) [6]. A few other mutations have been detected elsewhere in the world, with a recurrent c. p.Y248* SNV in the European population, for example [24]. At present, genetic screening for *AURKC* mutations is recommended for men in whom all sperm are macrocephalic, with a focus on particular recurrent mutations as a function of the ethnic origin. Whole-exome sequencing is only recommended for syndromic men in whom 2 deleterious SNVs have not been identified. For men with homozygous or compound heterozygous mutations in *AURKC* (deleterious SNVs), only sperm

donation or adoption is possible. Hence, the genetic diagnosis may help the patient to weigh up the various options. Genetic screening is not useful for men with a diagnosis of inhomogeneous teratozoospermia. For men with some normally shaped sperm and in whom no mutation has been found, the results of a sperm FISH analysis and a sperm DNA decondensation assay will give an idea of the chances of paternity [25].

Globozoospermia

Globozoospermia (MIM 613958, a severe teratozoospermia with primary infertility) was first described in humans in 1971 [26]. It is characterized by round spermatozoa that lack an acrosome. Hence, the spermatozoa are unable to adhere to and penetrate the zona pellucida. There is a chance of fatherhood with ICSI, although the fertilization rate in globozoospermia is low because of the absence of phospholipase C zeta (PLCz) and thus a lack of oocyte activation after injection [27]. Acrosome biogenesis is mechanistically complex, and only a few related gene defects have been identified. More than 90% of the patients described in the literature have a *DPY19L2* defect – a homogenous deletion in 80% of cases. Men with globozoospermia should first be screened for the homozygous *DPY19L2* deletions. If none are found, whole-exome sequencing (including *DPY19L2* and all the other genes previously described) appears to be justified. In a recent study, this strategy enabled a diagnosis in 75% of men in whom more than 50% of the sperm in the ejaculate were abnormal [28].

Acephalic sperm

Acephalic spermatozoa syndrome (MIM 617187) is a rare condition that was first described in 1979 [29]. The sperm are predominantly headless or lack flagella [30]. In contrast to the syndromes described

above, a large variety of genetic abnormalities have been described - although defects in the *SUN5* gene appears to be frequent [31]. Given that defects in many genes have been reported, it seems sensible to use first-line whole-genome sequencing. Some gene defects are reportedly associated with a lower chance of fatherhood. Hence, if more data are necessary, genetic screening should be performed before the ICSI procedure.

Multiple morphological abnormalities of the flagella

Although MMAF is a rare syndrome, cases have been reported regularly since 1984 [32]. Due to periaxonemal and axonemal defects, the flagella of the sperm in the ejaculate are short, coiled, absent or of irregular caliber. It has recently been demonstrated that MMAF is genetically heterogeneous and can result from defects in more than 20 genes [33]. Hence, whole-exome sequencing appears to be necessary in these men. The diagnosis is purely etiologic and does not have any impact on clinical practice. The take-home baby rate after ICSI for MMAF is similar to that observed in the whole patient population.

Other situations

Male infertility is not limited to defects in the sperm count, motility or morphology defect. As with mutations in the gene coding for PLCz [34], infertility is sometimes due to fertilization failure. In this rare, idiopathic situation (i.e. in the apparent absence of sperm or female defects), a whole-exome analysis might be a good opportunity for explain the inability to conceive.

In conclusion, the discovery of a sperm defect should prompt the initiation of genetic screening based on

whole-exome sequencing - now a diagnostic tool that is easily accessible, as a first or second-line genetic test (Table 1). However, whole-exome sequencing should always be preceded by genetic counselling. The purpose of the analysis must be clearly explained to the patient because gene defects unrelated to infertility (e.g. predispositions to cancer or early-onset neurodegenerative diseases) could potentially be identified.

	First-line genetic test	Second-line genetic test	Changes in clinical practices after genetic testing
NOA	Karyotyping and Y chromosome microdeletion	Whole-genome analysis	1: Chromosome rearrangement: considered PGD or PND. 2: 46,XX or AZFa or b microdeletion: TESE is contraindicated 3: Meiosis gene defects: considered TESE
CBAVD	<i>CFTR</i>	<i>ADGRG2</i>	Only if the partner has a <i>CFTR</i> mutation: consider PGD or PND
Oligospermia	Karyotyping	None	Chromosome rearrangement: considered PGD or PND
Macrozoospermia	<i>AURKC</i>	Whole-genome analysis	IVF is contraindicated for patients homozygote for a <i>AURKC</i> mutation or heterozygote composite
Globozoospermia	<i>DPY19L2</i>	Whole-genome analysis	None
Acephalic sperm	Whole-genome analysis	None	None
MMAF	Whole-genome analysis	None	None

Table 1: Genetic tests and their impact on clinical practice.

NOA: Non-obstructive azoospermia; CAVD: Congenital bilateral absence of vas deferent; MMAF: Multiple morphological abnormalities of the flagella; PGD: Preimplantation genetic diagnosis; PND: Prenatal diagnosis

References

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*. 2015 Dec 1;13(1):37.
2. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183 (1959): 302-303.
3. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility. *Human Reproduction* 6 (1991): 245-250.
4. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic

- sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Human Genetics* 89 (1992): 491-496.
5. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 267 (1992): 1794-1797.
 6. Dieterich K, Rifo RS, Faure AK, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nature Genetics* 39 (2007): 661-665.
 7. Coutton C, Zouari R, Abada F, et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Human Reproduction* 27 (2012): 2549-2558.
 8. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of Urology* 142 (1989): 62-65.
 9. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, et al. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clinical Endocrinology* 43 (1995): 537-543.
 10. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Science International* 20 (1982): 9-10.
 11. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988-1989). *Human Reproduction* 6 (1991): 811-816.
 12. Matsumiya K, Namiki M, Takahara S, et al. Clinical study of azoospermia. *International Journal of Andrology* 17 (1994): 140-142.
 13. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Human Reproduction Update* 13 (2007): 539-549.
 14. Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Human Genetics* (2020): 1-8.
 15. Pagin A, Bergougnoux A, Girodon E, et al. Novel ADGRG2 truncating variants in patients with X-linked congenital absence of vas deferens. *Andrology* 8 (2020): 618-624.
 16. Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, et al. Genetic defects in human azoospermia. *Basic and Clinical Andrology* 29 (2019): 1-6.
 17. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology* 62 (2012): 324-332.
 18. Patrat C, Bienvenu T, Janny L, et al. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertility and Sterility* 93 (2010): 822-832.
 19. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 14 (2008): 1197-1213.
 20. Cannarella R, Condorelli RA, Paolacci S, et al. Next-generation sequencing: Toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian, J. Androl* (2020).
 21. Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genetics in Medicine* 22 (2020): 1956-1966.
 22. Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Archiv B* 26 (1978): 111-118.

23. Chelli MH, Albert M, Ray PF, et al. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome?. *Fertility and Sterility* 93 (2010): 1347-e1.
24. Ben Khelifa M, Coutton C, Blum MG, et al. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Human Reproduction* 27 (2012): 3337-3346.
25. Guthauser B, Pollet-Villard X, Boitrelle F, et al. Is intracouple assisted reproductive technology an option for men with large-headed spermatozoa? A literature review and a decision guide proposal. *Basic and Clinical Andrology* 26 (2016): 8.
26. Holstein AF, Schirren C, Schirren CG. Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes. *Reproduction* 35 (1973): 489-491.
27. Escoffier J, Yassine S, Lee HC, et al. Subcellular localization of phospholipase C ζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Mhr: Basic Science of Reproductive Medicine* 21 (2015): 157-168.
28. Celse T, Cazin C, Mietton F, et al. Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. *Human Genetics* (2020): 1-5.
29. Le Lannou D. Teratospermia consisting of the absence of the head of the spermatozoa because of a fault in the joint between the head and the neck of the sperm in man (author's transl). *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction* 8 (1979): 43-45.
30. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, et al. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Human Reproduction* 14 (1999): 1811-1818.
31. Zhu F, Wang F, Yang X, et al. Biallelic SUN5 mutations cause autosomal-recessive acephalic spermatozoa syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 99 (2016): 942-949.
32. Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biology of the Cell* 50 (1984): 37-52.
33. Touré A, Martinez G, Kherraf ZE, et al. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Human Genetics* (2020): 1-22.
34. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, et al. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Human Reproduction* 27 (2012): 222-231.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC-BY\) license 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

COMMENTARY

Open Access

Will whole-genome sequencing become the first-line genetic analysis for male infertility in the near future?



Farah Ghieh^{1,2}, Anne-Laure Barbotin³, Clara Leroy³, François Marcelli³, Nelly Swierkowsky-Blanchard^{1,4}, Valérie Serazin^{1,2,5}, Béatrice Mandon-Pepin^{1,2} and François Vialard^{1,2,5*} 

Abstract

Whereas the initially strategy for the genetic analysis of male infertility was based on a candidate gene approach, the development of next-generation sequencing technologies (such as whole-exome sequencing (WES)) provides an opportunity to analyze many genes in a single procedure. In order to recommend WES or whole-genome sequencing (WGS) after genetic counselling, an objective evaluation of the current genetic screening strategy for male infertility is required, even if, at present, we have to take into consideration the complexity of such a procedure, not discussed in this commentary.

Keywords: Male infertility, Whole-genome sequencing, Azoospermia, Macrozoospermia, Globozoospermia, Multiple morphological abnormalities of the flagella

Résumé

Alors que la stratégie actuelle d'analyse de génétique moléculaire de l'infertilité masculine est basée sur une approche dite "gène candidat", le développement des technologies de séquençage de nouvelle génération, comme le séquençage complet de l'exome (WES), offre la possibilité d'analyser de nombreux gènes en une seule technique.

Afin de recommander le WES ou le séquençage complet du génome, après un conseil génétique, une évaluation objective des différentes stratégies de dépistage génétique est nécessaire, tout en prenant en considération que la complexité d'une utilisation des nouvelles technologies n'est pas abordé dans ce commentaire.

Mots-clés: Infertilité masculine, Séquençage complet du génome (WES), Azoospermie, Macrozoospermie, Globozoospermie, Anomalies morphologiques multiples du flagelle

About 50% of cases of infertility are of male origin [1]. The infertility is due to quantitative and/or qualitative abnormalities in spermatogenesis, which affect the sperm count, motility and/or morphology (resulting in oligo/azoospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia,

respectively). During the 1970s, the karyotyping of infertile men led to the observation of many types of chromosome rearrangement [2]. Several anomalies involve the sex chromosomes or feature autosomal Robertsonian translocations. The lower the sperm count, the higher the frequency of chromosomal anomalies; this is mainly due to Klinefelter syndrome, which is observed in 15% of men with azoospermia. With the emergence of new technologies and new data processing methods, genetic screening

* Correspondence: francois.vialard@uvsq.fr

¹UVSQ, INRAE, BREED, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700 Maisons-Alfort, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

now has a broader scope. Ever since karyotyping revealed that Y chromosome rearrangements involving the long arm are associated with infertility, researchers had expected to find an azoospermia factor (AZF). Indeed, three regions (AZFa, AZFb, and AZFc) were subsequently identified [3]. According to the European Academy of Andrology and the European Molecular Genetics Quality Network guidelines, men with a sperm count below 5 million per ml should be screened for AZF defects [4]. Given that almost all men with cystic fibrosis (CF) have a congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), it has further been hypothesized that isolated CBAVD (OMIM#277180) is a distinct genetic entity associated with an elevated frequency of CF gene mutations [5]. Hence, CBAVD is now referred to as a *CFTR*-related disease.

With the emergence of whole-genome molecular analyses, a variety of different syndromes and single nucleotide variants (SNVs) associated with male infertility have been described. These include SNVs in the gene coding for aurora kinase C (*AURKC*) for most cases of macrozoospermia [6], and copy number variations (CNVs) or SNVs in the dpy-19-like 2 gene (*DPY19L2*) for most cases of globozoospermia [7].

Although the initial screening strategy was based on a candidate gene approach, the development of next-generation sequencing (NGS) technologies (such as whole-exome sequencing (WES)) provides an opportunity to analyze many genes in a single procedure. In the near future, whole genome sequencing (WGS) will enable the simultaneous diagnosis of chromosome rearrangements, CNVs, and SNVs. Since the candidate gene screening approach is time-consuming, it must be restricted to a single gene strategy - particularly for genes with fewer exons and/or variant hot spots. In other situations, one or more of three NGS techniques should be favored: targeted sequencing (TS), WES and WGS, as the technical cost issue tends to fall over time. It should be noted that the longer the sequence, the highest the number of genetic variants, and consequently the longer and more expensive the data analysis and interpretation.

However, an objective evaluation of the today's genetic screening strategy for male infertility is necessary in order to recommend (or not) WGS - even though it is still a long, expensive process. This evaluation can be chosen as a function of the sperm phenotype. Furthermore, the implementation of both WGS and WES should always be preceded by genetic counselling. The purpose of the analysis must be explained clearly to the patient because WES or WGS can potentially identify gene defects unrelated to infertility (e.g. predispositions to cancer or early-onset neurodegenerative diseases).

Finally, we must keep in mind that the complexity of patient consent, the requirement for pre- and post-test

genetic counseling, the complexity of data interpretation, the complexity of patient feedback, and the family implications are likely to be a limitation to implementation in the near future. All of these points will not be addressed in the commentary although they will be the subject of much discussion in the future.

Quantitative defects

Azoospermia

Azoospermia is defined as the total absence of spermatozoa in the ejaculate in two successive semen examinations. It accounts for around 10% of cases of male infertility, and affects about 1% of the men in the general population [8–10]. The condition can be classified as non-obstructive azoospermia (NOA, associated with spermatogenesis failure, and accounting for 60% of cases) or obstructive azoospermia (OA, characterized by normal spermatogenesis and an obstruction in the seminal tract, and accounting for the remaining 40%) [11, 12]. In around 95% of cases of azoospermia, the combination of testicular sperm extraction (TESE) with in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) gives the patient an opportunity to become a father [12].

With the exception of men with congenital bilateral (CBAVD) or unilateral absence of the vas deferens (OMIM #277180), men with OA do not currently undergo genetic screening because the condition is generally due to chronic infection and/or inflammation of the ejaculatory tract. In contrast, full sequencing of the *CFTR* gene is recommended for a man for CAVD and his partner, in order to evaluate the risk of CF in the offspring [13]. Eighty percent of men with CBAVD carry one or two *CFTR* mutations [13], and it is impossible to consider TESE before genetic testing and counseling. Furthermore, a quarter of the men without a *CFTR* gene mutation may have a defect in the *ADGRG2* gene associated with X-linked CBAVD (OMIM #300985) [14]. Although various candidate genes (such as *PANK2* and *SLC9A3*) have been suggested in the literature [15], none has been considered for CBAVD diagnosis. Therefore, in this configuration, only TS of *CFTR* and *ADGRG2* would be necessary.

While the clinical validity of *ADGRG2* screening is restricted to the etiologic diagnosis of OA (with no associated change in patient care), *CFTR* screening is clearly associated with great benefit in routine clinical practice. If the partner carries a CF mutation, preimplantation or prenatal diagnosis should be considered before an IVF procedure. WES or WGS should be used for research purposes and not in clinical practice, since there is no patient benefit.

For men with NOA, the sperm retrieval rate in TESE is around 40 to 50%. After the exclusion of acquired diseases such as cryptorchidism or varicocele, genetic

screening can be suggested. Many genetic defects are associated with this condition, and TESE may be contraindicated by the genetic testing results: a 46,XX karyotype (usually 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2) results from an unbalanced de novo X-Y translocation and the translocation of the sex-determining region of the Y chromosome to the X chromosome, AZFa and/or AZFb microdeletions, leading respectively to Sertoli-cell-only syndrome and sperm maturation arrest [16]. Other chromosome abnormalities (such as Klinefelter syndrome) do not contraindicate TESE, although genetic counselling is required to evaluate the risk of an unbalanced karyotype in the offspring; this is mainly applied to reciprocal or Robertsonian translocations and inversions. Hence, karyotyping and Y chromosome microdeletion screening [2, 17] are currently considered as first-line analyses.

However, this strategy gives a diagnosis in only 15% of cases, and the emergence of NGS will probably increase this rate. WES has led to a great increase in the number of different gene defects reported [15] but none currently have clinical implications. Recurrent abnormalities in genes coding for synaptonemal complex central element protein 1 (*SYCE1*), meiotic double-stranded break formation protein 1 (*MEI1*), stromal antigen 3 (*STAG3*), and testis expressed-11 (*TEX11*), *TEX14*, and *TEX15* have now been described [18, 19] (mainly in consanguineous families, except for *TEX11*).

TS has also been evaluated [18]; although many variants have been reported, the great majority are considered to be variants of unknown significance (VUS) or benign variants with no clinical value. Most of them are too frequent in the overall population (up to 0.1%) and/or only are predicted to have a small effect on the encoded protein. A focus on genes only involved on spermatogenesis helps to avoid the fortuitous discovery of gene defects associated with other pathologies (such as cancer), consider only actionable variants and avoid unwarranted TESE, and consume less time. However, WES could be considered in the near future as a second-line genetic analysis (after karyotyping and Y-chromosome microdeletion screening, especially for consanguineous men), even though the discovery of SNVs does not modify the clinical practice and avoid TESE (with the exception of recurrently reported *TEX11* defects), (i) genetic analysis software that reports only class 4 and 5 variants (according to the American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines [20] or VUS for spermatogenesis-specific genes is likely to be developed in the near future, and (ii) a large number of genes are involved in spermatogenesis [21]. The identification of gene defects will facilitate discussion with the patient about the risk/benefit balance for TESE. While more time will probably be needed to contraindicate

TESE following the identification of a pathologic variant, this approach will clearly improve clinical practice - especially after an unsuccessful first attempt in which a deleterious SNV is associated with a homogeneous histological profile (such as maturation arrest or Sertoli-cell-only syndrome).

In fact, WGS could replace all these techniques and become the first-line analysis because of (i) its ongoing implementation, (ii) the development of software that facilitates the interpretation of genetic test results and the identification of all genetic variants (SNVs, CNVs, and chromosome structure rearrangements), and (iii) lower costs (correlated with deeper sequencing).

Oligozoospermia

Given (i) the lower frequency of chromosome rearrangements and Y chromosome microdeletions, (ii) the absence of known gene defects associated with this condition, and (iii) the absence of contraindication for medically assisted reproduction, karyotyping alone should be suggested as a guide to the etiology of oligozoospermia. Subsequent genetic counseling can evaluate the risk for the offspring (see the previous paragraph) as a function of the type of chromosomal segregation during meiosis. WES and WGS appeared to be restricted to research programs and are not used in routine clinical practice.

Teratozoospermia

Here, we only considered homogeneous teratozoospermia, i.e., conditions in which more than 99% of the spermatozoa are affected. Inhomogeneous teratozoospermia is frequently associated with oligozoospermia, as discussed above. With regard to homogeneous teratozoospermia, we shall consider macrozoospermia, globozoospermia, acrophalic spermatozoa, and multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF) separately. All these syndromes have a frequency below 0.05% and are considered as rare diseases in the Orphanet database (<https://www.orpha.net>). The genetic transmission of these conditions is always autosomal recessive.

Macrozoospermia

Macrozoospermia (MIM # 243060, also referred to as macrocephalic sperm head syndrome), was first described in 1977 [22]. The spermatozoa have large, abnormally shaped heads and multiple flagella (usually four). The condition leads to primary infertility, with no chance of paternity; all spermatozoa are aneuploid, and only sperm donation or adoption is possible. This syndrome is due to mutations in the *AURKC* gene [6]. Genetic screening is recommended, with a focus on particular recurrent mutations as a function of the ethnic origin. As WES is only recommended for syndromic men in whom 2 deleterious

SNVs have not been identified, its use should be limited to research programs. Lastly, WGS is unlikely to be a first-line test for macrozoospermia in the near future.

Globozoospermia

Globozoospermia (MIM 613958, a severe form of teratozoospermia with primary infertility) was first described in humans in 1971 [23]. It is characterized by round spermatozoa that lack an acrosome. Hence, the spermatozoa are unable to adhere to and penetrate the zona pellucida. In contrast to macrozoospermia, ICSI gives men with globozoospermia a chance of fatherhood, even if, the absence of phospholipase C zeta prevents oocyte activation after sperm injection [24]. According to the literature, more than 90% of patients with globozoospermia have a *DPY19L2* defect (a homogenous deletion, in 80% of cases). Hence, WES should only be suggested after first-line screening for homozygous *DPY19L2* deletions [25]. WGS is unlikely to become a first-line test in the near future.

A TS strategy could also be proposed in this situation. However, since globozoospermia is rare, there would be no advantage in developing this type of panel for a small number of patients. Prior to clinical validation, this strategy appears to be time-consuming and expensive, considering, at present, the cost of TS similar to that of WES, and the genetic analysis software development. The testing strategy and genetic diagnosis will not modify the clinical management, and IVF (with or without oocyte activation) will be suggested [25]. A genetic diagnosis is only etiological; like all autosomal recessive diseases, globozoospermia does have any consequences for the offspring.

Acephalic spermatozoa syndrome

Acephalic spermatozoa syndrome (MIM 617187) is a rare condition that was first described in 1979 [26]. The sperm are predominantly headless or lack flagella [27]. In contrast to the syndromes described above, a large variety of genetic abnormalities have been described; hence, it makes sense to use WES (and, when available, WGS) as a first-line test. Similarly, a TS strategy could be suggested, again with the limitations discussed in the previous section. Whatever the strategy or genetic diagnosis, IVF will be the recommended clinical approach.

Multiple morphological abnormalities of the flagella

Although MMAF is a rare syndrome, cases have been reported regularly since 1984 [28]. Due to peri-axonemal and axonemal defects, the flagella of the sperm in the ejaculate are short, coiled, absent, or of irregular caliber. MMAF is more genetically heterogeneous than the above-mentioned phenotypes, [29], and genetic alterations are consistently reported in literature. Hence,

WES appears to be suitable for these patients. Similarly, a TS strategy could be suggested, with the limitations discussed above. Whatever the strategy or genetic diagnosis, the clinical strategy will be IVF.

Other situations

Male infertility is not limited to sperm defects. In rare cases of idiopathic male infertility, WES might be able to provide a molecular explanation. As new data will be necessary to implement WES for routine diagnosis, this technique is currently limited to use in research programs.

Lastly, the use of WES to explain male infertility is currently subject to debate. It was recently suggested that NGS-based TS of a panel of 110 genes can evaluate spermatogenesis failures, central hypogonadism, androgen insensitivity syndrome, congenital hypopituitarism, and primary ciliary dyskinesia [30]. As expected, this technology clearly increases the diagnosis rate in patients with idiopathic oligozoospermia or NOA and reduces the proportion of idiopathic cases. However, and as explained above, it restricts the identification of variants to previously reported genes, when the cost of TS is quite similar to that of WES, and when more than 2000 genes are considered to be testis-specific. Even though first-line clinical practice will not be modified in the near future, genetic and histological correlations will soon help clinicians to advise infertile men after an initial TESE failure, for example.

In conclusion, WES is already a first- or second-line diagnostic tool. Taking into account the complexity of this practice for the patient, the clinician and the geneticist, WGS will probably replace WES and other molecular genetic analyses in the near future, except in particular situations with a high degree of genetic homogeneity (such as CAVD, macrozoospermia and globozoospermia).

Abbreviations

ADGRG2: adhesion g protein-coupled receptor g2; AURKC: aurora kinase C; AZF: azoospermia factor; CBAVD: congenital bilateral absence of the vas deferens; CF: cystic fibrosis; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CNV: copy number variant; *DPY19L2*: dpy-19-like 2; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; IVF: in vitro fertilization; MEI: meiotic double-stranded break formation protein; MMAF: multiple morphological abnormalities of the flagella; NOA: non-obstructive azoospermia; OA: obstructive azoospermia; PANX2: pannexin 2; SLC9A3: solute carrier family 9, member 3; SNV: single nucleotide variant; STAG: stromal antigen; SYCE1: synaptonemal complex central element protein 1; TESE: testicular sperm extraction; TEX: testis expressed; WES: whole exome sequencing; WGS: whole genome sequencing

Acknowledgements

none.

Authors' contributions

FG, ALB, CL, FM, NSB, VS, BMP: revised and discussed the paper. FV: wrote the paper. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

none.

Availability of data and materials

not applicable.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

none.

Author details

¹UVSQ, INRAE, BREED, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier et Universitaire, F -59000 Lille, France.

⁴Département de Gynécologie-Obstétrique, CHI de Poissy-St Germain en Laye, F-78300 Poissy, France. ⁵Département de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy-St Germain en Laye, F-78300 Poissy, France.

Received: 5 March 2021 Accepted: 3 July 2021

Published online: 19 August 2021

References

- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13(1):37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991;6(2):245–50.
- Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet*. 1992;89(5):491–6. <https://doi.org/10.1007/BF00219172>.
- Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. European academy of Andrology, European molecular genetics quality network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014;2(1):5–19. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*. 1992;267(13):1794–7. <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480130110034>.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet*. 2007;39(5):661–5. <https://doi.org/10.1038/ng2027>.
- Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C, et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod*. 2012;27(8):2549–58. <https://doi.org/10.1093/humrep/des160>.
- Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the Azoospermic patient. *J Urol*. 1989;142(1):62–5. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)38662-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)38662-7).
- Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int*. 1982;20(1):9–10. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(82\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(82)90099-8).
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod*. 1991;6(6):811–6. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433>.
- Matsumiya K, Namiki M, Takahara S, Kondoh N, Takada S, Kiyohara H, et al. Clinical study of azoospermia. *Int J Androl*. 1994;17(3):140–2. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1994.tb01233.x>.
- Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2007;13(6):539–49. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm029>.
- Bieth E, Hamdi SM, Mieuisset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet*. 2020;140(1):59–76. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02122-w>.
- Pagin A, Bergougnoux A, Girodon E, Rebol M-P, Willoquaux C, Kesteloot M, et al. Novel ADGRG2 truncating variants in patients with X-linked congenital absence of vas deferens. *Andrology*. 2020;8(3):618–24. <https://doi.org/10.1111/andr.12744>.
- Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Genetic defects in human azoospermia. *Basic Clin Androl*. 2019;29(1):4. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0086-6>.
- Patrat C, Bienvenu T, Janny L, Faure A-K, Fauque P, Aknin-Seifer I, et al. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertil Steril*. 2010;93(3):822–32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.033>.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324–32. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>.
- Cannarella R, Condorelli RA, Paolacci S, Barbagallo F, Guerri G, Bertelli M, et al. Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2020;23(1):24–9. https://doi.org/10.4103/aja.aja_25_20.
- Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med*. 2020;22(12):1956–66. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0907-1>.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*. 2008;14(11):1197–213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>.
- Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1977;26(2):111–8. <https://doi.org/10.1007/BF02889540>.
- Holstein AF, Schirren C, Schirren CG. Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes. *J Reprod Fertil*. 1973;35(3):489–91. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0350489>.
- Escoffier J, Yassine S, Lee HC, Martinez G, Delaroché J, Coutton C, et al. Subcellular localization of phospholipase C ζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Mol Hum Reprod*. 2015;21(2):157–68. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau098>.
- Celse T, Cazin C, Mietton F, Martinez G, Martinez D, Thierry-Mieg N, et al. Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. *Hum Genet*. 2020;140(1):43–57. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02229-0>.
- Le Lannou D. Teratospermia consisting of the absence of the head of the spermatozoa because of a fault in the joint between the head and the neck of the sperm in man (author's transl). *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1979;8:43–5.
- Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo SB, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod*. 1999;14(7):1811–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.7.1811>.
- Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell*. 1984;50(1):37–52. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1984.tb00253.x>.
- Touré A, Martinez G, Kherraf Z-E, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, et al. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet*. 2020;140(1):21–42. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>.
- Precone V, Cannarella R, Paolacci S, Busetto GM, Beccari T, Stuppia L, et al. Male Infertility Diagnosis: Improvement of Genetic Analysis Performance by the Introduction of Pre-Diagnostic Genes in a Next-Generation Sequencing Custom-Made Panel. *Front Endocrinol*. 2020;11:605237. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.605237>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REVIEW ARTICLE

Open Access

Genetic defects in human azoospermia



Farah Ghieh¹, Valérie Mitchell^{2,3}, Béatrice Mandon-Pepin⁴ and François Vialard^{1,5*}

Abstract

As with many other diseases, genetic testing in human azoospermia was initially restricted to karyotype analyses (leading to diagnostic chromosome rearrangement tests for Klinefelter and other syndromes). With the advent of molecular biology in the 1980s, genetic screening was broadened to analyses of Y chromosome microdeletions and the gene coding for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*). Decades later, the emergence of whole-genome techniques has led to the identification of other genetic defects associated with human azoospermia. Although *TEX11* and *ADGRG2* defects are frequently described in men with azoospermia, most of the causal gene defects found to date are private (i.e. identified in a small number of consanguineous families). Here, we provide an up-to-date overview of all the types of genetic defects known to be linked to human azoospermia and try to give clinical practice guidelines according to azoospermia phenotype. Along with homozygous mutations, polymorphisms and epigenetic defects are also briefly discussed. However, as these variations predispose to azoospermia, a specific review will be needed to compile data on all the particular genetic variations reported in the literature.

Keywords: Azoospermia, Genetic defects, Chromosome, Mutations, Polymorphisms, Epigenetics

Résumé

Comme pour beaucoup de maladies humaines, les analyses génétiques en cas d'azoospermie étaient initialement limitées à la réalisation d'un caryotype, conduisant au diagnostic de réarrangements chromosomiques comme pour le syndrome de Klinefelter ou autres syndromes. L'avènement de la biologie moléculaire, dans les années 1980, a permis l'élargissement du dépistage génétique à la recherche des microdélétions du chromosome Y et aux anomalies du gène *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Il a fallu attendre plusieurs décennies et l'apparition des techniques d'analyses du génome entier pour que soit réalisée l'identification d'autres anomalies génétiques associés à l'azoospermie humaine. Si les anomalies des gènes *TEX11* et *ADGRG2* sont fréquemment décrites dans la littérature pour les hommes présentant une azoospermie, la plupart des altérations génétiques découvertes à ce jour sont privées, identifiées dans un petit nombre de familles souvent consanguines. L'objectif dans cette revue est de fournir un aperçu actualisé de toutes les anomalies génétiques décrites dans la littérature et associées à l'azoospermie humaine tout en essayant de fournir des guides de conduite diagnostique en fonction du phénotype de l'azoospermie. En plus des mutations homozygotes et délétères, les polymorphismes et les défauts épigénétiques sont également brièvement abordés. Néanmoins, comme ces variations ne sont que de potentiels facteurs de prédisposition à l'azoospermie, une étude spécifique sera nécessaire pour compiler l'ensemble des données de la littérature pour chaque variant génétique.

Mots clés: Azoospermie, Anomalies génétiques, Chromosome, Mutations, Polymorphismes, Épigénétique

* Correspondence: francois.vialard@uvsq.fr

¹EA7404-GIG, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ, Montigny le Bretonneux, France

⁵Genetics Division, CHI de Poissy St Germain en Laye, Poissy, France

Full list of author information is available at the end of the article



The World Health Organization (WHO) considers infertility (defined as the inability to conceive after 12 months of sexual intercourse without the use of contraceptives) to be a major health concern. Indeed, infertility affects more than 50 million couples worldwide. In about half of these couples, infertility is of male origin [1].

Semen analysis can often reveal congenital or acquired causes of male infertility. These include quantitative and/or qualitative abnormalities in spermatogenesis, which therefore affect the sperm count, sperm mobility and/or sperm morphology. Azoospermia (defined as the total absence of spermatozoa in the ejaculate in two successive semen examinations) accounts for around 10% of cases of male infertility, and affects about 1% of the men in the general population [2–4]. This condition can be classified as non-obstructive azoospermia (NOA, associated with spermatogenesis failure), and obstructive azoospermia (OA, characterized by an obstruction in the seminal tract and normal spermatogenesis). Whereas NOA accounts for 60% of azoospermic patients, OA accounts for around 40% [5, 6].

In almost all cases of azoospermia, the combination of sperm extraction with in vitro fertilization (IVF) and intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) gives these patients an opportunity to father children [7]. A variety of sperm extraction modalities and techniques have been developed, depending on the type of azoospermia. In general, sperm retrieval from the testis or epididymis should be prescribed for azoospermic patients [8]. In patients with OA, percutaneous epididymal aspiration, open fine-needle aspiration, or open surgical procedures (such as microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA)) [9, 10] are often used for sperm retrieval. Sperm is successfully retrieved in more than 95% of cases.

However, the clinical management of NOA is more challenging; not all patients have sperm in their testes, and seminiferous tubules with complete spermatogenesis are intermixed with tubules without any germinal cells. In men with NOA, the sperm retrieval rate is around 40 to 50%. As is the case for OA, various sperm extraction techniques have been developed for men with NOA. According to the literature, microdissection testicular sperm extraction (microTESE) in several areas of the testis may be associated with higher sperm retrieval rates and lower postoperative complication rates [11–15].

Three histological phenotypes for NOA can be defined on the basis of the TESE (testicular sperm extraction) results: hypospermatogenesis, Sertoli-cell-only syndrome (SCOS), and maturation arrest (MA) [16, 17]. Thus, TESE also provides information on the infertility phenotype and guides the choice of treatments.

Maturation arrest is defined as incomplete spermatogenesis in which germ cells fail to mature. The condition

is subcategorized into early MA, with the presence of spermatogonia or spermatocytes only (i.e. pre-meiotic or meiosis-arrested germ cells) and late MA, in which spermatids can be detected (i.e. post-meiotic arrest). In SCOS, germ cells are completely absent in all seminiferous tubules; only Sertoli cells and Leydig cells can be seen in the seminiferous tubules and the interstitial tissue, respectively [18, 19]. Lastly, hypospermatogenesis is characterized by the presence of all types of germ cell (from spermatogonia to spermatozoa), albeit in small numbers [20]. The degree of this histological phenotype can vary from mild to severe. Although a purely testicular histological phenotype can be found, the mixed pattern, is most frequent observed in azoospermic patients [16].

The many etiologies underlying azoospermia fall into pretesticular, testicular and post-testicular categories (see for review [21, 22]). Pretesticular (central) causes of azoospermia are endocrine abnormalities, and include hypogonadotropic hypogonadism, hyperprolactinemia, and androgen resistance. In contrast, testicular etiologies are characterized by disorders of spermatogenesis inside the testes, such as varicocele-induced testicular damage, undescended testes, testicular torsion, mumps orchitis, gonadotoxic effects of medications, genetic abnormalities, and idiopathic causes. Most cases of NOA have a pretesticular or testicular cause. Lastly, post-testicular etiologies (due to ejaculatory dysfunction or genital tract outflow obstruction) are the major contributors to OA [23, 24]. In the present review, we will not discuss pretesticular etiologies because they correspond to central nervous system defects and not to genital tract disease. Indeed, de novo or familial chromosomal or gene abnormalities constitute well-established genetic causes of azoospermia.

Genetic testing in human azoospermia was initially restricted to karyotype analyses [25–27]. With technical progress, genetic screening has been broadened to the analysis of the gene coding for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) in patients with OA [28, 29] and Y chromosome microdeletions in patients with NOA [30–33]. Over the last 5 years, emergence of whole-genome techniques has led to the identification of many other supposedly causal genetic defects – raising the question of which genetic testing techniques should be used to evaluate human azoospermia. Here, we provide an up-to-date overview of all the types of genetic defects known to be linked to human azoospermia, including (i) chromosome abnormalities, (ii) causative gene mutations in OA, (iii) causative gene mutations in NOA, (iv) polymorphisms and (v) epigenetic alterations (Table 1). The last two types of defect are described in less detail.

Table 1 Genetic abnormalities observed in cases of obstructive or non-obstructive azoospermia

Genetic abnormality	Type of azoospermia	Sterility phenotype	Reference
Chromosome abnormalities			
Klinefelter syndrome	Non-obstructive azoospermia	Variable	[31]
47,XXY		Variable	[38, 39]
46,XX		SCOS	[46, 47]
Chromosome rearrangements		Variable	[21]
Y chromosome microdeletions			
AZF _a	Non-obstructive azoospermia	SCOS	[59]
AZF _b		Meiotic arrest	[59]
AZF _c		Variable	[59]
Gene mutations			
<i>CFTR</i>	Obstructive azoospermia	CBAVD	[70, 73]
<i>ADGRG2</i>		CBAVD	[75]
<i>PANK2</i>		CBAVD	[87]
<i>SLC9A3</i>		CBAVD	[86]
<i>TEX11</i>	Non-obstructive azoospermia	Meiotic arrest	[90, 92]
<i>DMC1</i>		Meiotic arrest	[93]
<i>DNAH6</i>		Meiotic arrest	[94]
<i>MAGEB4</i>		SCOS	[97]
<i>MCM8</i>		Unknown	[99]
<i>MEIOB</i>		Meiotic arrest	[94]
<i>MEI1</i>		Meiotic arrest	[105]
<i>NPAS2</i>		Unknown	[108]
<i>PSMC3IP</i>		Unknown	[110]
<i>SPINK2</i>		Post-meiotic arrest	[111]
<i>STX2</i>		Meiotic arrest	[112]
<i>SYCE1</i>		Meiotic arrest	[114]
<i>TAF4B</i>		Unknown	[116]
<i>TDRD7</i>		Post-meiotic arrest	[119]
<i>TDRD9</i>		Meiotic arrest	[122]
<i>TEX14</i>		Meiotic arrest	[94]
<i>TEX15</i>		Meiotic arrest	[127]
<i>XRCC2</i>		Meiotic arrest	[132]
<i>ZMYND15</i>		Meiotic arrest	[116]

CBAVD congenital bilateral absence of the vas deferens, SCOS Sertoli-cell-only syndrome

Chromosome abnormalities

Klinefelter syndrome (KS)

This syndrome was the first chromosomal abnormality to be linked to male infertility. It was first described in 1942 [34], and is the most common genetic etiology of human male infertility. The syndrome is caused by a 47,XXY karyotype [35]. The prevalence of KS is close to 2 per 1000 male births [36, 37]. Eighty percent of cases of KS have a nonmosaic 47,XXY karyotype, whereas the remaining 20% variously show higher-grade chromosome aneuploidies, a 46,XY/47,XXY mosaic, or a

structurally abnormal chromosome X [38]. Mosaic KS patients are usually less severely affected than nonmosaic patients are, and few cases of spontaneous paternity have been reported [39, 40]. This situation is not specific to humans; a XXY karyotype is always associated with infertility in various domestic animals (mice, cats, dogs, pigs, cows, horses, etc.) [41–43].

The presence of two X chromosomes in a male leads to impaired spermatogenesis and the failure of meiosis because gametogenesis is only possible for 46, XY cells - explaining the presence of gametes in mosaic patients

(see for review [44]). Although very few functional tubules may be present in men, focal spermatogenesis enabled the recovery of spermatozoa (using TESE) in almost 50% of cases in a study of 1248 patients; however, none of the tested parameters (including age, testis volume, and levels of FSH, LH and testosterone (T)) had predictive value [45].

In KS, degeneration of the seminiferous tubules starts well before puberty [46] and progresses throughout infancy [47]. A dramatic increase in degeneration frequently occurs at puberty, and often leads to the complete hyalinization of the seminiferous tubules in adulthood [48]. It was initially recommended to cryopreserve testicular tissue as soon as possible in those cases. However, it is now generally acknowledged that TESE in young boys with KS is questionable; germ cells loss probably occurs very early [49], and so may explain the poor results seen for adolescent testicular tissue banking [50].

47,XYY syndrome

This syndrome was first described in 1961 [51], and is associated with a predisposition to infertility ranging from a normal sperm count to azoospermia [52, 53]. In fact, the supernumerary Y chromosome is probably lost in the early stages of spermatogenesis in the great majority of XYY males [54–56], thus enabling normal spermatogenesis. However, the supernumerary Y chromosome persists in some XYY males, which results in asynapsed sex chromosomes at the pachytene stage [57, 58]. In this situation, only a trivalent configuration could achieve meiosis [59].

46,XX males

In more than 80% of cases, a 46,X,der(X)t(-X;Y)(p22.3;p11.2) karyotype results from an unbalanced de novo X-Y translocation and then the translocation of SRY (sex-determining region of Y chromosome) to the X chromosome. In the remaining 20% of cases, the genetic defect concerns the human sex determination pathway. 46, XX patients often exhibit SCOS [60, 61]. A defect in the SOX9 pathway is most frequently described, with duplication, triplication or balanced chromosomal translocation that overlaps with the so-called *RevSex* dosage sensitive critical region on chromosome 17q24 [62]. Other defects (like SOX3 duplication [63] and RSPO1 point mutation [64]) are rare but are frequently associated with a syndromic clinical presentation.

Chromosome rearrangements

By comparing infertile men with newborn children, it was found that patients with impaired spermatogenesis have a greater number of chromosome abnormalities and/or rearrangements [65, 66]. Depending on the

population studied, the proportion of affected individuals ranged from 2 to 20% [67–69], and the frequency of infertility increased with the severity of the impairment in spermatogenesis. Furthermore, it appears that gonosome abnormalities (aneuploidy or balanced translocation) most often result in azoospermia, whereas balanced abnormalities in autosomes tend to result in oligozoospermia.

Chromosome rearrangement appears to impact spermatogenesis through meiotic arrest. Several putative explanations for this association have been suggested. The first hypothesis is based on evidence of an interaction between the human quadrivalent chromosome (the association between the chromosomes involved in the translocation, at the pachytene stage), the acrocentric chromosomes, and the XY body - all of which are located near to the nucleolus [70–72]. This leads to an impairment in meiotic sex chromosome inactivation. The second hypothesis relates to the silencing of crucial genes in segments close to the chromosome breakpoints (due to the frequent non-pairing of these autosomal segments) and thus asynapsis. This hypothesis has been confirmed in studies of male mice [73] and boars [74] bearing a translocation.

Y chromosome microdeletions

Frequent observations of Y chromosome rearrangements and large deletions in azoospermic males have suggested that a particular region is required for meiosis (e.g. 46,X,i(Y)(p11); 46,X,r(Y)). Experiments with specific probes have identified various interstitial deletions [75, 76], and have enabled the definition of three regions: AZFa, AZFb, and AZFc (azoospermia factor a, b and c) [77]. The prevalence ranges from 3 to 28%, depending on the type of impairment in spermatogenesis [78]. Although the AZFc phenotype is highly variable, full deletion of AZFa and AZFb always leads to azoospermia (SCOS, and pachytene MA, respectively) [79]. The complete deletion of AZFa and/or AZFb are currently the sole genetic abnormalities that contraindicate TESE.

Clinical practice: karyotyping and Y chromosome microdeletion screening are recommended by the latest international guidelines. This approach leads to a diagnosis in more than 15% of cases. Furthermore, a full AZFa and/or AZFb microdeletion diagnosis contraindicates a testicular biopsy.

Causative gene mutations in OA

Some genetic diseases and abnormalities result in OA; they include cystic fibrosis, congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), congenital unilateral absence of the vas deferens, congenital bilateral epididymal obstruction and normal vasa, and Young syndrome. According to the literature, some gene mutations are

associated with OA. We shall first describe *CFTR* mutations, and then mutations that have been described in the literature (starting with *ADGRG2* mutations).

CFTR

This gene encodes a protein with an essential role in the sodium/chloride balance in cAMP-regulated epithelial secretions. Defects in the *CFTR* gene lead to the production of sweat with an abnormally high salt content and mucus secretions with an abnormally high viscosity. Complete loss of CFTR protein function leads to the autosomal recessive disease cystic fibrosis (CF) [80, 81]. The most common features of CF are respiratory symptoms, digestive problems, poor growth, short stature, and male sterility (due to CBAVD). The poor prognosis is due to bronchopulmonary involvement. To date, more than 2000 causal mutations are listed in public databases (<https://www.re3data.org/repository/r3d100012093>; [82]. These mutations are divided into different classes, depending on their effects on the protein and the disease mechanism [83–85]. Cystic fibrosis is the most common life-limiting genetic disorder in Caucasian populations. Several different explanations for the high frequency of heterozygotes in Caucasian populations have been suggested. Although greater fertility was initially hypothesized, it appears that heterozygosity for *CFTR* mutations confers greater resistance to typhoid fever [86], the effects of cholera toxin, and other diarrheal disorders [87]. Other hypotheses include (i) the development of cattle pastoralism, based on similarities in the distributions of lactase persistence and the most common CF mutation (Delta F508) [88], and (ii) possible respiratory advantages during the dusty climate of the last ice age [89].

Cystic fibrosis is caused by the presence of severe mutations (such as $\Delta F508$, the most frequent *CFTR* mutation in Caucasian population) in both copies of the *CFTR* gene. This 3 bp deletion leads to the failure of CFTR protein to migrate to the plasma membrane [90]. Nevertheless, combinations of severe/mild mutations and mild/mild mutations lead to CFTR dysfunction that does not meet the diagnostic criteria for CF. These *CFTR*-related mutations are linked to a “minimal” phenotype that features CBAVD, chronic or recurrent acute pancreatitis, and disseminated bronchiectasis [91].

The incidence of CBAVD is as high as 6% in men with OA [92, 93]. The production of thick mucus in the genital tract associated with the *CFTR* mutations leads to vas deferens deterioration. Almost 80% of patients with CBAVD carry a *CFTR* mutation [94], and other etiologies might account for the phenotype in the remaining 20% of cases. Recently, a few genes have been linked to CBAVD as listed below.

Many studies have found a connection between *CFTR* mutations and impaired spermatogenesis [95]. A body of

clinical evidence has highlighted an elevated mutation frequency and/or abnormally low expression of the *CFTR* gene in men with sperm abnormalities. The CFTR protein seems to be involved in spermatogenesis in rodent Sertoli cells and germ cells, and low CFTR protein expression has been observed in men with NOA [96]. Furthermore, CFTR has a critical role in sperm capacitation by directly or indirectly mediating HCO_3^- entry, which is essential for this process [97].

ADGRG2

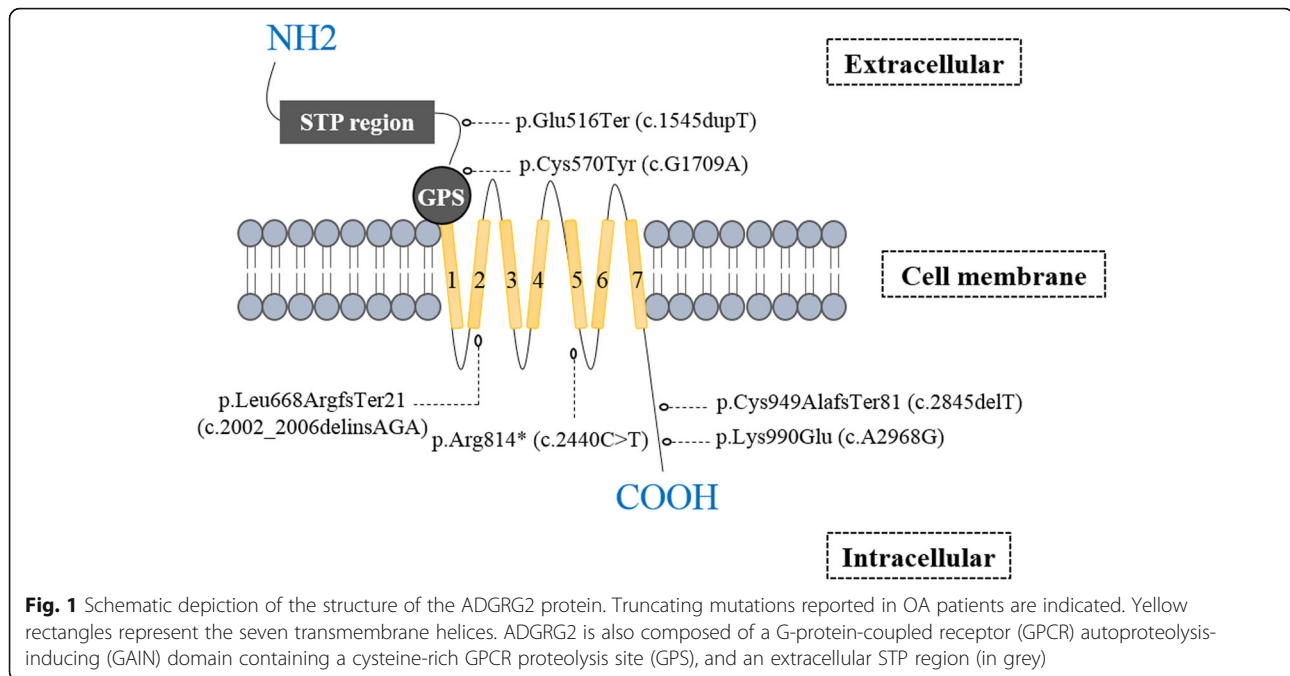
In patients lacking *CFTR* mutations, hemizygous protein-truncating mutations in the X-linked gene coding for adhesion G-protein-coupled receptor G2 (*ADGRG2*) were first described in a study of 26 azoospermic men [98], and then in a replication study of an unrelated population of 18 men [98, 99]. *ADGRG2* (located in Xp22.3) is expressed in the efferent ducts and epididymis [100]. Moreover, *ADGRG2* regulates fluid reabsorption in the efferent ducts through the *ADGRG2*-Gq/ β -arrestin-1/*CFTR* signaling complex [101–103]. All patients with *ADGRG2* mutations (Fig. 1) displayed CBAVD only, and no other symptoms of CF (as with certain mild *CFTR* variants) - indicating a possible similar involvement of both genes in the development of CBAVD [98, 99]. In a recent study, an additive nonsense *ADGRG2* mutation was described in two brothers with OA from a Pakistani family [104], confirming the involvement of *ADGRG2* mutations in OA.

SLC9A3

The gene coding for solute carrier family 9 member A3 has also been described as pathogenic in patients with CBAVD. This protein is a Na^+/H^+ exchanger expressed on the apical membranes of cells in many structures (including the epididymis, vas deferens, and the non-ciliated cells of the efferent duct) [105, 106]. In the male reproductive tract, *SLC9A3* is involved in fluid absorption and acidification [107]. It has been reported that loss of *SLC9A3* decreases the expression of *CFTR* protein and causes OA in mice [108]. These findings suggest that *SLC9A3* deletion has an impact in patients with CBAVD [109]. Further studies of the *SLC9A3* gene's involvement in CBAVD are required.

PANK2

In a study of gene copy number variations in Asian patients with CBAVD [110], Lee et al. observed the homozygous loss of the *PANK2* gene encoding pantothenate kinase 2. This enzyme is the first in the co-enzyme A (CoA) biosynthetic pathway, and catalyzes the ATP (adenosine triphosphate)-dependent phosphorylation of pantothenate. Homozygous male mutants were infertile due to azoospermia [111] but also displayed retinal



degeneration with progressive photoreceptor decline. The putative association between CBAVD and PANK2 has not been confirmed to date.

Clinical practice: given that almost 80% of patients with CBAVD carry a CFTR mutation [94], the latter gene should be fully sequenced. If a CFTR mutation is diagnosed, the patient's spouse should also be tested (given the likelihood of CF in the offspring). If a CFTR mutation is not revealed by full sequencing, the patient could be screened for a possible defect in ADGRG2 – even though this diagnosis would not modify clinical practice.

Causative gene mutations in NOA

The above-listed chromosome defects are observed in 15% of cases of azoospermia. Hence, one can reasonably hypothesize that most of the genetic causes of male infertility have yet to be characterized - probably because of the large number of genes involved [112]. Given that no more than 20% of men with NOA have chromosomal abnormalities, other spermatogenesis-related gene mutations are probably located elsewhere on the genome. To date, gene mutations have been discovered through studies of inbred families, which have confirmed the great genetic heterogeneity of this pathology. Furthermore, many azoospermic murine models have been described in the literature. A large number of possibly causal single-gene mutations have been reported for patients with the testicular phenotype of NOA (Table 1). Below, we briefly profile a number of candidate genes as a function of the testicular phenotype.

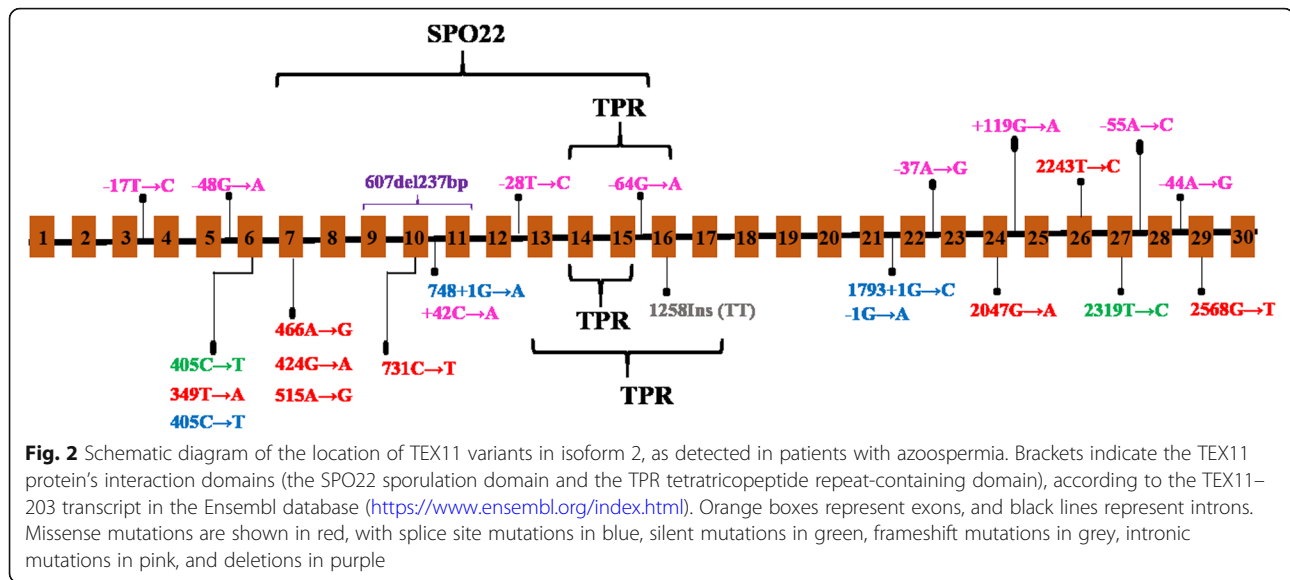
We first describe mutations in *TEX11* (the gene most frequently cited in the literature) and then list other genes in alphabetical order.

TEX11

This gene (coding for testis expressed 11) on Xq13.1 appears to be the prime gene of interest in NOA. Initially, a 90 kb deletion (encompassing exons 9, 10, and 11) in one isoform of *TEX11* was identified (using a chromosome micro-array) in two azoospermic patients with homogeneous or mixed meiotic arrest [113]. This deletion resulted in the loss of 79 amino acids from the *TEX11* protein's meiosis-specific sporulation (Spo22) domain. Additional *TEX11* mutations (missense and splice mutations) were found in 2.4% of the azoospermic patients. In line with the phenotype of male *Tex11*^{-/-} mice, a histological analysis evidenced meiotic arrest and low levels of *TEX11* protein expression in patients bearing these mutations. The *TEX11* mutations reported to date (Fig. 2) are strongly associated with the occurrence of NOA due to testicular meiotic arrest [114]. In fact, *TEX11* gene abnormalities are the sole defects recurrently described in the literature and in sporadic patients. The genes described below have been linked to azoospermia in consanguineous families.

DMC1

DMC1 is essential for meiotic recombination in various organisms. Whole-exome sequencing of DNA (deoxyribonucleic acid) samples from two members of a consanguineous Chinese family (a man with NOA and a



woman with premature ovarian insufficiency) enabled the identification of a homozygous missense mutation in the *DMCI* gene [115]. A detailed analysis evidenced MA at the zygotene stage in the seminiferous tubules of the patient with NOA.

DNAH6

A rare, nonsynonymous mutation in the dynein axonemal heavy chain 6 (*DNAH6*) gene has been reported in azoospermic brothers from a consanguineous family [116]. *DNAH6* protein is strongly expressed in testis, and *DNAH6* is important for meiosis [117] and ciliary beating. Mutations in *DNAH6* have also been linked to primary ciliary dyskinesia and sperm head anomaly [118], as well as to NOA.

MAGEB4

The analysis of a consanguineous Turkish family led to the identification of a novel nonstop mutation in the X-linked gene *MAGEB4* (coding for melanoma antigen family B4) that segregated with an azoospermic and oligozoospermic phenotype [119]. In the testis, *MAGEB4* is specifically expressed during germ cell differentiation [120].

MCM8

[121] reported a homozygous mutation in the *MCM8* gene (coding for minichromosome maintenance complex component 8 and located on chromosome 20p12.3) in a consanguineous family in which a male with a 22q11.2 microdeletion presented azoospermia and a female had primary amenorrhea. Both individuals presented mild mental retardation. The complex formed by the *MCM8* and *MCM9* proteins has a key role in homologous-recombination (HR)-mediated DNA repair [122–124]. *MCM8*^{-/-} mice display infertility, a blockage

in meiotic HR-mediated double-strand break (DSB) repair, and the absence of post-meiotic cells - confirming the importance of this gene in the meiotic stage of spermatogenesis [124].

MEIOB

A homozygote non-synonymous mutation in the *MEIOB* gene has been identified in members of one family [116]. One of the brothers showed a meiotic arrest, as observed in *Meiob* knock-out mice [125, 126]. The mutation occurred in the *MEIOB* protein's replication protein A1 DNA binding domain, and might have altered the meiotic recombination process. These studies highlight *MEIOB*'s role in meiosis (DSB repair and complete synapsis) and fertility in both humans and mice.

MEI1

A homozygous missense mutation in the *MEI1* gene (coding for meiotic double-stranded break formation protein 1) has been described in two azoospermic brothers from a consanguineous family [127]. Meiotic arrest at the pachytene stage was confirmed in one brother. The mutation affecting the *MEI1* gene was found to co-segregate with the family's NOA phenotype, and was heterozygous or absent in the other (fertile) family members. Meiotic double-stranded break formation protein 1 is overexpressed in testis, and is necessary for pairing of meiotic chromosomes. It may also be involved in the formation of meiotic DSBs in gonocytes. Mutant mice were infertile, due to meiotic arrest [128]. Consequently, defects in this gene are thought to disrupt the meiotic process. It has been reported that polymorphic alleles of the human *MEI1* are associated with human azoospermia caused by meiotic arrest [129].

NPAS2

Using whole-exome sequencing, [130] identified a damaging non-synonymous mutation in *NPAS2* in three brothers with NOA from a consanguineous family. *NPAS2* (expressed in testis and cerebral cortex) encodes a member of the basic helix-loop-helix/PAS family of transcription factors, with functions in circadian rhythms and fertility.

PSMC3IP

PSMC3 interacting protein has several functions, including the co-activation of ligand-dependent transcription mediated by nuclear hormone receptors, and the activation of DMC1 and RAD51 during meiotic recombination [131]. Recently, Al-Agha et al. identified a homozygous stop gain mutation in exon 6 of the *PSMC3IP* gene in an azoospermic man from a consanguineous family. This mutation was also present in his four sisters – all of whom suffered from primary ovarian insufficiency [132]. *PSMC3IP* is strongly expressed in testis of humans and mice. Null-mutant mice exhibit meiotic arrest at the spermatocyte I stage, and the failure of synaptonemal complex formation.

SPINK2

SPINK2 is an acrosomal protein that targets acrosin in sperm and has an essential role in spermiogenesis. It is located in the acrosomal vesicle in round spermatids, and persists in mature spermatozoa. Researchers identified a homozygous splice mutation in the *SPINK2* gene in two brothers from a consanguineous family [133]. One of the two brothers had a low round spermatid count in a testicular biopsy. Studies of knock-out mice also confirmed the involvement of *SPINK2* in NOA, with spermiogenesis arrest at the round spermatid stage. This arrest was due to Golgi fragmentation and the failure of acrosome biogenesis in the absence of *SPINK2* protein.

STX2

Nakamura et al. identified a homozygous frameshift mutation in the syntaxin-2 (*STX2*) gene [134] in just one member of a population of 131 Japanese men with NOA. Histological analysis of the patient's testis revealed MA and multinucleated spermatocytes. Furthermore, this gene is located within the 58.4 Mb genomic region with loss of heterozygosity, suggesting that the parents were consanguineous. In view of the phenotype seen in mice [135], it has been suggested that NOA may be caused by *STX2* mutations in a small proportion of patients.

SYCE1

A pathogenic splice site mutation in the *SYCE1* gene (coding for synaptonemal complex central element 1) was identified in two azoospermic brothers with complete meiotic arrest from a consanguineous family [136]. This mutation disrupted the acceptor site of intron 3, and as a result, no *SYCE1* protein could be detected in the patient's seminiferous tubules. *SYCE1* is one of the four components of the synaptonemal complex required for chromosome pairing. Its absence leads to the disruption of synapsis in mice [137].

TAF4B

A homozygous mutation in the *TAF4B* gene (coding for TATA box-binding protein-associated factor 4B) resulted in NOA in two unrelated consanguineous families [138]. In the first family, the three affected brothers were homozygous for the same nonsense mutation in *TAF4B*; the resulting truncated protein lacked the histone fold domain (which is important for the DNA-binding activity of TAFs) and the TAF12 interaction domain). This gene is a transcriptional regulator enriched in human and mouse testis. However, *TAF4B* variants were not associated with NOA in a recent study of a Han population in north-east China [139]. Null mutant mice become infertile by the age of 3 months, with an absence of germ cells in the seminiferous tubules and an impairment in spermatogonial stem cell proliferation [140].

TDRD7

A recent study of a consanguineous Chinese family reported two novel homozygous loss-of-function mutations in the *TDRD7* gene in individuals with congenital cataract and NOA [141]. One of the patients displayed a post-meiotic arrest in spermatogenesis, with the absence of mature spermatozoa in the seminiferous tubules. However, a *TDRD7* mutation is not a common cause for NOA because variants were not found in cohorts of patients with NOA alone or with congenital cataract alone. The researchers then confirmed the mutations' impact in a mouse model, where the phenotype was similar to that seen in the two patients. *TDRD7* encodes a Tudor family protein required for the remodeling of dynamic ribonucleoprotein particles in chromatid bodies during spermatogenesis [142]. Furthermore, the encoded protein repressed LINE1 retrotransposons in the male germline - highlighting its importance in spermatogenesis and male fertility.

TDRD9

The Tudor-domain containing 9 protein (*TDRD9*) is a member of the DEAD-box helicase family. It represses transposable elements and prevents their mobility via the piwi-interacting RNA (piRNA) metabolic process

[143]. A 4 bp deletion frameshift mutation in *TDRD9* has been identified in five infertile azoospermic men from a large consanguineous family; the mutation led to the loss of all the known functional domains [144]. *Tdrd9*^{-/-} male mice were sterile, with activation of retrotransposon line-1 and chromosomal synapsis failure [143].

TEX14

TEX14 is considered to be a novel causative gene for NOA because its expression is abnormally low in men with NOA [145]. *TEX14* protein is exclusively expressed in testis, especially during meiosis [146]. *TEX14* has a major role in spermatogenesis, where it is thought to be required for the formation of intercellular bridges in germ cells during meiosis [147]. A recent study of two azoospermic brothers from a consanguineous family revealed a 10 bp frameshift deletion, which resulted in an early stop codon [116]. Azoospermia or infertility has also been observed in pigs [148] and mice with *Tex14* mutations [147].

TEX15

In studies of two different families, mutations in the *TEX15* gene (required for meiotic recombination in spermatocytes) segregated with the NOA phenotype [149, 150]. In the first study, two brothers with NOA had a compound-heterozygote nonsense mutation. In the second, a homozygous nonsense mutation was identified in three Turkish brothers with azoospermia. Observations in a mouse model confirmed the patients' infertility phenotype, since loss of the *Tex15* gene disrupted the DSB repair process and induced sterility (in males only) with meiotic arrest in the testis [151]. Two association studies of *TEX15* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) gave contradictory results; a link to spermatogenic failure was observed in one study [152] but not the other [153].

XRCC2

Recently, Yang et al. identified a point mutation in the *XRCC2* gene (coding for X-ray repair cross-complementing protein 2 homolog, a RAD51 paralog) in two brothers with meiotic arrest and azoospermia from a consanguineous family [154]. The *XRCC2* gene's product is involved in HR (homologous-recombination)-mediated DSB repair. Recreation of this mutation in mice using Crispr-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins 9) technology also induced meiotic arrest and infertility, and thus confirmed its involvement in the patients' phenotype. Another study identified a mutation in *XRCC2* that causes NOA and premature ovarian insufficiency [155]. One can therefore conclude that

XRCC2 is an essential for the progression of meiosis, and that a mutation in this gene could cause infertility in humans. Polymorphisms in *XRCC2* homologs 1, 5, 6 and 7 have been linked to male infertility [156–158].

ZMYND15

In three azoospermic brothers with MA at the spermatid stage, a homozygous mutation in the gene coding for ZMYND15 (zinc finger MYND-containing protein 15) led to amputation of the proline-rich domain (essential for cytoskeleton binding and signal transduction) [138]. ZMYND15 is involved in spermiogenesis and acts as a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor. When ZMYND15 was inactivated, male mice displayed infertility and a low late spermatid count [159].

Clinical practice: with the exception of *TEX11* defects (recurrent but rare in NOA), the other mutations seems to be private. So, whole-exome sequencing might be of diagnostic value, given that most gene defects are associated with meiotic arrest and thus rule out the retrieval of any spermatozoa. A number of points must to be considered: (i) the need for pedigree studies to identify consanguineous patients, (ii) the practical difficulty of analyzing genomic DNA samples, (iii) the time and cost of whole-exome sequencing, (iv) the absence of specific therapies, (v) the patient's gratitude upon receipt of an etiologic diagnosis for his infertility. At present, whole-exome sequencing appears to have been restricted to clinical research. Hence, only *TEX11* screening should be considered because defects are associated with meiotic arrest. However, the development of genetic analysis software and emergence of new genetic therapies (e.g. induced pluripotent stem cells [160]) might modify the diagnosis of NOA.

Polymorphisms and related variations associated with azoospermia

Gene-targeted sequencing and candidate gene approaches have enabled the identification of a large number of SNPs and heterozygous mutations linked to azoospermia or which might predispose to impairments of spermatogenesis. Most of these studies were carried out on a small numbers of azoospermic patients and controls. We searched the PubMed database with the following keywords: (((((azoospermia[MeSH Major Topic] or azoospermia[Title/Abstract]) AND (polymorphism[Title/Abstract] OR polymorphisms[Title/Abstract]))) NOT review[Publication Type]) NOT meta-analysis[Title]) AND English[Language], and then (((((azoospermia[MeSH Major Topic] or azoospermia[Title/Abstract]) AND (mutation[Title/Abstract] OR mutation[Title/Abstract]))) NOT review[Publication Type]) NOT meta-analysis[Title]) AND English[Language]. The search yielded a list of more than 600 publications. After selecting only publications dealing with polymorphisms, SNP or heterozygote mutations, we

found that 182 genes have been highlighted in azoospermic or oligo/azoospermic populations. The most frequently studied gene was *MTHFR*, in 19 different publications. Few genome-wide association studies have been performed in this field; a few loci have been identified but their association with male infertility has yet to be confirmed. We did not find any clear methodological proposals in the literature on how to use SNPs associated with spermatogenesis failure.

Clinical practice: screening polymorphism does not currently appear to be of great value because a diagnosis wouldn't influence the patient's treatment. Only *MTHFR* screening could be considered [161], despite the present lack of a randomized, placebo-controlled study.

Epigenetic alterations in azoospermia

Along with genetic defects, epigenetic alterations (i.e. heritable alterations in gene function that do not affect the basic DNA sequence [162]) are now being increasingly studied in the field of human infertility [163–166]. Epigenetics has an essential role during sperm production, sperm function, and fertilization. Sperm cells are epigenetically programmed through histone-protamine replacement, DNA methylation (>80%), chromatin remodeling, genomic imprinting, and the involvement of small non-coding RNAs (piRNAs [167] and microRNAs (miRNA) [168, 169]). Hence, many studies have evidenced epigenetic changes in cases of azoospermia.

It was recently shown that mRNA and protein expression levels of the *KDM3A* gene (coding for lysine demethylase 3A) were abnormally low in testicular biopsies from patients with meiotic arrest at the round spermatid level or with SCOS, relative to samples from patients with OA [170]. Lysine demethylase 3A is a histone demethylase that is dynamically expressed in male germ cells. It regulates the expression of genes required for the packaging and condensation of sperm chromatin, such as *PRM1* and *TNP1* [166, 167, 171–173]. Furthermore, elevated histone H4 acetylation (essential for spermiogenesis) was observed in the nuclei of Sertoli cells in testicular biopsies from patients with SCOS, relative to controls [174]. Earlier, Sonnack et al. had observed low levels of H4 acetylation in the spermatids of patients with azoospermia; this contrasted with the hyperacetylation of this histone seen in spermatids from fertile patients [175].

In 2009, the methylation status of the promoter region of the *MTHFR* gene (coding for a regulatory enzyme involved in re-methylation reactions, DNA synthesis and the process of folate metabolism) was performed in patients with NOA and OA [176]. Relative to fertile controls, *MTHFR* was hypermethylated in DNA obtained from testicular biopsies (but not from peripheral blood) in men with NOA. It has been suggested that aberrant methylation of the *MTHFR* promoter reduces the expression and

enzymatic activity of the encoded protein, leading to the development of azoospermia in these patients.

Genome-wide DNA methylation was subsequently assessed in testicular tissues from 94 azoospermic patients with OA or NOA and either positive or negative TESEs. The OA and NOA differed significantly with regard to the DNA methylation profile at over 9000 CpG sites. Accordingly, patients could be classified as having OA or NOA by considering the 212 CpG sites with the greatest methylation differences [177]. Fourteen of these 212 CpG sites were located in genes with a specific testicular function - suggesting the presence of epigenetic differences between types of azoospermia.

The association between DNA methylation and azoospermia has been extensively explored [178, 179]. For example, more than 30% of gene promoters differed in their DNA methylation status in men with NOA vs. fertile controls [180]. In particular, a hypermethylated *DDR1* gene (coding for discoidin domain receptor 1, a subfamily of receptor tyrosine kinases expressed in human postmeiotic germ cells) displayed an abnormal expression profile; it was overexpressed in 25% of the patients and underexpressed in 16%. The protein was not found in the testis of patients with SCOS.

Most recently, Li et al. have sought to identify methylation-regulated genes involved in NOA [181]. In a microarray analysis, a hypermethylated, down-regulated gene coding for zinc-finger CCHC-type containing 13 (*ZCCHC13*) was found to have low protein expression in NOA testis. The *ZCCHC13* protein upregulates the *AKT/MAPK/c-MYC* signaling pathway. Hypermethylation of *ZCCHC13* might induce *c-MYC* lower expression and therefore act on cell differentiation and proliferation by altering the expression of *c-MYC*'s target genes.

Similarly, a study of the methylation status of the paternally imprinted *H19* gene and the maternally imprinted *MEST* gene in spermatogenic cells from azoospermic patients with either complete or incomplete MA revealed the presence of imprinting errors [182]. Low levels of *H19* gene methylation were observed in primary spermatocytes and elongated spermatids, and *MEST* methylation errors were found in spermatocytes [182]. These results are in line with previous reports of gene imprinting errors in azoospermia [183].

These epigenetic alterations might be valuable biomarkers for male infertility in general and idiopathic azoospermia in particular. For example, it has been suggested that miRNAs (essential for spermatogenesis and possibly involved in the regulation of gene expression) are diagnosis biomarkers for azoospermia. Indeed, miRNA expression was altered in patients, relative to controls [179–182, 184–188]. A recent comparison of men with OA and men with NOA evidenced differences in miRNA expression in spermatogonia, spermatocytes

and round spermatids, and thus suggested the presence of epigenetic dysregulation in NOA [189]. A comparison of subgroups of NOA patients with a positive vs. negative TESE gave similar results [190].

Clinical practice: in summary, it is clear that dynamic epigenetic processes are essential for normal spermatogenesis, and are being increasingly investigated in men with NOA. This research may open up perspectives for diagnosis and treatment.

Conclusion

After the description of the Klinefelter syndrome karyotype (in 1959) and various chromosome rearrangements, it was several decades before the emergence of new genomic techniques initiated a new age for molecular studies of the etiology, mechanism, and diagnosis of azoospermia. Therapeutic approaches may even emerge in the near future. Genetic causes of azoospermia are not limited to gene alterations alone; epigenetic variations, SNPs and other polymorphisms have an impact on spermatogenesis.

Experiments in animal models will probably be needed to characterize all the pathways involved in spermatogenesis and (from a therapeutic perspective) circumvent defects in this process. New technologies (such as Crispr-Cas9) may make it possible to perform genome editing in animal models and thus confirm the causes of spermatogenesis failure.

Ideally, genetic studies of azoospermia should include a large number of patients with a defined phenotype, and a control group matched for ethnicity. Nevertheless, studies of consanguineous families may also generate new strategies that could be extended to all types of azoospermia.

Lastly, the following question arises; does it really make sense to restrict the genetic evaluation of azoospermia to karyotyping, *CFTR* testing and screening for chromosome Y microdeletions?

General guidelines:

Genetic screening in NOA: patients should be karyotyped and screened for Y chromosome microdeletions; these analyses lead to a diagnosis in more than 15% of cases, and contraindicate a testicular biopsy when a full AZFa and/or AZFb microdeletion is present. Depending on the geneticist's experience, whole-exome sequencing could also be performed (together with a family segregation study). It should be borne in mind that guidelines on new gene defects are lacking, and that (with the exception of TEX11 defects) most gene defects are private.

Genetic screening in OA: with a view to avoiding CF in the offspring, patients with CBAVD should undergo whole gene sequencing. If mutations are detected, the patient's spouse should also undergo this sequencing. Although screening might detect defects in ADGRG2, this observation would not change clinical practice.

Abbreviations

ATP: Adenosine triphosphate; AZF: Azoospermia factor; CBAVD: Congenital bilateral absence of the vas deferens; CF: Cystic fibrosis; Crispr-Cas9: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins 9; DNA: Deoxyribonucleic acid; DSB: Double-strand break; HR: Homologous-recombination; ICSI: Intra-cytoplasmic sperm injection; IVF: In vitro fertilization; KS: Klinefelter syndrome; MA: Maturation arrest; MESA: Microsurgical epididymal sperm aspiration; micro-TESE: Microdissection testicular sperm extraction; miRNA: Micro RNA; NOA: Non-obstructive azoospermia; OA: Obstructive azoospermia; piRNA: Piwi-interacting RNA; SCOS: Sertoli-cell-only syndrome; SNP: Single-nucleotide polymorphism; TESE: Testicular sperm extraction; WHO: World Health Organization

Acknowledgments

Not applicable

Funding

There are no funding sources to report.

Availability of data and materials

Not applicable

Authors' contributions

FG and FV: wrote the paper. BM-P and VM revised the paper. FG, BM-P, VM and FV designed the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹EA7404-GIG, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ, Montigny Le Bretonneux, France. ²CHU Lille, Reproductive Biology Institute-Spermiologie-CECOS, Jeanne de Flandre Hospital, Lille, France. ³EA4308 "Gametogenesis and Gamete Quality", University of Lille, Lille, France. ⁴UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France. ⁵Genetics Division, CHI de Poissy St Germain en Laye, Poissy, France.

Received: 28 December 2018 Accepted: 7 March 2019

Published online: 23 April 2019

References

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2015;13:37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>.
2. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol*. 1989;142:62–5. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)38662-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)38662-7).
3. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, Rossato M, Varotto A. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin Endocrinol*. 1995;43:537–43.
4. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int*. 1982;20:9–10.
5. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991;6:811–6.
6. Matsumiya K, Namiki M, Takahara S, Kondoh N, Takada S, Kiyohara H, et al. Clinical study of azoospermia. *Int J Androl*. 1994;17:140–2. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1994.tb01233.x>.
7. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2007;13:539–49. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm029>.
8. Esteves SC, Mijaoka R, Agarwal A. Surgical treatment of male infertility in the era of intracytoplasmic sperm injection – new insights. *Clinics*. 2011;66:1463–77. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000800026>.
9. Kovac JR, Lehmann KJ, Fischer MA. A single-center study examining the outcomes of percutaneous epididymal sperm aspiration in the treatment of obstructive azoospermia. *Urol Ann*. 2014;6:41–5. <https://doi.org/10.4103/0974-7796.127026>.

10. Esteves SC, Miyaoka R, Orosz JE, Agarwal A. An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males. *Clinics*. 2013;68:99–110. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(Sup01\)11](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(Sup01)11).
11. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999;14:131–5.
12. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000;15:653–6.
13. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Hara I, Fujisawa M, Arakawa S, et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol*. 2002;168:1063–7. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000025397.03586.c4>.
14. Tsujimura A. Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2007;14:883–9. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2007.01828.x>.
15. Franco G, Scarselli F, Casciani V, De Nunzio C, Dente D, Leonardo C, et al. A novel stepwise micro-TESE approach in non obstructive azoospermia. *BMC Urol*. 2016;16. <https://doi.org/10.1186/s12894-016-0138-6>.
16. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007;22:2–16. <https://doi.org/10.1093/humrep/del279>.
17. Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcellini F, Rigot J-M, et al. Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis. *Ann Pathol*. 2010;30:182–95. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2010.03.015>.
18. Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van AS, et al. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*. 1997;20(Suppl 3):69–73.
19. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K, et al. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod*. 2002;17:2924–9. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2924>.
20. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl*. 2012;14:88–93. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.57>.
21. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clin Sao Paulo Braz*. 2013;68(Suppl 1):39–60.
22. Cocuzza M, Alvarenga C, Paganini R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*. 2013;68:15–26. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(Sup01\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(Sup01)03).
23. Fisch H, Lambert SM, Goluboff ET. Management of ejaculatory duct obstruction: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Urol*. 2006;24:604–10. <https://doi.org/10.1007/s00345-006-0129-4>.
24. Clements KM, Shipley CF, Coleman DA, Ehrhart EJ, Haschek WM, Clark SG. Azoospermia in an 8-month-old boar due to bilateral obstruction at the testis/epididymis interface. *Can Vet J Rev Veterinaire Can*. 2010;51:1130–4.
25. Jalbert P, Servoz-Gavin M, Amblard F, Pison H, Augusseau S, Jalbert H, et al. Role of karyotype in studying male infertility. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1989;18:724–8.
26. Hazama M, Nakano M, Shinozaki M, Fujisawa M, Okamoto Y, Oka N, et al. Male infertility with chromosomal abnormalities. III. 46, XYq. *Hinyokika Kyo*. 1988;34:1063–8.
27. Diaz-Castaños LR, Rivera H, Gonzalez-Montes RM, Diaz M. Translocation (Y;19)(q12;q13) and azoospermia. *Ann Genet*. 1991;34:27–9.
28. Meschede D, Keck C, De Geyter C, Eigel A, Horst J, Nieschlag E. Mutation in the cystic fibrosis transmembrane-regulator gene in bilateral congenital ductus deferens aplasia. *Dtsch Med Wochenschr*. 1994;118:661–4. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1059376>.
29. Stuppia L, Antonucci I, Binni F, Brandi A, Grifone N, Colosimo A, et al. Screening of mutations in the CFTR gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2005;13:959–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201437>.
30. Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, Stanhope R, et al. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males. *Fertil Steril*. 2003;79:301–7.
31. Bor P, Hindkjær J, Ingerslev HJ, Kolvraa S. Genetics: multiplex PCR for screening of microdeletions on the Y chromosome. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18:291–8. <https://doi.org/10.1023/A:1016618418319>.
32. Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, Ballabio A, Simi P, Cavalli P, et al. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics*. 1991;11:443–51.
33. Henegariu O, Hirschmann P, Kilian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, et al. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*. 1994;26:97–106.
34. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol*. 1942;2:615–27. <https://doi.org/10.1210/jcem-2-11-615>.
35. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*. 1959;183:302–3.
36. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet*. 1991;87:81–3.
37. Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet EJHG*. 2008;16:163–70. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201956>.
38. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet Lond Engl*. 2004;364:273–83. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16678-6).
39. Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A. Paternity in Klinefelter's syndrome—a case report. *Arch Androl*. 1982;8:149–51.
40. Terzoli G, Lalatta F, Lobbiani A, Simoni G, Colucci G. Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril*. 1992;58:821–2. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55334-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55334-5).
41. Hancock JL, Daker MG. Testicular hypoplasia in a boar with abnormal sex chromosome constitution (39 XXY). *J Reprod Fertil*. 1981;61:395–7.
42. Dunn HO, Lein DH, McEntee K. Testicular hypoplasia in a Hereford bull with 61,XXY karyotype: the bovine counterpart of human Klinefelter's syndrome. *Cornell Vet*. 1980;70:137–46.
43. Meyers-Wallen VN. Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *J Reprod Fertil Suppl*. 1993;47:441–52.
44. Aksglaede L, Juul A. Therapy of endocrine disease: testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. 2013;168:R67–76. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0934>.
45. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23:265–75. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx008>.
46. Coerd W, Rehder H, Gausmann I, Johannisson R, Gropp A. Quantitative histology of human fetal testes in chromosomal disease. *Pediatr Pathol*. 1985;3:245–59.
47. Aksglaede L, Wikström AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebaek NE, Juul A. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12:39–48. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi039>.
48. Wikström AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikström S, Tuuri T, Dunkel L. Klinefelter syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2263–70. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031725>.
49. Van Saen D, Vloeberghs V, Gies I, Mateizel I, Sermon K, De Schepper J, et al. When does germ cell loss and fibrosis occur in patients with Klinefelter syndrome? *Hum Reprod Oxf Engl*. 2018;33:1009–22. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey094>.
50. Rives N, Milazzo JP, Perdrix A, Castanet M, Joly-Hélas G, Sibert L, et al. The feasibility of fertility preservation in adolescents with Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013;28:1468–79. <https://doi.org/10.1093/humrep/det084>.
51. Sandberg AA, Koepf GF, Ishihara T, Hauschka TS. AN XYY HUMAN MALE. *Lancet*. 1961;278:488–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)92459-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(61)92459-X).
52. Skakkebaek NE, Hultén M, Jacobsen P, Mikkelsen M. Quantification of human seminiferous epithelium. II. Histological studies in eight 47,XXY men. *J Reprod Fertil*. 1973;32:391–401.
53. Abdel-Razic MM, Abdel-Hamid IA, ElSobky ES. Nonmosaic 47,XXY syndrome presenting with male infertility: case series. *Andrologia*. 2012;44:200–4. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01129.x>.
54. Chandley AC, Fletcher J, Robinson JA. Normal meiosis in two 47,XXY men. *Hum Genet*. 1976;33:231–40.
55. Speed RM, Faed MJ, Batstone PJ, Baxby K, Barnetson W. Persistence of two Y chromosomes through meiotic prophase and metaphase I in an XYY man. *Hum Genet*. 1991;87:416–20.

56. Gabriel-Robez O, Delobel B, Croquette MF, Rigot JM, Djelati R, Rimpler Y. Synaptic behaviour of sex chromosome in two XYY men. *Ann Genet.* 1996; 39:129–32.
57. Mahadevaiah SK, Evans EP, Burgoyne PS. An analysis of meiotic impairment and of sex chromosome associations throughout meiosis in XYY mice. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;89:29–37. <https://doi.org/10.1159/000015585>.
58. Rodríguez TA, Burgoyne PS. Evidence that sex chromosome asynapsis, rather than excess Y gene dosage, is responsible for the meiotic impairment of XYY mice. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;89:38–43. <https://doi.org/10.1159/000015559>.
59. Rives N, Siméon N, Milazzo JP, Barthélémy C, Macé B. Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. *Int J Androl.* 2003;26:242–9.
60. Gurbuz F, Ceylaner S, Erdogan S, Topaloglu AK, Yuksel B. Sertoli cell only syndrome with ambiguous genitalia. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM.* 2016;29:849–52. <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0458>.
61. Jain M, VeeraMohan V, Chaudhary I, Halder A. The Sertoli cell only syndrome and Glaucoma in a sex - determining region Y (SRY) positive XX infertile male. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2013;7:1457–9. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5186.3169>.
62. Délot EC, Vilain EJ. Nonsyndromic 46,XX Testicular Disorders of Sex Development. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle: University of Washington, Seattle; 1993. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1416/>.
63. Vetro A, Dehghani MR, Kraoua L, Giorda R, Beri S, Cardarelli L, et al. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2015;23:1025–32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.237>.
64. Tallapaka K, Venugopal V, Dalal A, Aggarwal S. Novel RSP01 mutation causing 46,XX testicular disorder of sex development with palmoplantar keratoderma: A review of literature and expansion of clinical phenotype. *Am J Med Genet A.* 2018;176:1006–10. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38646>.
65. Koulischer L, Schoysman R. Studies of the mitotic and meiotic chromosomes in infertile males. *J Genet Hum.* 1975;23(SUPPL):58–70.
66. Chandley AC. The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull.* 1979;35:181–6.
67. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotzè GM, Brusnický J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet.* 1984;66:162–4.
68. Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet.* 1985; 71:366–7.
69. Hens L, Bonduelle M, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC. Chromosome aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1988;3:451–7.
70. Chandley AC, Seuánez H, Fletcher JM. Meiotic behavior of five human reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 1976;17:98–111. <https://doi.org/10.1159/000130694>.
71. Johannisson R, Schwinger E, Wolff HH, vom Ende V, Löhns U. The effect of 13;14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenet Cell Genet.* 1993;63:151–5. <https://doi.org/10.1159/000133524>.
72. Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Rimpler Y, Le Marec B, Luciani JM, Guichaoua MR. Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum Genet.* 1986;72:148–52.
73. Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng C-X, et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet.* 2005;37:41–7. <https://doi.org/10.1038/ng1484>.
74. Barasc H, Congras A, Mary N, Trouilh L, Marquet V, Ferchaud S, et al. Meiotic pairing and gene expression disturbance in germ cells from an infertile boar with a balanced reciprocal autosome-autosome translocation. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol.* 2016;24:511–27. <https://doi.org/10.1007/s10577-016-9533-9>.
75. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet.* 1992;89: 491–6.
76. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5:933–43.
77. Vogt PH. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod BioMed Online.* 2005;10:81–93.
78. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet Lond Engl.* 1996;347:1290–3.
79. Patrat C, Bienvu T, Janny L, Faure A-K, Fauque P, Aknin-Seifer I, et al. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertil Steril.* 2010;93:822–32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.033>.
80. Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw K-T, Holsclaw DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1968;279: 65–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM196807112790203>.
81. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373:1891–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5).
82. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, Sharma N, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet.* 2013;45:1160–7. <https://doi.org/10.1038/ng.2745>.
83. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73:1251–4.
84. Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet TIG.* 1992;8: 392–8.
85. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.* 1995;29:777–807. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.004021>.
86. Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, et al. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature.* 1998; 393:79–82. <https://doi.org/10.1038/30006>.
87. Modiano G, Ciminelli BM, Pignatti PF. Cystic fibrosis and lactase persistence: a possible correlation. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2007;15:255–9. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201749>.
88. Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, García-Obregón S, Peña JA. An evolutionary approach to the high frequency of the Delta F508 CFTR mutation in European populations. *Med Hypotheses.* 2010;74:989–92. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.12.018>.
89. Borzan V, Tomašević B, Kurbel S. Hypothesis: possible respiratory advantages for heterozygote carriers of cystic fibrosis linked mutations during dusty climate of last glaciation. *J Theor Biol.* 2014;363:164–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.08.015>.
90. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989;245:1073–80. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>.
91. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* 2011;10(Suppl 2):S86–102. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(11\)60014-3](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(11)60014-3).
92. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod BioMed Online.* 2007;14:734–45.
93. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995;332:1475–80. <https://doi.org/10.1056/NEJM199506013322204>.
94. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2012;27:25–35. <https://doi.org/10.1093/humrep/der377>.
95. Llabador MA, Pagin A, Lefebvre-Maunoury C, Marcelli F, Leroy-Martin B, Rigot JM, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: the impact of spermatogenesis quality on intracytoplasmic sperm injection outcomes in 108 men. *Andrology.* 2015;3:473–80. <https://doi.org/10.1111/andr.12019>.
96. Xu WM, Chen J, Chen H, Diao RY, Fok KL, Dong JD, et al. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS One.* 2011;6:e19120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019120>.
97. Molina LCP, Pinto NA, Rodríguez PT, Romarowski A, Sanchez AV, Visconti PE, et al. Essential role of CFTR in PKA-dependent phosphorylation, alkalization, and hyperpolarization during human sperm capacitation. *J Cell Physiol.* 2017;232:1404–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25634>.
98. Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, et al. Truncating mutations in the adhesion G protein-coupled receptor G2 gene ADGRG2 cause an X-linked congenital bilateral absence of vas deferens. *Am J Hum Genet.* 2016;99:437–42. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.012>.

99. Yang B, Wang J, Zhang W, Pan H, Li T, Liu B, et al. Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology*. 2017;5:954–7. <https://doi.org/10.1111/andr.12407>.
100. Obermann H, Samalecos A, Osterhoff C, Schröder B, Heller R, Kirchhoff C. HE6, a two-subunit heptahelical receptor associated with apical membranes of efferent and epididymal duct epithelia. *Mol Reprod Dev*. 2003;64:13–26. <https://doi.org/10.1002/mrd.10220>.
101. Zhang D-L, Sun Y-J, Ma M-L, Wang Y, Lin H, Li R-R, et al. Gq activity- and β -arrestin-1 scaffolding-mediated ADGRG2/CFTR coupling are required for male fertility. *Bagnat M, editor. eLife*. 2018;7:e33432. <https://doi.org/10.7554/eLife.33432>.
102. Davies B, Baumann C, Kirchhoff C, Ivell R, Nubbemeyer R, Habenicht U-F, et al. Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility. *Mol Cell Biol*. 2004;24:8642–8. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8642-8648.2004>.
103. Clulow J, Jones RC, Hansen LA, Man SY. Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *J Reprod Fertil Suppl*. 1998;53:1–14.
104. Khan MJ, Pollock N, Jiang H, Castro C, Nazli R, Ahmed J, et al. X-linked ADGRG2 mutation and obstructive azoospermia in a large Pakistani family. *Sci Rep*. 2018;8:16280. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34262-5>.
105. Hihnala S, Kujala M, Toppari J, Kere J, Holmberg C, Höglund P. Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea. *Mol Hum Reprod*. 2006;12:107–11. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal009>.
106. Zhou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, Lai LW, Lien YH, et al. Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14132–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.241245898>.
107. Pholpramool C, Borwornpinyo S, Dinudom A. Role of Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the acidification of the male reproductive tract and male fertility. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38:403–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05255.x>.
108. Wang Y-Y, Lin Y-H, Wu Y-N, Chen Y-L, Lin Y-C, Cheng C-Y, et al. Loss of SLC9A3 decreases CFTR protein and causes obstructed azoospermia in mice. *PLoS Genet*. 2017;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006715>.
109. Wu Y-N, Lin Y-H, Chiang H-S. SLC9A3 is a novel pathogenic gene in Taiwanese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur Urol Suppl*. 2018;17:e1092. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)31593-8).
110. Lee C-H, Wu C-C, Wu Y-N, Chiang H-S. Gene copy number variations in Asian patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009;24:748–55. <https://doi.org/10.1093/humrep/den413>.
111. Kuo Y-M, Duncan JL, Westaway SK, Yang H, Nune G, Xu EY, et al. Deficiency of pantothenate kinase 2 (Pank2) in mice leads to retinal degeneration and azoospermia. *Hum Mol Genet*. 2005;14:49–57. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi005>.
112. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*. 2008;14:1197–213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>.
113. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med*. 2015;372:2097–107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406192>.
114. Sha Y, Zheng L, Ji Z, Mei L, Ding L, Lin S, et al. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Med Genet*. 2018;19. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0570-4>.
115. He W-B, Tu C-F, Liu Q, Meng L-L, Yuan S-M, Luo A-X, et al. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J Med Genet*. 2018;55:198–204. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104992>.
116. Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, et al. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2017;19:998–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.225>.
117. McNally FJ. Mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol*. 2013;200:131–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210007>.
118. Li Y, Yagi H, Onuoha EO, Damerla RR, Francis R, Furutani Y, et al. DNAH6 and its interactions with PCD genes in Heterotaxy and primary ciliary dyskinesia. *PLoS Genet*. 2016;12:e1005821. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005821>.
119. Okutman O, Muller J, Skory V, Garnier JM, Gaucherot A, Baert Y, et al. A no-stop mutation in MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34:683–94. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0900-z>.
120. Osterlund C, Töhönen V, Forslund KO, Nordqvist K. Mage-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation. *Cancer Res*. 2000;60:1054–61.
121. Tenenbaum-Rakover Y, Weinberg-Shukron A, Renbaum P, Lobel O, Eideh H, Gulsuner S, et al. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *J Med Genet*. 2015;52:391–9. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102921>.
122. Lee KY, Im J-S, Shibata E, Park J, Handa N, Kowalczykowski SC, et al. MCM8-9 complex promotes resection of double-strand break ends by MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Nat Commun*. 2015;6:7744. <https://doi.org/10.1038/ncomms8744>.
123. Park J, Long DT, Lee KY, Abbas T, Shibata E, Negishi M, et al. The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol Cell Biol*. 2013;33:1632–44. <https://doi.org/10.1128/MCB.01503-12>.
124. Lutzmann M, Grey C, Traver S, Ganier O, Maya-Mendoza A, Ranisavljevic N, et al. MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell*. 2012;47:523–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.048>.
125. Luo M, Yang F, Leu NA, Landaiche J, Handel MA, Benavente R, et al. MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat Commun*. 2013;4:2788. <https://doi.org/10.1038/ncomms3788>.
126. Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, et al. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>.
127. Ben Khelifa M, Ghieh F, Boudjenah R, Hue C, Fauvert D, Dard R, et al. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2018;33:1034–7. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey073>.
128. Libby BJ, De La Fuente R, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Cobb J, Inselman A, et al. The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol*. 2002;242:174–87. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0535>.
129. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, et al. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet*. 2006;51:533–40. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0394-5>.
130. Ramasamy R, Bakircioğlu ME, Cengiz C, Karaca E, Scovell J, Jhangiani SN, et al. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2015;104:286–91. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.001>.
131. Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, et al. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet*. 2011;89:572–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.006>.
132. Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, Moriwaki M, Moore B, Peacock KA, et al. Primary ovarian insufficiency and azoospermia in carriers of a homozygous PSMC3IP stop gain mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:555–63. <https://doi.org/10.1210/je.2017-01966>.
133. Kherraf Z-E, Christou-Kent M, Karaouzene T, Amiri-Yekta A, Martinez G, Vargas AS, et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med*. 2017;9:1132–49. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607461>.
134. Nakamura S, Kobori Y, Ueda Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, et al. STX2 is a causative gene for nonobstructive azoospermia. *Hum Mutat*. 2018;39:830–3. <https://doi.org/10.1002/humu.23423>.
135. Fujiwara Y, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Handel MA, Noguchi J, et al. t-SNARE Syntaxin2 (STX2) is implicated in intracellular transport of sulfoglycolipids during meiotic prophase in mouse spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2013;88:141. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107110>.
136. Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmid H, Zenvirt S, et al. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:887–91. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0445-y>.
137. Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, et al. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000393. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000393>.
138. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet*. 2014;51:239–44. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102102>.

139. Yang X, Zhang H, Jiang Y, Zhang H, Hu X, Zhu D, et al. Association study between MTRR, TAF4B, PIWL1 variants and non-obstructive azoospermia in northeast Chinese Han population. *Clin Lab*. 2018;64:1731–8. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180525>.
140. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev*. 2005;19:794–803. <https://doi.org/10.1101/gad.1290105>.
141. Tan Y-Q, Tu C, Meng L, Yuan S, Sjaarda C, Luo A, et al. Loss-of-function mutations in TDRD7 lead to a rare novel syndrome combining congenital cataract and nonobstructive azoospermia in humans. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2017. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.130>.
142. Tanaka T, Hosokawa M, Vagin W, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, et al. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:10579–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015447108>.
143. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, et al. The TDRD9-MIW2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell*. 2009;17:775–87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.012>.
144. Arafat M, Har-Vardi I, Harlev A, Levitas E, Zeadna A, Abofoul-Azab M, et al. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J Med Genet*. 2017;54:633–9. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104514>.
145. Boroujeni PB, Sabbaghian M, Totonchi M, Sodeifi N, Sarkardeh H, Samadian A, et al. Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22:185–92. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180030>.
146. Wu M-H, Rajkovic A, Burns KH, Yan W, Lin Y-N, Matzuk MM. Sequence and expression of testis-expressed gene 14 (Tex14): a gene encoding a protein kinase preferentially expressed during spermatogenesis. *Gene Expr Patterns GEP*. 2003;3:231–6.
147. Greenbaum MP, Yan W, Wu M-H, Lin Y-N, Agno JE, Sharma M, et al. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:4982–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505123103>.
148. Sironen A, Uimari P, Venhoranta H, Andersson M, Vilkki J. An exonic insertion within Tex14 gene causes spermatogenic arrest in pigs. *BMC Genomics*. 2011;12:591. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-591>.
149. Colombo R, Pontoglio A, Bini M. Two novel TEX15 mutations in a family with nonobstructive azoospermia. *Gynecol Obstet Investig*. 2017;82:283–6. <https://doi.org/10.1159/000468934>.
150. Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*. 2015;24:5581–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv290>.
151. Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*. 2008;180:673–9. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709057>.
152. Ruan J, He X-J, Du W-D, Chen G, Zhou Y, Xu S, et al. Genetic variants in TEX15 gene conferred susceptibility to spermatogenic failure in the Chinese Han population. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2012;19:1190–6. <https://doi.org/10.1177/1933719112446076>.
153. Plaseski T, Noveski P, Popeska Z, Efreinov GD, Plaseska-Karanfilska D. Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJD1A, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility. *J Androl*. 2012;33:675–83. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013995>.
154. Yang Y, Guo J, Dai L, Zhu Y, Hu H, Tan L, et al. XRCC2 mutation causes meiotic arrest, azoospermia and infertility. *J Med Genet*. 2018;55:628–36. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105145>.
155. Zhang Y-X, Li H-Y, He W-B, Tu C, Du J, Li W, et al. XRCC2 mutation causes premature ovarian insufficiency as well as non-obstructive azoospermia in humans. *Clin Genet*. 2018. <https://doi.org/10.1111/cge.13475>.
156. Gu A-H, Liang J, Lu N-X, Wu B, Xia Y-K, Lu C-C, et al. Association of XRCC1 gene polymorphisms with idiopathic azoospermia in a Chinese population. *Asian J Androl*. 2007;9:781–6. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00325.x>.
157. Zheng L, Wang X, Zhou D, Zhang J, Huo Y, Tian H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and infertility with idiopathic azoospermia in northern Chinese Han males. *Reprod BioMed Online*. 2012; 25:402–7. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.06.014>.
158. Jahantigh D, Hosseinzadeh Colagar A. XRCC5 VNTR, XRCC6 -61C>G, and XRCC7 6721G>T gene polymorphisms associated with male infertility risk evidences from case-control and in silico studies. *Int J Endocrinol*. 2017; 2017:4795076. <https://doi.org/10.1155/2017/4795076>.
159. Yan W, Si Y, Slaymaker S, Li J, Zheng H, Young DL, et al. Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *J Biol Chem*. 2010;285:31418–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116418>.
160. Mouka A, Izard V, Tachdjian G, Brisset S, Yates F, Mayeur A, et al. Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal rearrangement as a genetic model for infertility studies. *Sci Rep*. 2017;7:39760. <https://doi.org/10.1038/srep39760>.
161. Yang Y, Luo YY, Wu S, Tang YD, Rao XD, Xiong L, et al. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysis. *Genet Mol Res GMR*. 2016;15. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027631>.
162. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238:163–70.
163. Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29: 213–23. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9715-0>.
164. Filippini D, Feil R. Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics*. 2009;4:27–30.
165. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*. 2007;16:2542–51. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm187>.
166. Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril*. 2010;94:1728–33. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.010>.
167. De Mateo S, Sassone-Corsi P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: role of the germ granule. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.021>.
168. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*. 2008;3:e1738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001738>.
169. Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod*. 2008; 79:696–703. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.067827>.
170. Eelaminejad Z, Favaedi R, Sodeifi N, Sadighi Gilani MA, Shahhoseini M. Deficient expression of JMJD1A histone demethylase in patients with round spermatid maturation arrest. *Reprod BioMed Online*. 2017;34:82–9. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.005>.
171. Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*. 2007;450:119–23. <https://doi.org/10.1038/nature06236>.
172. Pedersen MT, Helin K. Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol*. 2010;20:662–71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.011>.
173. Liu Z, Zhou S, Liao L, Chen X, Meistrich M, Xu J. Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis. *J Biol Chem*. 2010;285:2758–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066845>.
174. Faure AK, Pivrot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Péoc'h M, et al. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod*. 2003;9:757–63.
175. Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*. 2002;34:384–90.
176. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhaneh M, Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009;24:2361–4. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep194>.
177. Ferfour F, Boitrelle F, Ghout I, Albert M, Molina Gomes D, Wainer R, et al. A genome-wide DNA methylation study in azoospermia. *Andrology*. 2013;1: 815–21. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00117.x>.
178. Cheng Y-S, Wee S-K, Lin T-Y, Lin Y-M. MAEL promoter hypermethylation is associated with de-repression of LINE-1 in human hypospermatogenesis. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017;32:2373–81. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex329>.
179. Minor A, Chow V, Ma S. Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reproduction*. 2011;141:749–57. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0008>.

180. Ramasamy R, Ridgeway A, Lipshultz LI, Lamb DJ. Integrative DNA methylation and gene expression analysis identifies discoidin domain receptor 1 association with idiopathic nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2014;102:968–973.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.028>.
181. Li Z, Chen S, Yang Y, Zhuang X, Tzeng C-M. Novel biomarker ZCCHC13 revealed by integrating DNA methylation and mRNA expression data in non-obstructive azoospermia. *Cell Death Dis*. 2018;4. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0033-x>.
182. Marques PI, Fernandes S, Carvalho F, Barros A, Sousa M, Marques CJ. DNA methylation imprinting errors in spermatogenic cells from maturation arrest azoospermic patients. *Andrology*. 2017;5:451–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12329>.
183. Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010;94:585–94. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.051>.
184. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2009;7:13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-13>.
185. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem*. 2011;57:1722–31. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169714>.
186. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013;28:1827–36. <https://doi.org/10.1093/humrep/det099>.
187. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril*. 2014;102:989–997.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.001>.
188. Dabaja AA, Mielnik A, Robinson BD, Wosnitzer MS, Schlegel PN, Paduch DA. Possible germ cell-Sertoli cell interactions are critical for establishing appropriate expression levels for the Sertoli cell-specific MicroRNA, miR-202-5p, in human testis. *Basic Clin Androl*. 2015;25:2. <https://doi.org/10.1186/s12610-015-0018-z>.
189. Yao C, Yuan Q, Niu M, Fu H, Zhou F, Zhang W, et al. Distinct expression profiles and novel targets of microRNAs in human spermatogonia, pachytene spermatocytes, and round spermatids between OA patients and NOA patients. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2017;9:182–94. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.007>.
190. Fang N, Cao C, Wen Y, Wang X, Yuan S, Huang X. MicroRNA profile comparison of testicular tissues derived from successful and unsuccessful microdissection testicular sperm extraction retrieval in non-obstructive azoospermia patients. *Reprod Fertil Dev*. 2018. <https://doi.org/10.1071/RD17423>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



REVIEW ARTICLE

Open Access



Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility

Hela Bellil¹, Farah Ghieh^{2,3}, Emeline Hermel^{2,3}, Béatrice Mandon-Pepin^{2,3} and François Vialard^{1,2,3*} 

Abstract

Spermatogenesis is a complex process regulated by a multitude of genes. The identification and characterization of male-germ-cell-specific genes is crucial to understanding the mechanisms through which the cells develop. The term “TEX gene” was coined by Wang et al. (Nat Genet. 2001; 27: 422–6) after they used cDNA suppression subtractive hybridization (SSH) to identify new transcripts that were present only in purified mouse spermatogonia. *TEX* (*Testis expressed*) orthologues have been found in other vertebrates (mammals, birds, and reptiles), invertebrates, and yeasts. To date, 69 *TEX* genes have been described in different species and different tissues. To evaluate the expression of each *TEX*/*tex* gene, we compiled data from 7 different RNA-Seq mRNA databases in humans, and 4 in the mouse according to the expression atlas database.

Various studies have highlighted a role for many of these genes in spermatogenesis. Here, we review current knowledge on the *TEX* genes and their roles in spermatogenesis and fertilization in humans and, comparatively, in other species (notably the mouse). As expected, *TEX* genes appear to have a major role in reproduction in general and in spermatogenesis in humans but also in all mammals such as the mouse. Most of them are expressed specifically or predominantly in the testis. As most of the *TEX* genes are highly conserved in mammals, defects in the male (gene mutations in humans and gene-null mice) lead to infertility. In the future, cumulative data on the human *TEX* genes' physiological functions and pathophysiological dysfunctions should become available and is likely to confirm the essential role of this family in the reproductive process. Thirteen *TEX* genes are now referenced in the OMIM database, and 3 have been linked to a specific phenotype. *TEX11* (on Xq13.1) is currently the gene most frequently reported as being associated with azoospermia.

Keywords: Testis-expressed gene, TEX, Male infertility, Spermatogenesis, Mouse model, Genetic defect

* Correspondence: francois.vialard@uvsq.fr

¹Département de Génétique, CHI de Poissy St Germain en Laye, Poissy, France

²Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Résumé

La spermatogenèse est un processus complexe régulé par une multitude de gènes. L'identification et la caractérisation des gènes spécifiques des cellules germinales mâles sont essentielles pour comprendre les mécanismes par lesquels les cellules se développent. Le terme «gène *TEX*» a été inventé par Wang et al. (Nat Genet. 2001; 27: 422–6) après avoir utilisé l'hybridation soustractive d'ADNc (SSH) pour identifier de nouveaux transcrits qui n'étaient présents que dans la spermatogonie de souris. Puis, des orthologues *TEX* ont été trouvés chez d'autres vertébrés (mammifères, oiseaux et reptiles), des invertébrés et des levures. À ce jour, 69 gènes *TEX* (*Testis expressed*) ont été décrits dans différentes espèces et différents tissus. Pour évaluer l'expression de chaque gène *TEX/tex*, nous avons compilé les données de 7 bases de données différentes d'ARNm RNA-Seq chez l'homme, et 4 chez la souris selon la base de données de l'atlas d'expression.

Diverses études ont mis en évidence le rôle de plusieurs de ces gènes dans la spermatogenèse. Ici, nous passons en revue les connaissances actuelles sur les gènes *TEX* et leurs rôles dans la spermatogenèse et la fécondation chez l'humain et, comparativement, chez d'autres espèces (notamment la souris). Comme prévu, les gènes *TEX* semblent avoir un rôle majeur dans la reproduction en général et dans la spermatogenèse chez l'homme, mais aussi chez d'autres mammifères comme la souris. La plupart d'entre eux sont exprimés spécifiquement ou principalement dans les testicules. Comme la plupart des gènes *TEX* sont hautement conservés chez les mammifères, des défauts chez le mâle (mutations géniques chez l'homme et KO murin) conduisent à l'infertilité. À l'avenir, l'accumulation des données sur les fonctions physiologiques et les dysfonctionnements physiopathologiques des gènes *TEX* humains devraient devenir disponibles et confirmer le rôle essentiel de cette famille dans le processus de reproduction. Treize gènes *TEX* sont désormais référencés dans la base de données OMIM, et 3 ont été liés à un phénotype spécifique. *TEX11* (sur Xq13.1) est actuellement le gène le plus fréquemment rapporté comme étant associé à l'azoospermie.

Mots clés: Testis-expressed gene, *TEX*, infertilité masculine, spermatogenèse, modèle murin, défaut génétique

Introduction

Male and/or female infertility (defined as the inability to conceive a child within 1 year of regular unprotected intercourse) affects up to 15% of couples [1]. Infertility is due to male factors in 40–50% of couples and can be due to environmental exposure, infections, immune problems or hormone deficiencies [2]. In 15–30% of all cases, genetics factors are involved [3].

Male germ cell development (spermatogenesis) is a tightly regulated developmental process that occurs through successive mitotic, meiotic and post-meiotic phases (in spermatogonia, spermatocytes and spermatids, respectively) [4]. During spermatogenesis, gene expression is regulated in three ways: intrinsically, interactively and extrinsically. The intrinsic program determines which genes are used and when these genes are expressed. The interactive regulation involves communication between germ cells and somatic cells. Lastly, the extrinsic program influences the interactive process through hormonal regulation [5].

The regulation of spermatogenesis involves the expression of a large number of genes in a precise cell- and stage-specific program [5]. A comprehensive understanding of spermatogenesis requires the identification and functional characterization of the 2300 or so genes that are predominantly expressed in the testes [6]. In the 2000s, the use of cDNA (complementary DNA) library

construction techniques and the comparison of gene transcription profiles under different physiological conditions enabled the identified of genes specifically expressed in testis or gonads (named as the testis-expressed (*Tex*) genes). However, no information on the new gene family's function (notably in the testis) was initially available [7].

Here, we review current knowledge on the *TEX* genes in humans and other species (notably the mouse) and focus on the genes' roles in spermatogenesis and fertilization. Importantly, some of the *TEX* genes constitute promising biomarkers of male infertility.

How the first *TEX* genes were identified and named

The term “*TEX*” for testis-expressed was coined by Wang et al. after they used cDNA suppression subtractive hybridization (SSH) to identify new transcripts that were present only in purified mouse spermatogonia [7]. Ten of the 23-novel germ-cell-specific genes, highly or exclusively testis-expressed (*Tex11* to 20) had not been annotated previously, and the human *TEX* orthologs were subsequently described [7]. Most of these genes have since been found to have a function in spermatogenesis, and additional *TEX* genes have been identified.

Before Wang et al.'s report, the *Tex* genes had been confused with the t-complex testis-expressed (*Tctex*)

genes. The mouse t-complex corresponds to a portion of mouse chromosome 17 that had been identified in mouse t-haplotypes [8]. This t-haplotype contains four non-overlapping, paracentric inversions that span a genetic distance of 20 cM (centiMorgan). This results in a 100–200-fold suppression of recombination, which in turn keeps the haplotypes intact and leads to their divergence from the wild-type chromosomes. There are relatively few *Tctex* genes: *Tctex3*, *Tctex7*, *Tctex8*, *Tctex9*, *Tctex10*, *Tctex11*, and *Tctex12*. The genes are expressed predominantly in the germ cells of the testis, and map to various regions of the t-complex. Three genes are more abundantly expressed at the pachytene stage; three others are expressed after meiosis, and one (*Tctex10*) is expressed at all stages of spermatogenesis [8]. Two orthologs have been observed in the human: *TCTEX6* (also named *TEX6*) and *PPP1R11* (*TCTEX5*). To date, 69 *TEX* or *Tex* genes have been described in humans or mouse models. However, as described below, these genes do not constitute a homogeneous family; in contrast as the *HOX* (homeobox) or *PAX* (paired box) or *RHOX* (X-linked reproductive homeobox) genes with high sequence identity and very similar functions, the sole common feature of the *Tex/TEX* genes is their expression (solely or primarily) in the testis. After Wang et al.'s report, new testis-specific genes have been included in the *TEX* family and numbered sequentially. The *TCTEX* and *TEX* gene families are not related as such.

The *TEX* gene family

As mentioned above, 69 expressed *TEX* or *Tex* genes (61 human genes and 61 mouse genes (Fig. 1)) are listed in the main databases (<https://gtexportal.org/home/>, <https://www.ensembl.org/index.html>, <https://www.omim.org/>, etc.). These genes are distributed throughout the genome. To evaluate the expression of each *TEX/Tex* gene, we compiled data from 7 different RNA-Seq mRNA databases in humans, and 4 in

the mouse according to the expression atlas database (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>).

The 7 databases for RNA-Seq mRNA results in humans were:

- (1) the Genotype-Tissue Expression database (<http://www.genome.ucsc.edu/gtex.html>): 53 tissue.
- (2) Hallstrom et al.'s database [9]: 95 individuals representing 27 tissues.
- (3) the Uhlen laboratory's database (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome>): 122 individuals representing 32 tissues.
- (4) the Illumina Body Map [10]: 16 tissues.
- (5) the ENCODE project database from Snyder's lab (<https://www.encodeproject.org/>): 13 tissues.
- (6) the mammalian database from Kaessmann's lab [11]: 6 tissues, used to investigate the evolution of gene expression levels in different organs.
- (7) the Functional Annotation of the Mammalian Genome (FANTOM) 5 project (<https://fantom.gsc.riken.jp/data/>): 57 tissues

The 4 databases for RNA-Seq mRNA results in the mouse were:

- (1) the mammalian database from Kaessmann's lab [11]: 6 tissues (as in humans).
- (2) the FANTOM database 5 projects: (<https://fantom.gsc.riken.jp/data/>): 35 tissues
- (3) the strand-specific RNA-seq of nine C57BL6 mouse tissues: 8 tissues.
- (4) Soumillon et al.'s database on brain, liver, and the whole testis [12]: 3 tissues

The data are reported in Table 1 (for humans), Table 2 (for mice), and Table 3 (for other species). For each gene, the highest level of tissue mRNA expression and the mean testis ratio (the ratio between testis expression

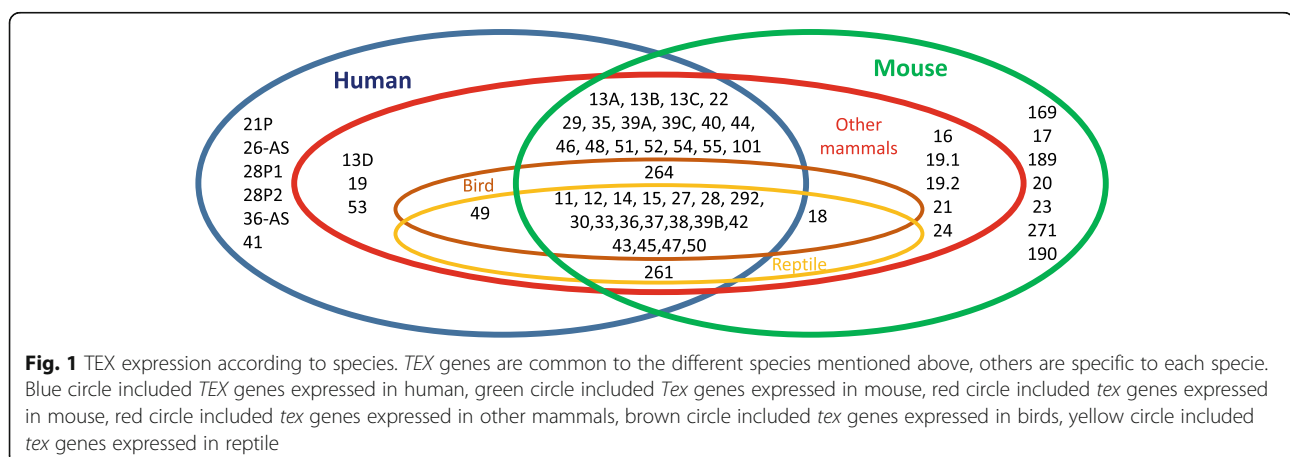


Table 1 Human mRNA *TEX* gene expression, *TEX* expression and localization, OMIM reference

TEX gene number	Autre nom / Remarque	Human														Testis expression localisation (https://www.proteinatlas.org/)	OMIM	
		Expression according to Expression Atlas (https://www.ebi.ac.uk/gxa/home)															Gene Number	Phenotype number
		RNA							Protein									
		Expressed	Testis	Ovary	Other tissues	Experiment number	Highest tissu mRNA level	Specificity	Highest tissu protein level		Specific testis protein isoform	Specific ovary protein isoform						
								Fetal	Adult									
11		Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.772	HTNS	Ovary	Testis	Yes	Yes	Spermatogonias and spermatocytes	300311	309120		
12		Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.854	HTNS	Unknown	HTNS	Yes	No	Spermatocytes and spermatids	605791	None		
13A		Yes	Medium	No	No	6	Testis	1	TS	Unknown	Testis	Yes	No	Spermatids	300312	None		
13B		Yes	Medium	No	No	4	Testis	1	TS	Unknown	Unknown	Yes	No	Unknown	300313	None		
13C		Yes	Medium	No	No	2	Testis	1	TS	Unknown	Unknown	NA	NA	Unknown				
13D		Yes	Low	No	No	2	Testis	1	TS	Unknown	Unknown	Yes	No	Unknown				
14		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.904	HTNS	Unknown	Gonads	Yes	No	Cells in seminiferous duct	605792	617707		
15		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.761	HTNS	Unknown	CNS	Yes	No	Spermatogonias to spermatids	605795	617960		
19		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	Unknown	HTNS	Yes	No	Sertoli cells and spermatocytes	613647	None		
21P	Pseudogene	Yes	Medium	Low	Yes	6	Testis	0.411	HTNS	NA	NA	No	No					
22		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.602	HTNS	NA	NA	Yes	No	Cells in seminiferous duct				
26	C13orf26	Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.787	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
26-AS1		Yes	Low	No	Yes	7	Testis	0.841	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
261		Yes	Medium	Medium	Yes	7	Thyroid (4/7)	0.091	NP	NA	NA	Yes	No	Leydig cells	618562	None		
264		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.189	NP	Ovary	Testis	Yes	No	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells				
27	ZFAND3	Yes	Medium	Medium	Yes	7	Testis	0.139	NP	NA	HTNS	No	No	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells	607455	None		
28	CKORF2	Yes	Low	No	No	6	Testis	1	TS	NA	NA	Yes	No	Unknown	300992	None		
28P1	Pseudogene	Yes						NA										
28P2	Pseudogene	Yes						NA										
29		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.726	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
292	UTP4	Yes	Medium	Medium	Yes	7	Testis (5/7)	0.13	NP	NA	NP	NA	NA	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells	607456	None		
30		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.442	HTNS	Ovary	Testis	No	No	Germinal cells				
33	C22orf33	Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	Testis	Yes	No	Germinal cells				
34	SPATA32	Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.942	HTNS	NA	NA	Yes	No	Cells in seminiferous duct				
35	TSC24	Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.99	HTNS	NA	NA	Yes	No	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells				
36-AS1		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
36		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
37		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	NA	Yes	No	Germinal cells				
38		Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.998	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
39A	FAM9A	Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.933	HTNS	NA	NA	Yes	No	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells				
39B	FAM9B	Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.666	HTNS	NA	NA	Yes	No	Cells in seminiferous ducts and Leydig cells				
39C	FAM9C	Yes	Medium	No	Yes	5	Spleen (3/5)	0.425	NP	NA	Spleen/testis	Yes	No	Unknown				
40	CATSPERZ	Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.822	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown	617511	None		
41		Yes	Low	No	Yes	7	Testis	0.643	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
42	NFK1	Yes	Low	Low	Yes	7	Thyroid (3/6)	0.055	NP	NA	NP	No	No	Germinal cells, Leydig cells				
43	C5orf48	Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.843	HTNS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
44	C2orf57	Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.997	HTNS	NA	NA	Yes	No	Spermatids				
45	C19orf45	Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.807	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
46		Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.971	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
47		Yes	Medium	No	No	7	Testis	0.997	TS	NA	NA	Yes	No	Unknown				
48		Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.98	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
49		Yes	Medium	No	Yes	7	Testis	0.961	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
50		Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.995	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
51		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
52		Yes	Medium	Low	Yes	2	Testis	0.214	NP	NA	NA	NA	NA	Unknown				
53		Yes	Medium	Low	Yes	7	Testis	0.965	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
54		Yes	Medium	No	Yes	2	Testis	0.93	HTNS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
55		Yes	Medium	No	No	7	Testis	1	TS	NA	NA	NA	NA	Unknown				
101		Yes	Medium	No	Yes	6	Testis	0.985	HTNS	Unknown	Testis	NA	NA	Spermatogonia, spermatocytes and spermatids	612665	None		

NA: Non Available

NP: no predominance

HTNS: High in testis but not specific

TS: Testis specific

MT: Majority Testis (Number experiment/total experiment number)

and the total expression level for all other tissues) were reported in humans and mice. Protein expression evaluated according to the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) and the Human Proteome Map [13] was only reported for humans. The site of expression in the human testis was reported according to the Human Protein Atlas.

tex orthologues have been found in other vertebrates (mammals (mainly *Rattus norvegicus*, *Macaca mulatta*, *Equus caballus* and *Bos taurus*), birds (*Gallus gallus*), and reptiles), invertebrates (*Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*), and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) (Table 3). RNA expression in species other than the human was reported according to the Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>).

In the following paragraphs, *TEX1* to *TEX10* genes are not considered. As mentioned above, *TCTEX* genes are not considered to be members of the *TEX* family, even though mutations in some of them (such as *TEX8* and *CAPZA3*) result in male infertility in the mouse (due to sperm with abnormally shaped heads and poor motility). Ultimately, only 62 *TEX* genes have been defined as such.

Evolutionary conservation of the *TEX* genes

Data are summarized in Fig. 1

Conservation of identity between vertebrates and invertebrates

Fifty-three of the 62 genes reported in Tables 1, 2, 3 do not have identified or reported orthologues in invertebrates. For the 9 other genes (all of which are testis-specific in humans), orthologues have been identified in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* and/or *Saccharomyces cerevisiae*. Five of the 9 genes (*TEX13A*, *B*, *C*, *D* and *TEX28*) are also testis-specific in other mammals – indicating a high degree of conservation and a strong probable impact on spermatogenesis. *TEX13* is thought to be the ancestral gene. However, a large proportion of the *TEX* genes appear to be vertebrate-specific - confirming the differences in spermatogenesis between vertebrates and invertebrates [14].

Conservation of identity between vertebrates

Thirty-nine of the 62 genes reported in Tables 1, 2, 3 are expressed in humans, mice, and other mammals. Twenty are also expressed in birds and reptiles, 1 is only

Table 2 Mouse mRNA *Tex* gene expression, Nucleotids sequence homology (%) and KO models

TEX gene number	Nucleotids sequence homology (%)	Mice Expression according to Expression Atlas				KO observed	
		Expressed	Highest tissu mRNA	Experiment number	Testis mean ratio	Male fertility	Description
1	89.08 (n)	Yes	Testis (2/4)	4	0.193		Phenotype not described
2	87.28 (n)	Yes	Testis	4	0.0669	Not described	Eye, behavior neurological phenotype and homeostasis/metabolism phenotypes
6	80.76 (n)	Yes	Testis	4	0.289		Phenotype not described
9	81.35 (n)	Yes	Testis	4	0.582		Phenotype not described
13C	55 (n)	Yes	NA				Not done
16		Yes	Testis	3	1		Phenotype not described
19.2		Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
21		Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
24		Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
26	73,26	Yes	Testis	4	0.956		Phenotype not described
261	91.5 (n)	Yes	NP	4	0.176	Not described	Skeleton, immune system, growth/size/body, adipose tissue defect
264	85.48 (n)	Yes	Kidney (2/4)	4	0.154		Phenotype not described
27	91.71 (n)	Yes	Testis	4	0.576		Phenotype not described
28	72,99	Yes	Testis	3	1		Phenotype not described
29	31.00	Yes	Testis	4	0.999	Not described	Behavior/neurological system affected,
30	94.07	Yes	Testis	4	0.772		Phenotype not described
34	61,68	Yes	Testis	4	0.986		Phenotype not described
39A	11(n)	Yes	NA				Not done
39B	35(n)	Yes	NA				Not done
39C	8(n)	Yes	NA				Not done
42	87.64 (n)	Yes	CNS	3	0.142		Phenotype not described
43	78,61	Yes	Testis	4	0.998		Phenotype not described
44	64,26	Yes	Testis	3	1		Phenotype not described
45	69,38	Yes	Testis	4	0.995	Not described	No abnormal phenotype detected
46	73,89	Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
47	75,63	Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
48	64,55	Yes	Testis	4	0.999		Phenotype not described
50	75,64	Yes	Testis	4	0.978		Phenotype not described
51	39(n)	Yes	NA				Not done
52	75,92	Yes	Testis	3	0.896		Phenotype not described
54	55(n)	Yes	NA				Not done
55	36.00	Yes	Testis	4	1		Phenotype not described
190		Yes	Testis	4	0.287		Phenotype not described

expressed in a bird, 1 is only expressed in a reptile, and 17 are not expressed in birds or reptiles (and so are probably mammal-specific). Thirty-three of the 39 genes are expressed specifically in the testis (in 10 cases) or predominantly in the testis (in 22 cases). For the remaining 6 genes, the highest level of gene expression is not observed in the testis. Four of these 6 genes are not even testis-specific (Table 1).

Of the 62 genes reported in Tables 1, 2, 3, 6 are solely expressed in human. Three are pseudogenes (*TEX21P*, *28P1* and *28P2*), 2 considered to code for antisense RNAs (*TEX26-AS1* and *TEX36-AS1*), and the sixth is *TEX41*. The RNA expression data (when available) suggests that these 6 genes are testis-specific or at least much more strongly expressed in the testis than in other tissues. Seven of the 62 genes reported in Tables 1, 2, 3 are only expressed in mice; 3 of these are testis-specific expression or a very high testis expression level. For the last 10 genes, RNA expression has been identified in other vertebrates (but not in humans or mice) and appears to be generally testis-specific (mean testis ratios: from 0.944 to 1).

Conservation of identity between humans and mice

When comparing humans and mice, the degree of nucleotide identity sequence ranges from 8.00% (for *TEX39C*) to 94.07% (for *TEX30*). However, when considering only those genes ($n = 26$) with a mean testis RNA

ratio below 0.5 in humans and mice, the degree of nucleotide sequence identity ranges from 31.0% (for *TEX29*) to 86.45% (for *TEX12*). The 8 genes that are testis-specific in humans are also testis-specific in the mouse. Given the high observed degree of identity, studies of *TEX* gene function in the mouse are likely to be relevant.

Tex gene expression and function in the mouse

Tex gene was first reported by Wang et al. in 2001 [7]. Ten of the 25 testis expressed genes, 10 (*Tex11* to *20*) had not been described previously, and 3 (*Tex15*, *19* and *20*). were expressed in the ovary. A human ortholog has been identified in 5 cases (*Tex11* to *15*). The analysis of testis cDNA libraries has since enabled the discovery of many other similar genes. Of the 52 *Tex* genes expressed in the mouse, 13 are testis-specific and 37 have a mean testis ratio below 0.5. For the 8 *Tex* genes with a mean testis ratio above 0.5, the testis is the tissue with the highest RNA expression level. The remaining genes have not been characterized. The available data are summarized in Table 4 and detailed in Table 2.

One or more mouse models (mainly knock-out models) have been produced for 47 of the 52 *Tex* genes. These models have been used to study the *Tex* genes' function and the resulting level of male fertility. In fact, the male fertility phenotype is not known or has not been reported for 25 genes. For *Tex20*, *23*, *169*, *189* and

Table 3 Others species mRNA *tex* gene expression and sequence homology

TEX gene number	Other vertebrates expression				Other animal models		
	Other mammals		Bird	Reptile	Sequence homology (%) (a: amino acid or n: nucleotid sequence)		
	Expression	Highest tissu mRNA level			Drosophila	Caenorhabditis elegans	Saccharomyces cerevisiae
1	Yes	NP	Yes	Yes	64.29 (n)	33 (a)	Non
2	Yes	Testis	Yes	Yes	21 (a)	26 (a)	18 (n)
4	Yes	NP	Yes	Yes			
6	Yes	Testis	Yes	Yes	42(n)	37.82(n)	20(n)
8	No		Yes	Yes	No	No	35(n)
9	Yes	Testis	Yes	Yes	20 (a)	No	No
10	Yes	Testis	Yes	Yes	26 (a)	No	29%
11	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
12	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
13A	Yes	Testis	No	No	22 (n)	No	11 (n)
13B	Yes	Testis	No	No	16 (n)	No	9 (n)
13C	Yes	Testis	No	No	20 (n)	No	9 (n)
13D	Yes	Testis	No	No	19 (n)	No	8 (n)
14	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
15	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
16	Yes	Testis	No	No			
169	No		No	No			
17	No		No	No			
18	Yes	NA	Yes	No			
189	No		No	No			
19	Yes	Testis	No	No	No	No	No
19.1	Yes	Testis	No	No			
19.2	Yes	Testis	No	No			
20	No		No	No			
21	Yes	Testis	No	No			
21P	No						
22	Yes	Testis	No	No	No	No	No
23	No		No	No			
24	Yes	Testis	No	No			
26	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
26-AS1	No		No	No	No	No	No
261	Yes	NP	No	Yes	56.89 (n)	No	34(n)
264	Yes	Kydney	Yes	No	No	No	No
27	Yes	NP	Yes	Yes	16(n)	25(n)	No
271	No		No	No			
28	Yes	Testis	Yes	Yes	13(n)	14(n)	No
28P1	No		No	No			
28P2	No		No	No			
29	Yes	Testis	No	No	No	No	No
292	Yes	NP	Yes	Yes	41.5 (n)	17,0 (n)	41.14 (n)
30	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
33	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
34	Yes	Testis	No	No	No	No	No
35	Yes	Testis	No	No	No	No	No
36-AS1	No						
36	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
37	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
38	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
39A	Yes	NA	No	No	No	No	No
39B	Yes	NA	Yes	Yes	No	No	No
39C	Yes	NA	No	No	No	No	No
40	Yes	Testis	No	No	No	No	No
41	No						
42	Yes	CNS	Yes	Yes	49.16 (n)	47.56 (n)	47.09 (n)
43	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
44	Yes	Testis	No	No	No	No	No
45	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
46	Yes	Testis	No	No	No	No	No
47	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
48	Yes	Testis	No	No	No	No	No
49	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
50	Yes	Testis	Yes	Yes	No	No	No
51	Yes	Testis	No	No	No	No	No
52	Yes	Testis	No	No	No	No	No
53	Yes	Testis	No	No	No	No	No
54	Yes	Testis	No	No	No	No	No
55	Yes	Testis	No	No	No	No	No
101	Yes	Testis					
190	No		No	No			

Table 4 Mouse *Tex* gene expression in the testis

Mean testis ratio	Highest expression in the testis					Highest expression in other tissues
	1	1 to 0.8	0.8 to 0.6	0.6 to 0.4	below 0.4	
<i>Tex</i> genes	13A, 13B, 16, 17, 19.2, 21, 22, 24, 28, 44, 46, 47, 55	11, 12, 14, 15, 19.1, 26, 29, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 101	189, 20, 30	27	190	169, 23, 261, 264, 271, 292, 42

292, the mouse model is embryo-lethal. For the other genes, transgenic male mice are fertile in the *Tex22*, 33, 35, 36, 37 and 271 models, subfertile in the *Tex 17*, 18 and 40 models, and infertile in the *Tex11*, 12, 14, 15, 19, 19.1, 38 and 101 models. Below, we provide detailed functional information for a small number of these *Tex* genes.

Tex11

The *Tex11* gene codes for a protein with a tetratricopeptide repeat motif (mediating protein-protein interactions) and a meiosis-specific domain Spo22 [27, 28]. The gene has 175 orthologs, and the human vs. mouse sequence identity is 74%. In the mouse, TEX11 protein is observed in the cytoplasm and nuclei of type B spermatogonia, with the highest level in zygotene spermatocytes and a basal level in late pachytene spermatocytes [29]. It is the first X-encoded meiosis-specific factor to have been identified in the mouse. The abundant expression of TEX11 protein in type B spermatogonia and early spermatocytes suggest that *Tex11* has a key role in the early stages of germ cell development. The generation of *Tex11*-deficient mice has enabled researchers to elucidate the encoded protein's role in spermatogenesis. In 2008, Yang et al. generated a *Tex11*-null mice by deleting 27 of the gene's 30 exons. Consequently, spermatogenesis was impaired due to chromosomal asynapsis at the pachytene stage and a low level of crossover formation at the anaphase I stage. *Tex11*-deficient spermatocytes mostly undergo apoptosis at the pachytene stage, while surviving cells display chromosome nondisjunction at the first meiotic division - causes cell death and male infertility [30]. In another study, Adelman et al. generated a *Tex11* mutant strain by deleting gene exon 3, resulting in a frameshift and a termination codon. They found that the mutant males exhibited delayed repair of double-strand breaks (DSBs) in spermatocytes. DSB repair and chromosome synapsis are essential for genetic integrity; their dysfunction can cause various diseases, such as infertility [29]. *Tex11* is currently considered to be a constituent of the meiotic nodules involved in recombination and that interact with *Sycp2* (a component of the synaptonemal complex) [30].

Tex12

Tex12 is conserved among vertebrates. It encodes a 14.1 kDa meiosis-specific protein that does not contain any

known protein domains. *Tex12* is specifically located in the central element structure of the synaptonemal complex and is strongly expressed in spermatocytes and spermatids during meiotic cell division exclusively [31, 32]. The gene codes for two transcripts (*Tex12-201* and *Tex12-201*) and has 116 orthologs. The human and mouse deduced open reading frames code for a 123-residue protein with 86% identity. *Tex12*-null mice are infertile. Males show a failure of chromosomal synapsis, whereas females show the loss of ovarian follicles. It has further been demonstrated that *Tex12* is a member of the synaptonemal complex, which comprises eight proteins: SYCP1-3, SYCE1-3, *tex12* and SIX6OS1 [33].

Tex13

Tex13 is an X-linked gene expressed exclusively in male germ cells. The *Tex13* family has 4 members. Wang et al. identified the first two human orthologs (*TEX13A* and *B*) in 2001 [7]. The degree of human vs. mouse nucleotide sequence identity for *Tex13* varies from one database to another. Lastly, 4 *Tex13* genes have been identified: according to Profile Alignment software (<https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>), the percentage nucleotide sequence identity is 50% for *Tex13A*, 54% for *Tex13B*, 30% for *Tex13C*, and 32% for *Tex13D*. According to the UniProt database (www.uniprot.org/), the percentage is 23% for TEX13A, 31% for TEX13B, 6% for TEX13C, and 8% for TEX13D. The location of TEX13 proteins within germ cells is nuclear. Using a mouse testicular teratoma cell line (considered to possess the characteristics of male germ cells), Kwon et al. [34] demonstrated that TEX13 expression is regulated in a stage-specific manner at the translational level. The protein migrates first to the nuclei of spermatogenic cells and then to the redundant nuclear envelope of the spermatozoon during spermiogenesis. It is found in mature sperm [34]. Remarkably, TEX13 was found to possess transcriptional repressor activity; its overexpression in GC-2 cells altered the expression levels of 130 genes, suggesting that TEX13 might have a role in transcriptional regulation during spermatogenesis [34]. Lastly, *Tex13* was the first gene shown to be transcribed in spermatogonia and whose transcripts are then stored in a translationally inactive state until the late meiotic stage. Male mice hemizygous for a *Tex13a* or *Tex13b*-null allele exhibit normal fertility.

Tex14

Tex14 codes for a testis-specific protein. The open reading frame's predicted 1450 amino acid sequence consists of an ankyrin repeat domain and a protein kinase-C domain. It shares 64% amino acid sequence identity with the predicted human TEX14 protein [35]. TEX14 is an essential component of male and female embryonic intercellular bridges. The protein is strongly expressed in the testis and, more specifically, in seminiferous duct cells (Sertoli cells, spermatogonia, spermatocytes, and spermatids) [35]. It is required for both the formation of intercellular bridges during meiosis and kinetochore-microtubule attachment during mitosis. TEX14 acts by promoting the conversion of midbodies into intercellular bridges [35]. *Tex14*-null adult male mice are sterile, while females are fertile [36]. *tex14*-null males lacked intercellular bridges that connect differentiating germ cells, and so spermatogenesis did not progress beyond the first meiotic division. TEX14 is essential for the maintenance of stable intercellular bridges in gametes of both sexes but their loss specifically impairs male meiosis. Although a low number of oocytes are present in *Tex14*-null neonatal ovaries, females are fertile [36].

Tex15

Tex15 codes for a serine-rich protein in the mouse and a 3176 amino acid protein in the human (sequence identity: 47%) [37]. *Tex15* gene is expressed in spermatogonia and early spermatocytes. Its expression is down-regulated in pachytene spermatocytes and abundant in postmeiotic germ cells [25]. *Tex15*-null females are fertile, whereas males are sterile with a dramatically reduced testis size, and a complete lack of pachytene spermatocytes and postmeiotic germ cells [37]. During spermatogenesis, *Tex15* encodes for a testis-specific protein required for normal chromosome synapsis and meiotic recombination in germ cells. It is also necessary for DNA DSBs (double-strand breaks) repair. TEX15 might be functionally active at different stages in spermatogenesis. It has been postulated that TEX15 functions downstream of DSB repair by SPO11 (a subunit of a DNA topoisomerase VI-like protein complex that is essential for meiotic recombination) but upstream of DSB repair by RAD51 (RecombinaseA-like 51) and DMC1 (DNA meiotic recombinase 1) during the meiotic recombination [37]. It was recently reported that during spermatogenesis, TEX15 binds to MILI - a member of the P-element induced wimpy testis in *Drosophila* (PIWI) family and that is required for germ cell differentiation. TEX15 silences transposable elements that escape the first round of de novo genome methylation in male germ cells [38]. It has been postulated that TEX15 is an essential epigenetic regulator that might operate as a nuclear effector of MILI by silencing

transposable elements through DNA methylation. It has also been reported that in fetal gonocytes, TEX15 interacts with MIWI2 (another PIWI family member) and is required for piwi-interacting-RNA-directed de novo DNA methylation of transposons [39].

Tex18

Tex18 is a small gene identified first in the mouse by Wang et al. It has a single 240 bp exon and is specifically expressed in male germ cells. The encoded protein does not have any identified domains. A human ortholog of *Tex18* has not yet been identified [40]. It was later confirmed that *Tex18* is expressed in spermatogonia and then in other stages of male germ cell development [40]. Male *Tex18*-null mice are subfertile because of abnormal sperm morphology and reduced motility - a phenotype known as asthenoteratozoospermia. Spermatid maturation is unsynchronized and partially impaired in the seminiferous tubules, suggesting that *Tex18* is predominantly expressed during spermatid differentiation.

Tex19

Tex19 is a mammal-specific duplicate gene (since renamed Tex19.1 and Tex19.2) found in the mouse and rat. According to the UniProt database, *tex19.1* expression in the embryo decreases after murine embryonic stem and germ cell differentiation. At later stages of development, Tex19 expression is limited to the germ line. *tex19.1* transcripts have also been detected in mouse pluripotent stem cells. It is thought that *tex19.1* encodes a protein expressed solely in germ cells and pluripotent cells. Male *Tex19.1*-null mice are infertile, with a defect in meiotic chromosome synapsis, the persistence of DNA DSBs during meiosis, and a loss of post-meiotic germ cells. It was further demonstrated that TEX19.1 [41] and its paralog TEX19.2 [42] interact with PIWI proteins in mouse adult testis to repress transposable genetic elements and maintain genomic stability through successive generations. Furthermore, TEX19.1 was shown to promote Spo11-dependent recombination in mouse spermatocytes [42]. Placental expression of *Tex19.1* has also been observed [43]. Accordingly, *Tex19.1*-null mouse embryos exhibit intra-uterine growth retardation and have small placentas. The observation that mobilization of LINE-1 (Long interspersed nuclear element 1) retrotransposons is restricted by TEX19.1 in mouse embryonic stem cells [44] may explain the placental dysfunction and small size. Lastly, it was recently reported that TEX19.1 maintains acetylated SMC3 (Structural Maintenance of Chromosome 3) and sister chromatid cohesion in postnatal oocytes and prevents aneuploidy [45].

Tex27 (Zfand3: zinc finger an1 domain-containing protein 3)

Tex27 is exclusively expressed in adult mouse testis. It codes for a protein containing a zinc-finger domain in the carboxy terminal region and a transactivation domain in the amino terminal region. TEX27 may be a transcription factor that is preferentially expressed in postmeiotic cells during mouse spermatogenesis [46]. In bird and reptile models, it was reported that the gene codes for two different transcripts: a short form mainly expressed in the testis, and a long form in the ovary. Sequence analysis revealed an extra exon in the genomic structures of the avian and reptilian *ZFAND3* genes. TEX27's physiological functions in the testis and ovary are thought to differ in terms of germ cell maturation and regulatory mechanisms [47]).

Tex33

Tex33 expression is testis-specific; the encoded protein is found in the cytoplasm of round spermatids but much less in elongated spermatids [48]. Given that spermatogenesis is normal in male *tex33*-null mice, *Tex33* might not be essential [49].

Tex36

Tex36 expression is testis-specific but male *Tex36*-null mice are fertile with no observable defects in reproductive organs, suggesting that TEX36 is also dispensable to spermatogenesis [50].

Tex37

Similarly to *Tex36*, male *Tex37* null mice are fertile and have no detectable defects (vs. wild-type mice) in the testis/body weight ratio, epididymal sperm count, and testicular and epididymal histology [51].

Tex40

Tex40 protein (also referred to as CATSPERZ) is located in the principal piece of the flagellum. It may represent a late evolutionary adaptation that maximizes fertilization inside the female mammalian reproductive tract [52]. *Tex40*-null mice are fertile and have a normal sperm count and a normal sperm morphology. However, the flagellum is rigid – impairing motility and leading to reduced fertility in vivo and in vitro. The human CATSPERZ and murine *Catsperz* are both auxiliary subunits of sperm calcium channel pore-forming proteins involved in the activation of spermatozoon motility. It was recently suggested that downregulation of this protein is the cause of the low sperm motility observed in asthenozoospermic males [53].

Tex101

Tex101 is mainly expressed in testis (from spermatogonia to spermatids) but it also transcribed during

oogenesis. Mouse TEX101 is a testicular-germ-cell-specific protein predominantly located on the plasma membrane of germ cells during gametogenesis. TEX101 is one of the 29 glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in the mouse testis, where it might regulate ion channels through CATSPERZ (cation channel, sperm-associated, auxiliary subunit zeta). When spermatogenesis in the testis is complete, the TEX101 protein remains on the sperm surface - including the tail portion. TEX101 is then cleaved from the sperm surface and released into the seminal fluid and is no longer detectable in male germ cells. The protein interacts with various molecules during the post-testicular maturation of spermatozoa, including some members of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family [54]. In humans, TEX101's role and interactome have yet to be determined.

Although *Tex101*-null mice produce spermatozoa and oocytes with a normal morphology, males are infertile. Sperm physiology and motility are abnormal, which impair sperm migration into the oviduct and hinder the acrosome reaction. TEX101 is therefore essential for male fertility; it has been suggested that TEX101 operates as a cell surface chaperone involved in the maturation of proteins required for sperm migration and sperm-oocyte interaction (such as Adam3) [49–52, 54–57].

Tex261

Tex261 is highly expressed in adult testis in general and in the Sertoli cells in particular. It is first expressed after 15 days of post-natal life, which coincides with the presence of pachytene cells from the first wave of meiosis during spermatogenesis. *TEX261* expression is not restricted to testis (Tables 1 and 2). It is presumably related to (but distinct from) the steroidogenic acute regulatory gene [58]. More recently, *TEX261* was reported to modulate the excitotoxic cell death induced by activation of the N-methyl-D-aspartate receptor - a calcium-permeable ionotropic receptor that has a role in many neurologic disorders [59]). *Tex261*-null mice show defects of the skeleton, immune system, growth/size/body, and adipose tissue (Table 2).

Tex264

Although *TEX264* expression has been observed in seminiferous duct cells and Leydig cells (according to the Human Protein Atlas), there are no other data on its expression in the testis. In mammalian cells, *TEX264* is a major receptor for selective reticulophagy - a process responsible for the specific sequestration of components inside the endoplasmic reticulum alongside the associated ribosomes [60].

Tex292

Tex292 is also referred to as *Utp4*. At present, the only data on *TEX292* expression in testis corresponds to a report of expression in seminiferous duct cells and Leydig cells. *Tex292* inactivation is embryonic-lethal [61]. The only available data relates to processes or cell types not associated to spermatogenesis or germ cells [61].

Human *TEX* gene expression and defects

mRNA expression

Of the 49 *TEX* genes expressed in humans, 13 are testis-specific and 27 show a high expression level in testis, with a mean testis ratio above 0.4 (between 0.411 and 0.998). Of the 9 remaining *TEX* genes, 4 are most strongly expressed in the testis for 4, 3 are more strongly expressed in thyroid or spleen, and 2 are pseudogenes. Data are summarized in Table 5 and detailed in Table 1.

Protein expression

Protein expression data remains scarce. For 14 *TEX* genes, the protein expression pattern is similar to the mRNA expression pattern. A testis-specific protein isoform has been identified for 29 *TEX* genes, and expression data are missing for 14 other genes. An ovary-specific protein isoform has only been identified for *TEX11*. A highly variable testicular location has been reported for 21 *TEX* genes (Table 1), although germinal cell expression (from spermatogonia to spermatids) has been reported in 19 cases. Eight proteins are referenced in the OMIM database (<https://omim.org/>), and defects in 3 of the coding genes (*TEX11*, 14 and 15) have been linked to phenotypes.

TEX genes, dysregulation of spermatogenesis, and a predisposition to infertility

Thirteen *TEX* genes are now referenced in the OMIM database, and 3 have been linked to a specific phenotype. Here, we report only the data associated with gene defects (Tables 6 and 7).

TEX11 (OMIM 300311) [15–20, 62, 63]

TEX11 (on Xq13.1) is currently the most frequently reported gene as being associated with azoospermia [62]. Using an X-chromosome high-resolution microarray, Yatsenko et al. identified the loss of *TEX11* exons 9–11

(607del237bp) in two azoospermic patients with homogeneous or mixed meiotic arrest (47). This in-frame genomic deletion predicted a protein lacking 79 amino acids in the highly conserved sporulation domain SPO22. Additional *TEX11* missense and splicing variants were found in 2.4% of the azoospermic patients but not in any of the 384 men with normal sperm concentrations [19]. Forty variants were subsequently identified by sequencing *TEX11* exons 2 to 30 and the flanking intronic regions in a large cohort of infertile men with nonobstructive azoospermia ($n = 246$) and in fertile controls ($n = 175$), [20]. Twenty-one of these variants were singletons (i.e. each was observed in one individual only), while the remaining 19 were observed in 2 or more infertile men and/or fertile controls. Eighteen were identified solely in patients with azoospermia. The variants include exonic missense mutations, exonic silent mutations, exonic frameshift mutations, and intronic mutations. The researchers concluded that *TEX11* variants were detected with a significantly higher frequency in men with spermatogenic failure than in controls (7.3% versus 1.7%, respectively; $p = 0.007$) [20]. However, the study did not find any differences between pathologic and benign variants. Since then, additional *TEX11* missense variants or deletions have been reported [47,4852, 53]; suggesting that this X-linked gene has a major role on azoospermia. Recently, low *TEX11* expression was reported in a man with Sertoli-cell-only (SCO) syndrome [2]. *TEX11* is linked to spermatogenic failure, X-linked, 2 syndrome in the OMIM database (OMIM 309120).

In 2015, Zhang et al. explored the possible association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *TEX11* and idiopathic male infertility [63]. The homozygous rs6525433 polymorphism genotype was significantly associated with general infertility (odds ratio (OR) = 1.517, 95% confidence interval (CI):1.070–2.150, $p = 0.019$) and oligozoospermia (OR = 1.858, 95% CI: 1.082–3.192, $p = 0.023$) - indicating that the rs6525433 polymorphism has a role in male infertility. The non-synonymous SNP rs6525433 neutralizes the charged amino acid at position 130 of the *TEX11* protein (K130A), which might have a negative effect on its structure. No association between the *TEX11* rs4844247 SNP and male infertility was observed. However, carriers of both rs6525433 C and rs4844247 T had an increased risk of infertility (95% CI: 1.042–2.542) [63].

Table 5 Human *TEX* gene expression in the testis

Mean testis ratio	Highest expression in the testis					Highest expression in other tissues
	1	1 to 0.8	0.8 to 0.6	0.6 to 0.4	below 0.4	
<i>TEX</i> genes	13A, 13B, 13C, 13D, 19, 28, 33, 36-AS1, 36, 37, 51, 55	12, 14, 26-AS1, 34, 35, 38, 39A, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 101	11, 15, 22, 26, 29, 39B, 41	21P, 30, 39C	264, 27, 292, 52	261, 39C, 42

Table 6 Variants of *TEX* genes identified solely in males with azoospermia and/or infertility

<i>TEX</i> gene	Study	Nucleotide change	Protein change	Type of mutation	Exon/ intron	Number of males with the alteration
<i>TEX11</i>	Krausz et al., 2020 [15]	c.84_651del	p.28del189aa	deletion	Exon 4–9	1
	Cannarella et al., 2020 [16]	c.776C → T	p.Thr259Ile	missense mutation	Exon 9	1
		c.2288 T → C	p.Val763Ala	missense mutation	Exon 26	1
	Sha et al., 2018 [17]	c.2653G → T	p.W856C	missense mutation	Exon 29	2 brothers
	Nakamura et al., 2017 [18]	c.511A → G	p.Met171Val	missense mutation	Exon 8	1
	Yatsenko et al., 2015 [19]	c.450C → T	p.A150A	splicing mutation	Exon 7	1
		c.511A → G	p.M171V	missense mutation	Exon 8	1
		c.652del237bp	p.218del79aa	deletion	Exons 10–12	2
	Yang et al., 2015 [20]	c.792 + 1G → A	p.L264spl d	splicing mutation	Intron 11	1
		c.1837 + 1G → C	p.R612spl d	splicing mutation	Intron 22	1
		c.2092G → A	p.A698T	missense mutation	Exon 25	1
		c.-17 T → C	/	intronic alteration	Intron 3	1
		c.-48G → A	/	intronic alteration	Intron 5	1
		c.349 T → A	p.W117R	missense mutation	Exon 6	1
		c.405C → T	/	silent mutation	Exon 6	1
		c.424G → A	p.V142I	missense mutation	Exon 7	1
		c.466A → G	p.M152V	missense mutation	Exon 7	1
		c.515A → G	p.Q172R	missense mutation	Exon 7	1
		c.731C → T	p.T244I	missense mutation	Exon 10	1
		c. + 42C → A	/	intronic alteration	Intron 10	1
		c.-28 T → C	/	intronic alteration	Intron 12	1
		c.-64G → A	/	intronic alteration	Intron 15	1
		c.1258Ins (TT)	1258GATG → TTGG TA	frameshift mutation	Exon 16	1
		c. + 16A → G	/	intronic alteration	Intron 20	1
		c.-1G → A	/	alteration of splicing acceptor site	Intron 21	1
		c.-37A → G	/	intronic alteration	Intron 22	1
		c.-44C → T	/	intronic alteration	Intron 23	1
		c. + 119G → A	/	intronic alteration	Intron 24	1
	c.2243 T → C	p.V748A	missense mutation	Exon 26	1	
	c.2319 T → C	/	silent mutation	Exon 27	1	
c.-55A → C	/	intronic alteration	Intron 27	1		
c.-44A → G	/	intronic alteration	Intron 28	1		
<i>TEX14</i>	Krausz et al., 2020 [15]	c.(554 + 1_555–1)_ (3378 + 1_3378–1)del	p.185del941aa	partial deletion	Exon 6–21	1 compound heterozygote
		c.2303_2306del	p.Gln768ArgfsTer31	frameshift deletion	Exon 14	
		c.3454C > T	p.Arg1152Ter	stop gain	Exon 21	1
	Araujo et al., 2019 [21]	c.727C > G	p.Gln243Glu	missense mutation	Exon 7	1 compound heterozygote
		c.4297G > A	p.Glu1433Lys	missense mutation	Exon 31	
	Fakhro et al., 2018 [22]	c.C254A	p.Arg85Leu	missense mutation	/	2 brothers
		c.555-5 T > G	/	splice site mutation	/	1
		/	p.Ser1255fs	frameshift mutation	/	1

Table 6 Variants of *TEX* genes identified solely in males with azoospermia and/or infertility (Continued)

<i>TEX</i> gene	Study	Nucleotide change	Protein change	Type of mutation	Exon/intron	Number of males with the alteration
<i>TEX15</i>	Gershoni et al., 2017 [23]	c.2668-2678del	early stop codon	frameshift deletion	Exon 16	2 brothers
	Cannarella et al., 2020 [16]	c.7118G > A	p.Ser2373Asn	missense mutation	Exon 8	1
	Araujo et al., 2019 [21]	c.7118G > A	p.Ser2373Asn	missense mutation	Exon 8	1 compound heterozygote
		c.9223G > A	p.Gly3075Arg	missense mutation	Exon 10	
	Wang et al., 2018 [24]	c.6934G > A	p.R2312X	nonsense mutation	Exon 1	1
	Colombo et al., 2017 [25]	c.2419A > T	p.Lys807*	nonsense mutation	Exon 8	2: brothers (compound heterozygotes)
c.3040delT		p.Ser1014Leufs*5	deletion	Exon 8		
Okutman et al., 2015 [26]	c.2130T > G	p.Y710*	nonsense mutation	Exon 1	3 brothers	

***TEX12* (OMIM 605791)**

As in mice, human *TEX12* is reportedly essential for the synaptonemal complex [33]. Even though low *TEX12* expression has been reported in a patient with SCO syndrome [2, 32], further studies are required to confirm the link between *TEX12* variants and defective spermatogenesis.

***TEX14* (OMIM 605792) [15, 21–23, 64]**

As in mice, human *TEX14* is essential for forming stable intercellular bridges in germ cells [36]. To date, few *TEX14* genetic variants have been linked to spermatogenesis failure. The first (a 10-bp deletion) variant was identified in 2017 in two infertile brothers with nonobstructive azoospermia from a consanguineous Iraqi Jewish family [23]. The variant leads to a frameshift in the *TEX14* coding region and thus results in an early stop codon and a truncated protein. Other deleterious variants have been associated with infertility, maturation arrest, and SCO phenotypes [22, 64]. Taken as a whole, these data suggests that alterations in *TEX14* gene has a major impact on the onset of azoospermia. *TEX14* is now also listed in the OMIM database as being linked to

spermatogenic failure 23 syndrome (OMIM 617707). Furthermore, low *TEX14* expression has been reported in a patient with the SCO syndrome [2].

***TEX15* (OMIM 605795) [2, 26, 37, 63, 65, 66]**

The first nonsense mutation (leading to a premature stop codon) in the *TEX15* locus was identified by exome sequencing in a consanguineous Turkish family [26]. The mutation co-segregated with the infertility phenotype; two brothers with nonobstructive azoospermia and an oligozoospermic sibling were homozygous for the mutation. These males presented a drastically reduced testicular size (by more than 50%) and maturation arrest at the primary spermatocyte stage [26]. Other non-consanguineous siblings with nonobstructive azoospermia and a low testicular volume have been found to be compound heterozygotes for deleterious *TEX15* variants [25]. To date, few damaging variants have been identified (Table 4). *TEX15* has now been linked to spermatogenic failure 25 syndrome in the OMIM database (OMIM 617960). Furthermore, low *TEX15* expression has been reported in a man with SCO syndrome [2].

Table 7 Polymorphisms in *TEX* genes associated with azoospermia and/or infertility, according to the literature

SNP ID	Study	<i>TEX</i> gene	Nucleotide change (according to transcript variant 1)	Protein change	Gnomad (https://gnomad.broadinstitute.org/) frequency in the general population	Significantly associated with male infertility	Population
rs6525433	Zhang et al., 2015 [60]	<i>TEX11</i>	c.389A > G	p.Lys130Arg	0.125	Yes	Chinese
rs4844247			c.1351G > A	p.Glu451Lys	0.103	No	
						Yes	
rs323344	Aston et al., 2010 [16]	<i>TEX15</i>	c.5158T > G	p.Leu1720Val	0.148	No	Caucasian
rs323345			c.5081A > G	p.Asn1694Ser	0.168	No	
rs323347	Ruan et al., 2012 [22]		c.1459T > C	p.Cys487Arg	0.255	Yes	Chinese
rs323346			c.4252A > G	p.Ile1418Val	0.251	Yes	
	Zhang et al., 2010 [60]					No	

Various studies have assessed the association between *TEX15* polymorphisms and male infertility. One study did not find an association [65]. In 2015, Ruan et al. analyzed the distribution of SNPs of the *TEX15* gene within a male Chinese Han population. The researchers reported that two genetic variants (rs323346 and rs323347) in *TEX15* gene conferred susceptibility to spermatogenic failure [66]. However, this finding was not confirmed by Zhang et al. for rs323346 [63].

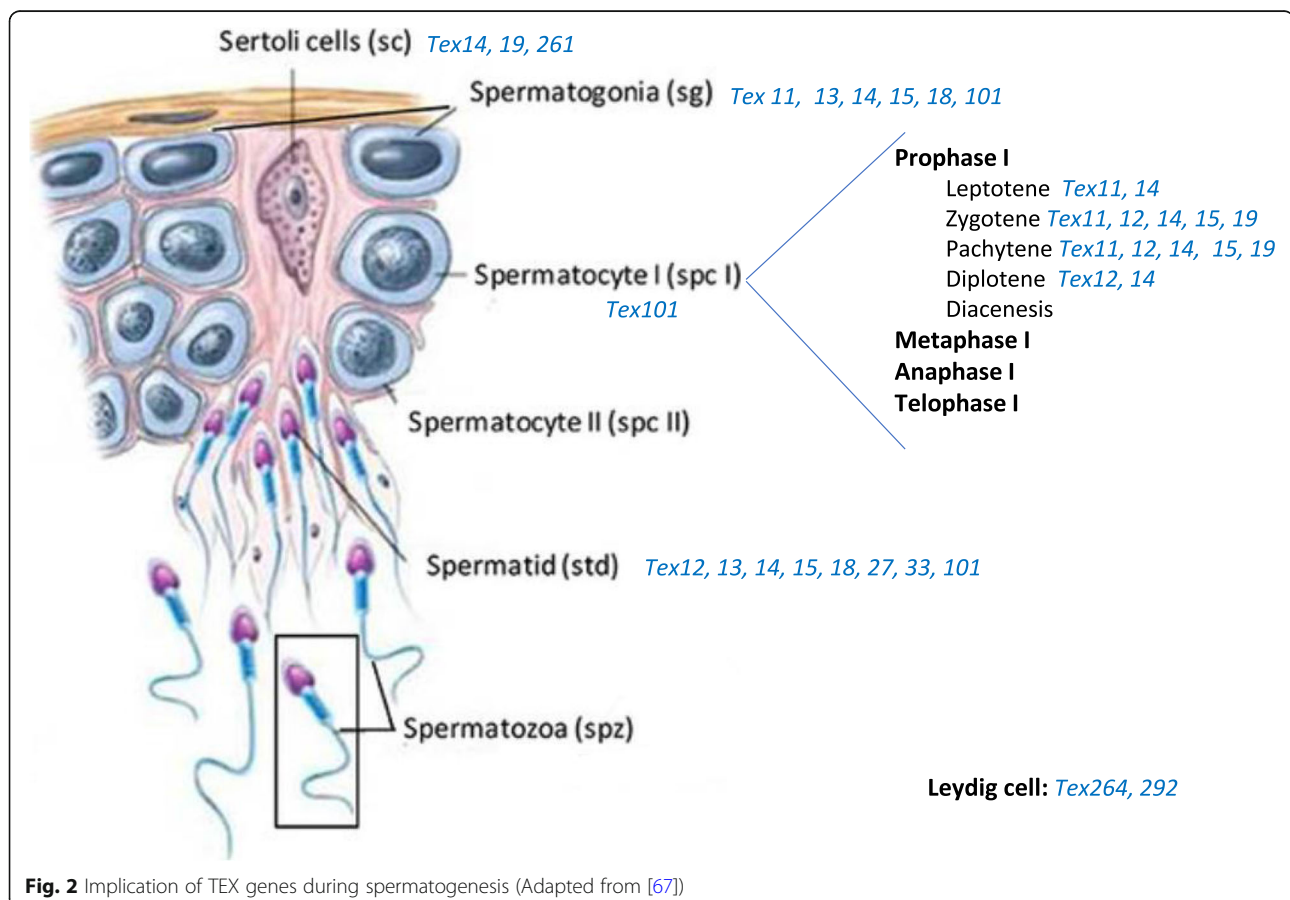
TEX101 (OMIM 612665)

In 2013, *TEX101* was first suggested as a biomarker for the differential diagnosis of azoospermia [57]. Schiza et al. used an ELISA assay to (i) evaluate the seminal plasma level of *TEX101* and the success of vasectomy, (ii) stratify forms of azoospermia, and (iii) better select patients for sperm retrieval. The same group used differential proteomic profiling to evaluate the impact of the common *TEX101* missense variant rs35033974 in infertile men with various etiologies. They reported that 8 cell surface proteins and 9 testis-specific secreted proteins were significantly down-regulated in four patients who were homozygous for rs35033974. The researchers

have also found that the seminal plasma level of *TEX101* in heterozygous males was five times lower ($p = 0.0005$) than in controls [57]. Schiza et al. concluded that the *TEX101* rs35033974 variant could then be taken into account in diagnosis of infertility.

Conclusion

As expected, *TEX* genes appear to have a major role in reproduction in general and in spermatogenesis in particular. *As the only common feature of TEX genes is their expression in the testis, the genes are involved in many different pathways and functions (Fig. 2) in testis cells, germ cells (from spermatogonia to spermatids), Sertoli cells, and Leydig cells.* This is true not only in humans but also in all mammals such as the mouse and the rat. In the future, cumulative data on the human *TEX* genes' physiological functions and pathophysiological dysfunctions should become available. Furthermore, further studies of the functional effects of natural knockouts or knockdowns in humans are necessary for defining the list of essential and nonessential testis-specific genes and proteins and thus advancing the biology of human reproduction.



Abbreviations

CAPZA 3: Capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 3; CATS PERZ: CATion channel, SPERm-associated, auxillary subunit Zeta; cDNA: Complementary DNA; cM: Centimorgan; DMC1: DNA Meiotic reCombinase 1; DSB: Double-strand breaks; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; FANTOM: Functional annotation of the mammalian genome; HTNS: High in testis but not specific; KO: Knock out; MIL: Miwi-like; MIWI2: (Another PIWI family member); MT: Majority testis; NA: Non available; NP: No predominance; OMIM: Online mendelian inheritance in man; PIWI: P-element induced wimpy testis; RAD51: RAD51 Recombinase; SCO: Sertoli-cell-only; SIX6OS1: Six6 opposite strand transcript 1; SMC3: Structural maintenance of chromosomes protein 3; SNP: Single nucleotide polymorphisms; SSH: Suppression subtractive hybridization; Sycp2: Synaptonemal complex protein 2; SYCP1–3: Synaptonemal complex protein 1–3; SYCE1–3: Synaptonemal complex central element protein 1–3; Tctex: T-complex testis-expressed; Tex: Testis expressed; TS: Testis specific; Utp4: U3 small nucleolar RNA-associated protein 4 homolog; Zfand3: Zinc finger AN1 domain-containing protein 3

Acknowledgements

Jean-Luc VLOTTE for his comments.

Authors' contributions

HB, FG, EH: performed the bibliography screening, wrote the paper; BMP: designed the paper and reviewed the paper, FV: designed the paper and wrote the paper. The author (s) read and approved the final manuscript.

Funding

None.

Availability of data and materials

not applicable.

Ethics approval and consent to participate

not applicable.

Consent for publication

not applicable.

Competing interests

None.

Author details

¹Département de Génétique, CHI de Poissy St Germain en Laye, Poissy, France. ²Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, F-78350 Jouy-en-Josas, France. ³Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, F-94700 Maisons-Alfort, France.

Received: 2 November 2020 Accepted: 14 February 2021

Published online: 22 April 2021

References

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:37.
2. Boroujeni PB, Sabbaghian M, Totonchi M, Sodeifi N, Sarkardeh H, Samadian A, et al. Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22:185–92.
3. Shamsi MB, Kumar K, Dada R. Genetic and epigenetic factors: role in male infertility. *Indian J Urol*. 2011;27:110–20.
4. Jan SZ, Vormer TL, Jongejan A, Röling MD, Silber SJ, de Rooij DG, et al. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development*. 2017;144:3659–73.
5. Eddy EM. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:103–28.
6. Lu Y, Oura S, Matsumura T, Oji A, Sakurai N, Fujihara Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice†. *Biol Reprod*. 2019;101:501–11.
7. Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*. 2001;27:422–6.
8. Yeom YI, Abe K, Bennett D, Artzt K. Testis-/embryo-expressed genes are clustered in the mouse H-2K region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:773–7.
9. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13:397–406.
10. Asmann YW, Necela BM, Kalari KR, Hossain A, Baker TR, Carr JM, et al. Detection of redundant fusion transcripts as biomarkers or disease-specific therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Res*. 2012;72:1921–8.
11. Brawand D, Soumillon M, Necsulea A, et al. The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature*. 2011;478:343–8.
12. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X, Gu H, et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep*. 2013;3:2179–90.
13. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014;509:575–81.
14. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, et al. *Ensembl* 2020. *Nucleic Acids Res*. 2020;48:D682–8.
15. Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med*. 2020;22:1956–66.
16. Cannarella R, Condorelli RA, Duca Y, La Vignera S, Calogero AE. New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Hum Genet*. 2019;138:125–40.
17. Sha Y, Zheng L, Ji Z, Mei L, Ding L, Lin S, Wang X, Yang X, Li P. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Med Genet*. 2018;19:63.
18. Nakamura S, Miyado M, Saito K, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, et al. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology*. 2017;5:824–31.
19. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Okszevska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, Yatsenko SA, Kliesch S, Schlatt S, Tüttelmann F. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med*. 2015;372:2097–107.
20. Yang F, et al. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med*. 2015;7:1198–210.
21. Araujo TF, Friedrich C, Grangeiro CHP, Martelli LR, Grzesiuk JD, Emich J, Wyrwoll MJ, Kliesch S, Simões AL, Tüttelmann F. Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: challenges in variant assessment and validating genes. *Andrology*. 2020;8:434–41.
22. Fakhro KA, Elbardisi H, Arafa M, Robay A, Rodriguez-Flores JL, Al-Shakaki A, Syed N, Mezey JG, Abi Khalil C, Malek JA, Al-Ansari A, Al Said S, Crystal RG. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med*. 2018;20:1365–73.
23. Gershoni M, et al. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med*. 2017;19:998–1006.
24. Wang X, Jin HR, Cui YQ, Chen J, Sha YW, Gao ZL. Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. *Asian J Androl*. 2018;20:101–2.
25. Colombo R, Pontoglio A, Bini M. Two novel TEX15 mutations in a family with nonobstructive azoospermia. *Gynecol Obstet Investig*. 2017;82:283–6.
26. Okutman O, et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*. 2015;24:5581–8.
27. Blatch GL, Lässle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*. 1999;21:932–9.
28. Chelysheva L, Gendrot G, Vezon D, Doutriaux MP, Mercier R, Grelon M. Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*. 2007;3:e83.
29. Adelman CA, Petrini JH. ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000042 15.
30. Yang F, Gell K, van der Heijden GW, Eckardt S, Leu NA, Page DC, et al. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev*. 2008;22:682–91.
31. Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Hoog C. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci*. 2006;119:4025–32.

32. Boroujeni PB, Sabbaghian M, Totonchi M, Sodeifi N, Sarkardeh H, Samadian A, et al. Analysis of expression level of TEX12 gene in testis tissues of severe Oligozoospermic and non-obstructive Azoospermic men. *Int J Fertil Steril*. 2013;7:198.
33. Dunne OM, Davies OR. A molecular model for self-assembly of the synaptonemal complex protein SYCE3. *J Biol Chem*. 2019;294:9260–75.
34. Kwon JT, Jin S, Choi H, Kim J, Jeong J, Kim J, Cho C. TEX13 is a novel male germ cell-specific nuclear protein potentially involved in transcriptional repression. *FEBS Lett*. 2016;590:3526–37.
35. Wu MH, Rajkovic A, Burns KH, Yan W, Lin YN, Matzuk MM. Sequence and expression of testis-expressed gene 14 (Tex14): a gene encoding a protein kinase preferentially expressed during spermatogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2013;3:231–6.
36. Greenbaum MP, Iwamori N, Agno JE, Matzuk MM. Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility. *Biol Reprod*. 2009;80:449–57.
37. Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*. 2008;180:673–9.
38. Yang F, Lan Y, Pandey RR, Homolka D, Berger SL, Pillai RS, et al. TEX15 associates with ML1 and silences transposable elements in male germ cells. *Genes Dev*. 2020;34:745–50.
39. Schöpp T, Zoch A, Berrens RV, Auchynnikava T, Kabayama Y, Vasiliauskaitė L, et al. TEX15 is an essential executor of MIWI2-directed transposon DNA methylation and silencing. *Nat Commun*. 2020;11:3739.
40. Jaroszynski L, Dev A, Li M, Meinhardt A, de Rooij DG, Mueller C, et al. Asthenoteratozoospermia in mice lacking testis expressed gene 18 (Tex18). *Mol Hum Reprod*. 2007;13:155–63.
41. Ollinger R, Childs AJ, Burgess HM, Speed RM, Lundegaard PR, Reynolds N, et al. Deletion of the pluripotency-associated Tex19.1 gene causes activation of endogenous retroviruses and defective spermatogenesis in mice. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000199.
42. Crichton JH, Playfoot CJ, MacLennan M, Read D, Cooke HJ, Adams IR. Tex19.1 promotes Spo11-dependent meiotic recombination in mouse spermatocytes. *PLoS Genet*. 2017;13:e1006904.
43. Celebi C, van Montfoort A, Skory V, Kieffer E, Kuntz S, Mark M, Viville S. Tex 19 paralogs exhibit a gonad and placenta-specific expression in the mouse. *J Reprod Dev*. 2012;58:360–5.
44. MacLennan M, Garcia-Canadas M, Reichmann J, Khazina E, Wagner G, Playfoot CJ, Salvador-Palomeque C, Mann AR, Peressini P, Sanchez L, et al. Mobilization of LINE-1 retrotransposons is restricted by Tex19.1 in mouse embryonic stem cells. *Elife*. 2017;6:e26152.
45. Reichmann J, Dobie K, Lister LM, Crichton JH, Best D, MacLennan M, Read D, Raymond ES, Hung CC, Boyle S, Shirahige K, Cooke HJ, Herbert M, Adams IR. Tex19.1 inhibits the N-end rule pathway and maintains acetylated SMC3 cohesin and sister chromatid cohesion in oocytes. *J Cell Biol*. 2020;219:e201702123.
46. de Luis O, López-Fernández LA, del Mazo J. Tex27, a gene containing a zinc-finger domain, is up-regulated during the haploid stages of spermatogenesis. *Exp Cell Res*. 1999;249:320–6.
47. Otake S, Endo D, Park MK. Molecular characterization of two isoforms of ZFAND3 cDNA from the Japanese quail and the leopard gecko, and different expression patterns between testis and ovary. *Gene*. 2011;488:23–34.
48. Kwon JT, Ham S, Jeon S, Kim Y, Oh S, Cho C. Expression of uncharacterized male germ cell-specific genes and discovery of novel sperm-tail proteins in mice. *PLoS One*. 2017;12:e0182038.
49. Zhu Z, Zhang X, Zeng W, Zhao S, Zhou J, Zhou Z, Liu M. Spermatogenesis is normal in Tex33 knockout mice. *PeerJ*. 2020;8:e9629.
50. Park S, Shimada K, Fujihara Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome-edited mice reveal 10 testis-enriched genes are dispensable for male fecundity. *Biol Reprod*. 2020;103:195–204.
51. Khan M, Jabeen N, Khan T, Hussain HMJ, Ali A, Khan R, Jiang L, Li T, Tao Q, Zhang X, Yin H, Yu C, Jiang X, Shi Q. The evolutionarily conserved genes: Tex37, Ccdc73, Prss55 and Nxt2 are dispensable for fertility in mice. *Sci Rep*. 2018;8:4975.
52. Chung JJ, Miki K, Kim D, et al. CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife*. 2017;6:e23082.
53. Sinha A, Singh V, Singh S, Yadav S. Proteomic analyses reveal lower expression of TEX40 and ATP6V0A2 proteins related to calcium ion entry and acrosomal acidification in asthenozoospermic males. *Life Sci*. 2019;218:81–8.
54. Schiza C, Korbakis D, Panteleli E, Jarvi K, Drabovich AP, Diamandis EP. Discovery of a human testis-specific protein complex TEX101-DPEP3 and selection of its disrupting antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17:2480–95.
55. Fujihara Y, Tokuhiko K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:8111–6.
56. Endo S, Yoshitake H, Tsukamoto H, Matsuura H, Kato K, Sakuraba M, et al. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Sci Rep*. 2016;6:23616.
57. Schiza C, Korbakis D, Jarvi K, Diamandis EP, Drabovich AP. Identification of TEX101-associated proteins through proteomic measurement of human spermatozoa homozygous for the missense variant rs35033974. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18:338–51.
58. Lopez-Fernandez, L. A., M. Parraga, and J. del Mazo. 1998. Tex261, a novel gene presumably related but distinct from the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene, is regulated during the development of germ cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 242: 565–569.
59. Taniura H, Iijima S, Kambe Y, Georgiev D, Yoneda Y. Tex261 modulates the excitotoxic cell death induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362:1096–100.
60. An H, Ordureau A, Paulo JA, Shoemaker CJ, Denic V, Harper JW. TEX264 Is an Endoplasmic Reticulum-Resident ATG8-Interacting Protein Critical for ER Remodeling during Nutrient Stress. *Mol Cell*. 2019;74:891–908.e10.
61. Richter A, Mitchell GA, Rasquin A. La cirrhose amérindienne infantile [north American Indian childhood cirrhosis (NAIC)]. *Med Sci*. 2007;23:1002–7.
62. Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Genetic defects in human azoospermia. *Basic Clin Androl*. 2019;29:4.
63. Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61:187–93.
64. Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castan  E, Carrell DT. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod*. 2010;25:1383–97.
65. Plaseski T, Noveski P, Popeska Z, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility. *J Androl*. 2012;33:675–83.
66. Ruan J, He XJ, Du WD, Chen G, Zhou Y, Xu S, Zuo XB, Fang LB, Cao YX, Zhang XJ. Genetic variants in TEX15 gene conferred susceptibility to spermatogenic failure in the Chinese Han population. *Reprod Sci*. 2012; 19:1190–6.
67. https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-spermatogenesis-Spermatogenesis-occurs-within-the-seminiferous-tubules_fig2_267753964.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



STAG3 homozygous missense variant causes primary ovarian insufficiency and male non-obstructive azoospermia

Sylvie Jaillard ^{1,2,3,*}, Kenneth McElreavy⁴, Gorjana Robevska¹, Linda Akloul⁵, Farah Ghieh⁶, Rajini Sreenivasan¹, Marion Beaumont³, Anu Bashambo⁴, Joelle Bignon-Topalovic⁴, Anne-Sophie Neyroud⁷, Katrina Bell^{1,8}, Elisabeth Veron-Gastard⁷, Erika Launay³, Jocelyn van den Bergen¹, Bénédicte Nouyou³, François Vialard ^{6,9}, Marc-Antoine Belaud-Rotureau^{2,3,7}, Katie L. Ayers^{1,10}, Sylvie Odent⁵, Célia Ravel^{2,7}, Elena J. Tucker ^{1,10,*}, and Andrew H. Sinclair^{1,10,†}

¹Reproductive Development, Murdoch Childrens Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne, VIC, Australia 3052 ²Univ Rennes, CHU Rennes, INSERM, EHESP, IRSET (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France ³CHU Rennes, Service de Cytogénétique et Biologie Cellulaire, F-35033 Rennes, France ⁴Institut Pasteur, CNRS – UMR_3738, Paris, France ⁵CHU Rennes, Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest, F-35033 Rennes, France ⁶Université Paris-Saclay, UVSQ-INRA-ENVA, UMR-BREED, Montigny le Bretonneux 78180, France ⁷CHU Rennes, Service de Biologie de la Reproduction-CECOS, F-35033 Rennes, France ⁸Bioinformatics, Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne, VIC, Australia 3052 ⁹Fédération de Génétique, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Poissy-St Germain en Laye, Poissy 78300, France ¹⁰The Department of Paediatrics, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia 3052

*Correspondence address. Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne, VIC, Australia and Univ Rennes, CHU Rennes, INSERM, EHESP, IRSET (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France. E-mail: sylvie.jaillard@chu-rennes.fr  <https://orcid.org/0000-0002-0593-0261>; Reproductive Development, Murdoch Childrens Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne, VIC, Australia 3052. elena.tucker@mcri.edu.au  <https://orcid.org/0000-0002-6380-5100>

Submitted on March 24, 2020; resubmitted on May 25, 2020; editorial decision on June 17, 2020

ABSTRACT: Infertility, a global problem affecting up to 15% of couples, can have varied causes ranging from natural ageing to the pathological development or function of the reproductive organs. One form of female infertility is premature ovarian insufficiency (POI), affecting up to 1 in 100 women and characterised by amenorrhoea and elevated FSH before the age of 40. POI can have a genetic basis, with over 50 causative genes identified. Non-obstructive azoospermia (NOA), a form of male infertility characterised by the absence of sperm in semen, has an incidence of 1% and is similarly heterogeneous. The genetic basis of male and female infertility is poorly understood with the majority of cases having no known cause. Here, we study a case of familial infertility including a proband with POI and her brother with NOA. We performed whole-exome sequencing (WES) and identified a homozygous *STAG3* missense variant that segregated with infertility. *STAG3* encodes a component of the meiosis cohesin complex required for sister chromatid separation. We report the first pathogenic homozygous missense variant in *STAG3* and the first *STAG3* variant associated with both male and female infertility. We also demonstrate limitations of WES for the analysis of homologous DNA sequences, with this variant being ambiguous or missed by independent WES protocols and its homozygosity only being established via long-range nested PCR.

Key words: premature ovarian insufficiency / non-obstructive azoospermia / whole-exome sequencing / *STAG3*

Introduction

Premature ovarian insufficiency (POI) represents one of the main causes of female infertility with a prevalence of 1–3%, depending on

population characteristics such as ethnicity. This condition is characterised by the occurrence of menstrual disturbance (primary or secondary amenorrhoea or oligomenorrhoea) for at least 4 months before the age of 40 with high FSH levels (>25 UI/l on two occasions >4 weeks

[†]These authors should be regarded as co-senior authors of this study.

apart) and low oestradiol levels (European Society of Human Reproduction and Embryology <https://www.eshre.eu/>). The mechanism leading to POI can be an impaired formation of primordial follicles leading to a reduced number of their pool, an impaired recruitment and/or an altered maturation of the follicles, and/or an increased follicular atresia (Laissue, 2015). POI can be caused by infections, medical treatments, or metabolic or autoimmune diseases, but often has a genetic basis with over 50 causative genes reported, affecting various processes such as gonadal development, meiosis, DNA repair, folliculogenesis, hormonal signalling, steroidogenesis, metabolism, mitochondrial function and immune regulation (Tucker et al., 2016). Such a genetic cause can be identified in 10–15% of the POI patients (Caburet et al., 2014). Depending on the gene involved, POI can occur as part of a syndromic disorder (e.g. *AIRE*, *ATM*, *FOXL2*) or as an isolated disease (non-syndromic POI: e.g. *NOBOX*, *GDF9*). In order to decipher the genetic heterogeneity of POI, recent studies using massive parallel sequencing (MPS) approaches (targeted panels and whole-exome sequencing (WES)), mainly in individuals with non-syndromic POI, have reported single-nucleotide variants in novel dominant or recessive candidate genes such as *MCM9* (Fauchereau et al., 2016), *POLR2C* (Moriwaki et al., 2017), *NUP107* (Ren et al., 2018) or *TP63* (Tucker et al., 2019). *STAG3* was first described as a POI gene in 2014 (Caburet et al., 2014), and recessive high-impact variants have since been described as a rare but recurrent cause of non-syndromic POI (Caburet et al., 2014; Le Quesne Stabej et al., 2016; Colombo et al., 2017; He et al., 2018). *STAG3* is a key gene essential for meiosis and is required for gametogenesis and fertility. Its implication in male infertility has also been strongly suggested (Le Quesne Stabej et al., 2016), and two male patients with non-obstructive azoospermia (NOA) and biallelic high-impact variants in *STAG3* have recently been reported (Riera-Escamilla et al., 2019; van der Bijl et al., 2019). We report here the first description of a homozygous missense *STAG3* variant associated with both female and male infertility, in a woman with POI (primary amenorrhoea) and her infertile brother with NOA. This study confirms the recent data expanding the phenotypic spectrum of variants within *STAG3* to include male infertility and demonstrates the involvement of missense variants in contrast to loss-of-function variants previously reported.

Materials and methods

Patients

The proband (Fig. 1, II-3), born in 1984, was first seen at 15 years old for delayed puberty. At this time, her height was 164.1 cm, weight was 61.2 kg and secondary sex characteristics were underdeveloped (Tanner I–II for breast, I for pubic and axillary hair). Genitals were normal and ultrasonographic examination showed a small uterus; the right ovary was present with a cyst suggesting a residual retained function and the left ovary was not visualised. Hormonal assessment evaluated growth factors (normal IGF-1 and IGFBP-3, sub-normal GH stimulation test by omithine), thyroid hormones (normal T4 and TSH, and TRH stimulation test), prolactin (normal) and reproductive hormones. High levels were detected for FSH (46.5 UI/l) and luteinising hormone (LH: 24.5 UI/l) with peaks at 78.5 UI/l and 87.7 UI/l, respectively, after gonadotrophin-releasing hormone stimulation. Decreased levels were noted for oestradiol (33 pg/ml) and sex hormone-binding globulin

(SHBG: 23 nmol/l, N: 28–80 nmol/l). Bone age was 12 years old and 3 months. Autoimmunity was discounted (negative thyroid antibodies, ovarian antibodies, ACA/21-OH antibodies). Karyotype showed 46,XX constitution. Oestrogen therapy was initiated, and the patient was evaluated 6 months later. Development of the secondary sex characteristics started (Tanner III for breast, II for pubic hair and I for axillary hair), bone age was 13 years old, hormonal assessment showed FSH: 43.1 UI/l, LH: 4.1 UI/l, oestradiol: 26 pg/ml, and normal testosterone. Oestrogen therapy was progressively increased and hormone replacement therapy was initiated in 2002. Other medical history included appendectomy and surgical treatment for inguinal hernia, and hysteroscopia which revealed endometrial hypotrophy but no malformation. Repeat ultrasonographic assessments in 2004 and 2008 confirmed uterine hypoplasia, small-sized right ovary with some small follicles and atrophic left ovary. She was enrolled in an oocyte donation programme in 2013 and had a child in 2017. At this time, height was 1.76 m and weight was 80 kg. When last seen in 2019, she was pregnant following another oocyte donation from the same woman.

In her familial history (Fig. 1), her parents (I-1 and I-2) are healthy and consanguineous (her mother's great grandfather and her father's grandfather are brothers). Maternal menopause occurred at 50 years old. She has two brothers, and a third (II-2) who died at 4 months (sudden infant death). One of the brothers (II-1) also has reproductive problems with NOA, and had two children after assisted reproductive techniques using donor sperm. Assessment included hormonal testing with normal FSH (11.13 UI/l), testosterone (6.84 µg/l), prolactin (8.68 ng/ml) and thyroid stimulation hormone (TSH) (1.21 UI/l), and karyotype (46,XY). The other brother (II-4) is fertile and had two children following spontaneous pregnancies. No other history of infertility is noted in the family.

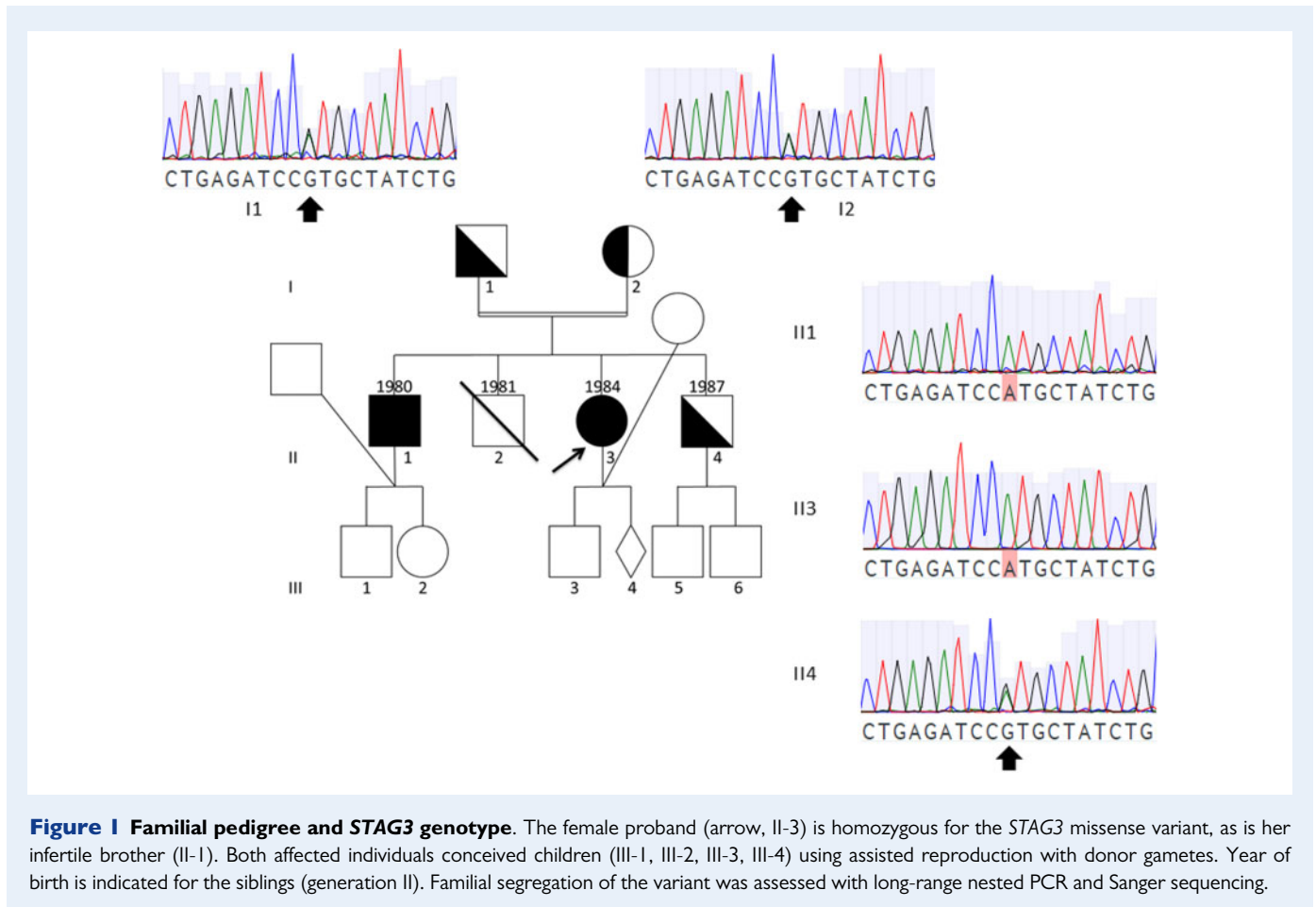
Written informed consent was obtained from all participants. All procedures were in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee of Rennes University Hospital and the French law.

Detection of the variants by sequencing

Whole-exome sequencing.

WES assays. DNA from the proband underwent WES at the Australian Genome Research Facility (AGRF). Library preparation was performed with Agilent SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and sequencing was with the NovaSeq™ 6000 Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). All WES data were processed using the Cpipe pipeline (Sadedin et al., 2015) designed according to the GATK guidelines and deposited into SeqR for analysis (<https://seqr.broadinstitute.org/>).

The proband and her family were also previously tested by exome sequencing, which was performed as described elsewhere (Murphy et al., 2015). Briefly, exon enrichment was performed using Agilent SureSelect Human All Exon V4 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Paired-end sequencing was performed on the Illumina HiSeq2000 platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with an average sequencing coverage of $\times 50$. Read files were generated from the sequencing platform via the manufacturer's proprietary software. Reads were mapped using the Burrows–Wheeler Aligner and local realignment of the mapped reads around potential insertion/deletion (indel) sites was carried out with the GATK version 1.6. single nucleotide polymorphism (SNP) and indel variants were called using the



GATK Unified Genotyper for each sample. SNP novelty was determined against dbSNP138. Datasets were filtered for novel or rare (MAF < 0.01) variants.

WES analysis. We performed two phases of analysis for WES performed with Agilent SureSelect Human All Exon V6, based on our previously described method (Tucker *et al.*, 2019), with the first focused on gene priority and the second focused on variant priority. For gene-centric analysis, we considered the potential pathogenicity of all 'moderate to high impact' coding variants within diagnostic or candidate genes (gene list as per Tucker *et al.*, 2019). For variant-centric analysis, we considered the potential pathogenicity of 'high-impact' variants in any gene, and 'moderate to high impact' recessive-type variants in any gene. High-priority variants are rare (<0.01 MAF) variants affecting essential splice sites, introducing frameshifts or premature stop codons, whereas moderate priority variants are rare (<0.01 MAF) missense variants and in-frame codon deletions/insertions. MAF and tolerance of genes to missense and/or loss-of-function variation were assessed in the public databases ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) and gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

STAG3 variants observed by sequencing were described based on the GenBank NM_012447.3 cDNA reference sequence and NP_036579.2 protein reference sequence, according to the Sequence Variant Nomenclature for the Human Genome (HGVS nomenclature) ([\[varnomen.hgvs.org/\]\(http://varnomen.hgvs.org/\)\). For greater clarity, the variants are reported as c. instead of NM_012447.3:c. and p. instead of NP_036579.2:p.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Sanger sequencing.

Long-range PCR was performed to amplify specifically the genomic region of interest, with the Expand Long-Range, dNTPack kit (Roche Life Science, Penzberg, Germany). The PCR mix included 10 μ l of Expand Long-Range Buffer with MgCl₂, 2.5 μ l of PCR Nucleotide Mix, 0.25 μ M of forward primer (CACTCTTACCTAGGTTTCACTTCTGC), 0.25 μ M of reverse primer (AATCTATCTCCCTACCTTCTCCAAGC), 6% DMSO, 0.7 μ l of Expand Long-Range Enzyme mix and 150 ng of patient genomic DNA in a final volume of 50 μ l. PCR conditions were an initial denaturation at 94°C for 2 min, 35 cycles with denaturation at 92°C for 10 s, annealing at 62°C for 15 s, elongation at 68°C for 8 min and a final elongation at 68°C for 7 min. The PCR product was visualised by electrophoresis on a 1% agarose gel (size 4387 bp). Samples were analysed by direct sequencing using the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit and the ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, USA). Sanger sequencing was performed (AGRF) with primers surrounding a 327 bp region including the variant (forward: TCCATGAGAGGGAGTTATCTGGT/reverse: GGGTTCATCATTGGTCACTAGGT). DNA sequences were aligned using the Benchling tool (<https://benchling.com/>).

Functional studies

In-silico analyses.

The effects of the missense variant identified were assessed using HOPE database (Venselaar et al., 2010) (<https://www.cmbi.ru.nl/hope/>).

Variant pathogenicity was predicted *in silico* using Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT/Provean (<http://provean.jcvi.org/>), DANN (Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks) score (Quang et al., 2015) and CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion) score (<https://cadd.gs.washington.edu/snv>). The conservation of affected nucleotides and residues in mammals, birds and fish was also taken into account with GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling) score and Multiz Alignments of 100 vertebrates (UCSC Genome Browser; <https://genome.ucsc.edu/>). Variants in known diagnostic genes were curated using the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria (Richards et al., 2015).

Testis biopsy staining

Immunohistochemistry (IHC) was performed using the Benchmark XT Ventana Roche system with the XT ultraView DAB v3 revelation kit (Roche Life Science, Penzberg, Germany). First, 4 µm sections of each testis block were made using a microtome to obtain fine paraffin ribbons. These ribbons were deposited on IHC slides (SuperFrost Plus type 25 × 75 × 1.0 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The slides were then dried at 56°C for 24 h to ensure good adhesion of the tissue to the slide before staining. After inhibition of endogenous peroxidases, sections of testicular tissue from a fertile control and from the infertile brother were incubated with the primary STAG3 antibody (1:20 dilution of rabbit polyclonal antibody) (PA5-63556, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 40 min. The primary antibody was detected with a biotinylated secondary antibody. Staining was visualised with the use of 3,3'-diaminobenzidine and haematoxylin as a counterstain. The slides were then dehydrated in successive alcohol baths and xylene so as to be covered with a coverslip stuck with pertex, a mounting medium.

Results

The filtering pipeline identified a total of 558 'moderate to high impact' variants in any gene. For gene-centric analysis, eight 'moderate to high impact' variants were within diagnostic genes, and seven were within candidate genes. For variant-centric analysis, we identified 46 'high-impact' variants in any gene, and 184 'moderate to high impact' recessive-type variants in any gene.

The most relevant variants within diagnostic genes included (Table 1): a heterozygous missense variant in *HS6ST1* (OMIM 604846, hypogonadotropic hypogonadism 15 with or without anosmia), a homozygous missense variant in *STAG3* (OMIM 608489, autosomal recessive premature ovarian failure 8), a heterozygous missense variant in *RECQL4* (OMIM 603780, Baller-Gerold/Rothmund-Thomson/RAPADILINO syndromes), compound heterozygous missense variants in *ATM* (OMIM 607585, autosomal recessive ataxia-telangiectasia), a heterozygous variant in *RCBTB1* (OMIM 607867, autosomal recessive retinal dystrophy with or without extraocular anomalies), a heterozygous splice site variant in *RSPHI* (OMIM 609314, autosomal recessive

primary ciliary dyskinesia 24) and a heterozygous missense variant in *AIRE* (OMIM 607358, autosomal dominant or recessive autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I, with or without reversible metaphyseal dysplasia). Six genes were ruled out because they were unlikely to be causal for the phenotype based on their inheritance (heterozygous variant involved in recessive disease: *RECQL4*, *RCBTB1*, *RSPHI* or inheritance from one parent), and/or the absence of phenotypic match due to their association with syndromic POI (*ATM*, *AIRE*, *RECQL4*, *RCBTB1*) or with a discordant phenotype (*HS6ST1*), and/or their unlikely pathogenic prediction (*HS6ST1*, *RECQL4*). For *ATM* variants, a compound heterozygous status was observed with one variant inherited from each parent, but both variants were curated as benign and the phenotype was not an exact match so they are not further discussed. Further interesting variants in candidate genes are listed in Table 1.

A homozygous missense variant in *STAG3* NM_012447.3: c.962G>A/NP_036579.2:p.(Arg321His) (NC_000007.13:g.99794799G>A, GRCh37) was predicted to be 'likely pathogenic' after variant curation using ACMG-based criteria. This variant was submitted to ClinVar (ClinVar accession SCV000995939). A deletion on one allele making the *STAG3* variant appear homozygous was discounted with microarray and manual inspection of the sequencing coverage with Integrative Genomics Viewer (IGV). It is a rare variant not present in ExAC or in gnomAD and not referenced in ClinVar. At the protein level, the variant lies within a highly conserved region and is thus probably damaging, which is in accordance with the *in-silico* predictions (probably damaging in PolyPhen-2, disease causing in Mutation Taster, damaging in SIFT/Provean, and DANN, pathogenic CADD score). The *STAG3* protein contains an STAG domain and a stromalin conservative domain (SCD) (86 amino acid motif present in all proteins of the family). Two armadillo (ARM) repeats, consisting of superhelical structures, are suitable for binding large substrates such as proteins and nucleic acids. One of the ARM repeats is located in the SCD (Fig. 2). The variant introduces a smaller amino acid with neutral charge in place of the positively charged wild-type amino acid within the ARM repeat of the SCD. This can disturb the domain with loss of interaction with other molecules, abolishing the protein's function (HOPE database with the UniProtKB Q9UJ98 entry).

Interestingly, on IGV, many sequencing reads across this variant did not uniquely align to the genome, with a number of sequencing reads aligning non-specifically, thereby indicating a low mapping quality corresponding to highly repetitive and homologous genomic region (Supplementary Fig. S1B). In fact, the family was studied independently by two groups, with WES performed in two different centres and data being analysed using two different bioinformatics pipelines. One group failed to detect the variant due to a capture with no baits targeting this exon of *STAG3* (Supplementary Fig. S1A and C). Initial attempts at Sanger validation cast further doubt on the variant being a true variant. Initial Sanger sequencing indicated a heterozygous variant at this site (Supplementary Fig. S2). However, this erroneous sequencing was due to poor specificity of the sequencing primers. Persisting, we attempted a long-range nested PCR. The first PCR was performed with primers that captured a very large but specific region of genomic DNA, followed by nested PCR closely flanking the variant site. There were no common/reported SNPs affecting the binding site of any of the primers, making allele-specific drop-out unlikely. Allele-specific drop-out was also discounted by sequencing parental DNA and demonstrating

Table 1 Relevant variants within diagnostic and candidate genes in the proband.

Gene	Condition (inheritance)	Chromosomal variant GRCh37	Variant	Type of variant	Amino acid change	MAF (gnomAD)	Prediction	Previous description	Inheritance	ACMG-based criteria
<i>H56ST1</i>	Hypogonadotropic hypogonadism (susceptibility, AD)	NC_000002.11: g.129025851C>T	NM_004807.2: c.1121G>A	Heterozygous Missense	NP_004798.3: p.(Ser374Asn)	T: 0.0008421 EP: 0.001439	MT: polymorphism PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs61732021 ClinVar: benign	Father heterozygous	Likely benign
<i>STAG3</i>	Premature ovarian insufficiency (AR)	NC_000007.13: g.99794799G>A	NM_012447.3: c.962G>A	Homozygous Missense	NP_036579.2: p.(Arg321His)	0	MT: disease causing PP-2: probably damaging SIFT: damaging	dbSNP: NR ClinVar: NR	Father and mother heterozygous	Likely pathogenic
<i>RECQL4</i>	Baller-Gerold, RAPADILINO, Rothmund-Thomson syndromes (AR)	NC_000008.10: g.145737131C>G	NM_004260.3: c.3435G>C	Heterozygous Missense	NP_004251.3 (LRG_277p1): p.(Gln1145His)	T: 0.002964 EP: 0.004466	PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs61755066 ClinVar: benign/likely benign	Father heterozygous	Likely benign
<i>ATM</i>	Ataxia-telangiectasia (AR)	NC_000011.9: g.108123551C>T	NM_000051.3: c.1810C>T	Heterozygous Missense	NP_000042.3 (LRG_135p1): p.(Pro604Ser)	T: 0.003179 EP: 0.001549	MT: disease causing PP-2: possibly damaging/benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs2227922 ClinVar: Benign(5)/Likely benign(7)/VUS(1)	Mother and brother II-1 heterozygous	Likely benign
<i>ATM</i>	Ataxia-telangiectasia (AR)	NC_000011.9: g.108175463A>T	NM_000051.3: c.5558A>T	Heterozygous Missense	NP_000042.3 (LRG_135p1): p.(Asp1853Val)	T: 0.004883 EP: 0.007144	MT: disease causing PP-2: possibly damaging/benign SIFT: damaging	dbSNP: rs1801673 ClinVar: Benign(5)/Likely benign(7)/VUS(1)	Father and brother II-1 heterozygous	Likely benign
<i>RC3H1</i>	Retinal dystrophy with or without extraocular anomalies (AR)	NC_000013.10: g.50115874T>A	NM_018191.3: c.1262A>T	Heterozygous Missense	NP_060661.3: p.(Tyr421Phe)	T: 0.00009192 EP: 0.0004800	MT: disease causing PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs146955596 ClinVar: nVar: NR	Mother and brother II-1 heterozygous	VUS
<i>RSPH1</i>	Primary ciliary dyskinesia (AR)	NC_000021.8: g.43906573T>G	NM_080860.3: c.275-2A>C	Heterozygous Splice site	NP_543136.1: p.?	T: 0.0003535 EP: 0.0006736	Loss of function	dbSNP: rs151107532 ClinVar: pathogenic	Mother heterozygous	Pathogenic
<i>AIRE</i>	Autoimmune polyendocrinopathy syndrome (AD, AR)	NC_000021.8: g.45710692G>A	NM_000383.3: c.880-286G>A	Heterozygous Missense	NP_000374.1 (LRG_18p1): p.?	T: 0.000004002 EP: 0.00008884	MT: disease causing	dbSNP: rs556919503 ClinVar: NR	Father and brother II-1 heterozygous	Likely pathogenic
<i>HTRA3</i>		NC_000004.11: g.8295839C>T	NM_053044.4: c.962C>T	Heterozygous Missense	NP_444272.1: p.(Thr321Met)	T: 0.0002940 EP: 0.0005521	MT: disease causing PP-2: probably damaging SIFT: damaging	dbSNP: rs151074010 ClinVar: NR	Father heterozygous	VUS
<i>CITED2</i>		NC_000006.11: g.139694603T>A	NM_001168388.2: c.479A>T	Heterozygous Missense	NP_001161860.1: p.(His160Leu)	T: 0.001576 EP: 0.002906	MT: disease causing PP-2: possibly damaging SIFT: damaging	dbSNP: rs11814036 ClinVar: NR	Mother heterozygous	VUS
<i>IGF2R</i>		NC_000006.11: g.160493009C>T	NM_000876.3: c.4511C>T	Heterozygous Missense	NP_000867.2 (LRG_1036p1): p.(Thr1504Ile)	T: 0.001099 EP: 0.001525	MT: polymorphism PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs77999960 ClinVar: NR	Mother heterozygous	Likely benign

(continued)

Table 1 Continued

Gene	Condition (inheritance)	Chromosomal variant GRCh37	Variant	Type of variant	Amino acid change	MAF (gnomAD)	Prediction	Previous description	Inheritance	ACMG-based criteria
ADGRA2		NC_000008.10:g.37693106C>T	NM_032777.9:c.1868C>T	Heterozygous Missense	NP_116166.9:p.(Pro623Leu)	T: 0.00001990 EP: 0.00002640	MT: disease causing PP-2: possibly damaging/benign SIFT: damaging	dbSNP: rs370919357 ClinVar: NR	Mother and brother II-1 heterozygous	VUS
TNFRSF1A		NC_000012.11:g.6438570G>A	NM_001065.3:c.1276C>T	Heterozygous Missense	NP_001056.1(LRG_193p1):p.(Arg426Cys)	0	MT: polymorphism PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs56279759 ClinVar: NR	Father heterozygous	VUS
SMAD9		NC_000013.10:g.37427805G>C	NM_001127217.2:c.1011C>G	Heterozygous Missense	NP_001120689.1(LRG_703p1):p.(His337Gln)	T: 0.0004252 EP: 0.0005984	MT: disease causing PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs149015682 ClinVar: VUS	Father heterozygous	VUS
MLH3		NC_000014.8:g.75513934T>C	NM_014381.2:c.2425A>G	Heterozygous Missense	NP_055196.2:p.(Met809Val)	T: 0.001864 EP: 0.002765	MT: polymorphism PP-2: benign SIFT: tolerated	dbSNP: rs61752722 ClinVar: likely benign	Father, mother, and brother II-1 heterozygous	Likely benign

White: variants in diagnosis genes, bold: variants in STAG3, light grey: variants in candidate genes.

T, total; EP, European population; MT, mutation taster; PP-2, PolyPhen-2; SIFT, Sorting Intolerant From Tolerant; VUS, variant of uncertain significance; NR, not reported; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics.

heterozygosity, indicating successful amplification of both alleles. This long-range nested PCR validated that the patient was truly homozygous for the *STAG3* missense variant (Supplementary Fig. S2). The difficulty in validating the variant and the repeated transient belief that the variant was a false positive indicates the need to carefully investigate and persist when reads do not align uniquely to the genome. Familial studies targeting *STAG3* showed that the variant was present in a heterozygous state in the parents and the healthy brother whereas it was present in a homozygous state in the infertile brother (Fig. 1). This familial segregation with infertility adds weight to the argument that this variant is causative.

For the infertile brother bearing the homozygous *STAG3* variant, testis biopsy showed the conservation of the testicular tissue architecture. On the right and on the left, the presence of germ cells was noted in the seminiferous tubules, but no spermatozoa were identified, indicating incomplete spermatogenesis, not beyond the spermatocyte stage and corresponding to a spermatogenic arrest. IHC staining performed on testis biopsies (Fig. 3) showed that in the control testis, *STAG3* protein was present in the seminiferous tubules in the nucleus of spermatogonia and spermatocytes. In the testicular biopsies from the NOA brother, *STAG3* expression was undetectable in the seminiferous tubules.

Discussion

Homozygous *STAG3* missense variant associated with POI

In our study, we identified the first likely pathogenic homozygous missense variant in *STAG3* in a patient presenting with isolated POI and her brother with NOA in a consanguineous family. *STAG3* encodes a meiosis-specific component of the cohesion ring. Other meiosis-specific subunits include *SMC1β*, *RAD21L* and *REC8*. The meiotic cohesion complex wraps around the centromeres and arms of chromosomes and ensures sister chromatid cohesion. After cohesion cleavage, it plays a key role in proper chromosomal segregation during meiosis. Several distinct cohesion complexes are thought to exist, showing differences in spatiotemporal distribution throughout the meiotic divisions (Brooker and Berkowitz, 2014). Variants in genes involved in the cohesin network have been associated with developmental conditions known as cohesinopathies (e.g. Roberts syndrome, Cornelia de Lange syndrome). Recent studies by WES in patients with POI have identified putative causative variants in *SMC1β* and *REC8* (Bouilly et al., 2016), and established causative variants in *STAG3*.

STAG3 causative variants include a homozygous 1 bp deletion (Caburet et al., 2014), a homozygous 2 bp duplication (Le Quesne Stabej et al., 2016), a homozygous non-sense variant (Colombo et al., 2017), a homozygous splice-site variant (He et al., 2018), and two homozygous in-frame variants (Xiao et al., 2019), which have been described in five different consanguineous pedigrees affected by POI (OMIM: Premature ovarian failure 8, #615723). Furthermore, compound heterozygous variants (missense and 1 bp deletion) have recently been identified in two sisters of a non-consanguineous family (Heddar et al., 2019). Two additional loss-of-function variants have been identified in an adopted woman with

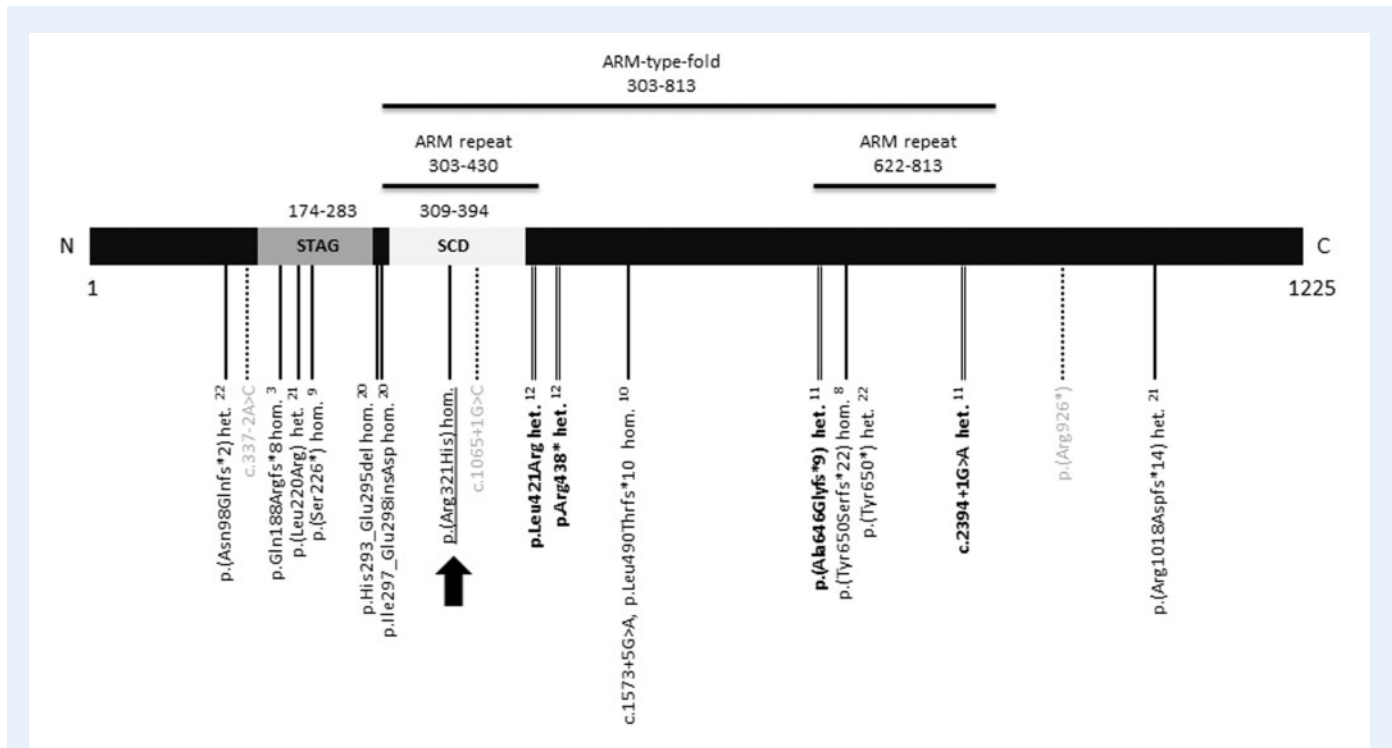


Figure 2 *STAG3* variants identified in infertile patients and/or reported in ClinVar (NP_036579.2). Variants reported in POI patients are in black with single line, variants reported in the NOA patient are in bold with double line, variants observed in ClinVar are in grey with dotted line, variant observed in our study is underlined and indicated by an arrow. Reported variants are either homozygous (hom.) or heterozygous (het.). ARM-type fold, armadillo-type fold; N, amino-terminal domain; STAG, STAG domain; SCD, stromalin conservative domain; C, carboxyl-terminal domain.

POI, although compound heterozygosity was not confirmed (França *et al.*, 2019), and three other *STAG3* variants associated with POI are reported in the ClinVar database: one non-sense variant and two canonical splice-site variants without complete information on their homozygous or heterozygous status (Table II). In contrast to the *STAG3* variants previously reported in association with POI, our patient is the first case of a homozygous missense variant. We provide evidence that this *STAG3* variant impacts protein function by aberrant *STAG3* expression in testicular tissue from the affected brother. Furthermore, the strong phenotypic match between reported patients with *STAG3* biallelic variants (Table III) strengthened the hypothesis of the involvement of the homozygous missense variant in POI. All patients bearing biallelic *STAG3* variants had indeed a severe POI phenotype with especially early-onset POI, primary amenorrhoea, undeveloped secondary sex characteristics and streak gonads. The presence of streak gonads has been proposed to be a major feature in POI patients bearing a deleterious variant with high impact on protein. The patient of our study similarly presented with primary amenorrhoea and undeveloped secondary sex characteristics. However, she had development of at least one ovary albeit non-functioning, and had evidence of oestrogen albeit at a low level, indicating that the missense variant may result in some residual *STAG3* activity and a slightly less severe phenotype. One of the 13 reported patients with confirmed or supposed biallelic *STAG3* variant had a germ-cell tumour (Caburet *et al.*, 2014), although there is not enough evidence to suggest a statistically significant

increased risk. Additional monitoring for germ-cell tumour development in patients with *STAG3* variants may be warranted and could improve patient prognosis. Functional studies involving inactivation of *Stag3* in a murine model were performed by Caburet *et al.* (2014). Female *Stag3*^{-/-} mice had ovarian dysgenesis and were sterile, with foetal oocytes showing an arrest at early prophase I due to defects in synapsis, and in centromeric sister chromatid cohesion. *Stag3* was therefore proposed to be essential for the assembly of the meiotic cohesin ring and the synaptonemal complex. For the homozygous splicing variant identified by He *et al.* (2018) in two sisters with POI, a truncated *STAG3* transcript was identified in mRNA extracted from patient's blood, confirming the deleterious impact of the variant. Recently Xiao *et al.* (2019) confirmed the deleterious impact of two homozygous in-frame variants with aberrant REC8 localisation and loss of interactions with REC8 or SMC1A as a consequence the variants.

STAG3 variants in male infertility

Furthermore, male *Stag3*^{-/-} mice were also infertile (Caburet *et al.*, 2014). Male mice lacking *Stag3* showed a meiotic arrest with shortening of their chromosome axial element and loss of centromeric cohesion, and arrest of spermatogenesis at the first spermatocyte level, leading to NOA (Pezzi *et al.*, 2000; Llano *et al.*, 2014). *STAG3* loss-of-function is thus postulated to lead to infertility, not only in women but also in men (Llano *et al.*, 2014). At the time of WES analysis, there had been no report of *STAG3* variants associated with human male

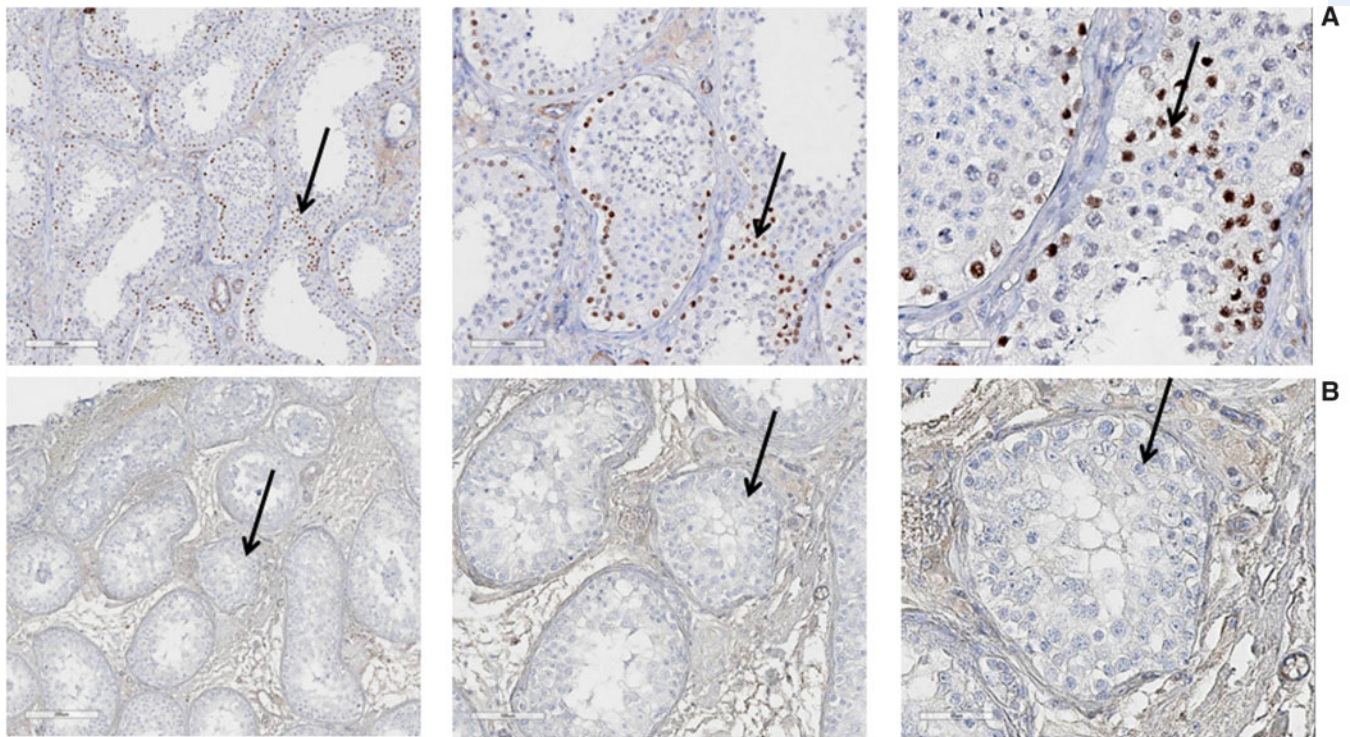


Figure 3 Immunohistochemistry on testis biopsy (magnification $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ from left to right). **(A)** Normal testis. STAG3 protein is present in the seminiferous tubules in the nucleus of spermatogonia and spermatocytes (arrows). **(B)** Testis from brother with NOA. STAG3 protein is absent from the seminiferous tubules (arrows).

infertility, however, two biallelic variants in *STAG3* leading to NOA have since been described (Riera-Escamilla et al., 2019; van der Bijl et al., 2019). In the first report, the patient was affected by complete bilateral meiotic arrest and carried two loss-of-function variants in *STAG3* (Fig. 2). Further analyses performed on the patient's testis biopsy showed that meiotic entry occurred with normal frequency but was followed by a failure to complete chromosome pairing. Thus, spermatocytes were lost before they reached meiotic metaphase I. In the second report, the patient presented drastic aberrations in chromosome architecture, with a meiotic arrest during prophase I, and no cells developing beyond late zygotene (corresponding to spermatocyte I stage). This patient carried compound heterozygous variants in *STAG3* with one loss-of-function and one missense (van der Bijl et al., 2019) (Fig. 2). Interestingly, the proband of our study had an infertile brother with NOA also bearing the *STAG3* variant in a homozygous state, with testis biopsy staining confirming reduced STAG3 stability and an early meiotic arrest. This is the third male patient described, and the first with a homozygous missense variant, confirming the involvement of *STAG3* in male infertility manifesting as NOA. According to the classification established for meiotic arrest in human male meiosis (Jan et al., 2018), *STAG3* biallelic variants are associated with type I meiotic arrest where severe asynapsis of the homologous chromosomes is a major feature, as observed in our patient. We report for

the first time a *STAG3* variant leading to POI and NOA in a single pedigree, strengthening the existence of shared genetic factors causing both these infertility conditions.

Impact of disturbance of the SCD

STAG genes (*STAG1*, *STAG2* and *STAG3*) encode members of the highly conserved family of stromalin nuclear proteins harbouring particular structural elements: (i) the SCD, an 86 amino acid region highly conserved from yeast to humans, (ii) the STAG domain present in *Schizosaccharomyces pombe* mitotic cohesin Psc3, and the meiosis-specific cohesin Rec11 (Ellermeier and Smith, 2005), (iii) the amino-terminal and carboxyl-terminal domains and (iv) the ARM-type fold corresponding to a superhelical structure adapted for binding large substrates such as proteins and nucleic acids. It is noteworthy that inconsistency was observed for the reported *STAG3* variants when collecting the molecular data of the literature, with some misleading information (e.g. the study of Colombo et al. describes a non-sense variant whereas a missense variant is indicated in the title of the article). We have amended the description of variants in the literature using HGVS nomenclature, as indicated in Table II. Previous *STAG3* homozygous or compound heterozygous variants reported are located in the amino-terminal domain, the STAG domain, the carboxyl-terminal domain or the ARM-type fold. It is also interesting to note a

Table II Molecular data of reported STAG3 variants.

Chromosomal variant GRCh37 NC_000007.13	Variant NM_012447.3	Type of variant	Amino acid change NP_036579.2	Expectation	Exon/Intron	Functional studies	Human phenotype
Caburet et al. (2014) g.99786486del	c.[562delC]; [562delC] ENST00000426455: c.968delC ¹	Homozygous Frameshift: by deletion 2 premature stop codons	p.[(Gln188Argfs*8)]; [(Gln188Argfs*8)] p.Phe187fs*7	Truncated protein or NMD (LoF)	Exon 7/34	Stag3 ^{-/-} mouse (POI female and infertile male)	POI
Le Quesne Stabej et al. (2016) g.99798478_99798479 dup	c.[1947_1948 dupCT]; [1947_1948 dupCT]	Homozygous Frameshift: by duplication 2 premature stop codons	p.[(Tyr650Serfs*22)]; [(Tyr650Serfs*22)]	Truncated protein or NMD (LoF)	Exon 19/34	NP	POI
He et al. (2018) g.99796995G>A	c.[1573 + 5G>A]; [1573 + 5G>A]	Homozygous Frameshift: by splice site 2 premature stop codons	p.?	Truncated protein or NMD (LoF)	Intron 15/33	Truncated mRNA identified from patients by RT-PCR (p.Leu490Thrfs*10 predicted)	POI
Colombo et al. (2017) g.99786601C>G	c.[677C>G]; [677C>G]	Homozygous Non-sense 2 premature stop codons	p.[(Ser226*)]; [(Ser226*)] p.(Ser227*) ²	Truncated protein or NMD (LoF)	Exon 7/34	NP	POI
França et al. (2019) g.99780417dupg.99798481C>A	c.291 dupC(i) 1950C>A	Compound heterozygous? Frameshift: by duplication + non-sense 2 premature stop codons	p.(Asn98Glnfs*2)(i)(Tyr650*)	Truncated protein or NMD (LoF)	Exon 4/34 Exon 19/34	NP	POI
Heddar et al. (2019) g.99786583T>Gg.99802728del	c.[659T>G; 3052delC]	Compound heterozygous Missense + Frameshift: by deletion 1 premature stop codon	p.[(Leu220Arg)]; [(Arg1018Aspfs*14)]	Impaired protein function and truncated protein or NMD (LoF)	Exon 7/34 Exon 28/34	NP	POI
Xiao et al. (2019) g.99792941_99792949 del g.99792955_99792957 dup	c.[877_885del; c.891_893dup TGA]; [877_885del; c.891_893 dup TGA]	Two homozygous variants In-frame	p.[(His293_Glu295deleIle297_Glu298insAsp)]; [(His293_Glu295deleIle297_Glu298insAsp)]	Loss of protein function	Exon 9/34	Aberrant REC8 localisation and loss of interactions with REC8 or SMC1A	POI
Our study g.99794799G>A	c.[962G>A]; [962G>A]	Homozygous Missense	p.[(Arg321His)]; [(Arg321His)]	Impaired protein function	Exon 10/34	Spermatogenic arrest in male patient, aberrant STAG3 protein expression in patient testicular biopsy	POI and NOA
Riera-Escamilla et al. (2019) g.99798467dupg.99799665G>A	c.[1936dupG]; [2394 + 1G>A] c.1759dupG	Compound heterozygous Frameshift: by insertion + splice site 2 premature stop codons	p.[(Ala646Glyfs*9)]i[?] p.(Ala586fs) ³	Truncated protein or NMD (LoF)	Exon 17/34 Intron 23/33	Spermatogenic arrest in patient	NOA

(continued)

Table II Continued

Chromosomal variant GRCh37 NC_000007.13	Variant NM_012447.3	Type of variant	Amino acid change NP_036579.2	Expectation	Exon/Intron	Functional studies	Human phenotype
van der Bijl et al. (2019) g.99796115T>G g.99796165C>T	c.[1262T>G]; [1312C>T]	Compound heterozygous Missense + Non-sense premature stop codon	p.[(Leu421Arg)]; [(Arg438*)]	Impaired protein function and truncated protein or NMD (LoF)	Exon 13/34	Spermatogenic arrest in patient; aberrations in chromosome architecture	NOA
ClinVar g.99783821A>C	c.337-2A>C	ND allelic status rs1296715259	p.?	Likely pathogenic	Intron 4/33	NP	ND
ClinVar g.99794903G>C	c.1065 + 1G>C	ND allelic status rs1554406947	p.?	Likely pathogenic	Intron 10/33	NP	ND
ClinVar g.99801719C>T	c.2776C>T	ND allelic status rs764841861	p.(Arg926*)	Likely pathogenic	Exon 26/34	NP	POI

1. Caburet et al. (2014) describe the STAG3 variant in terms of the ENST00000426455 Ensembl reference transcript, and does not begin numbering with 'c.' at the A of the ATG start codon as per HGVS guidelines. The protein nomenclature has also been amended because the protein is encoded normally up to and including p.Phe187. The first altered amino acid is the substitution of p.Gln188Arg and there are a total of eight altered codons, including the new stop codon.

2. Colombo et al. (2017) describe the c.677C>G variant as a missense variant affecting codon number 227, whereas it is in fact a non-sense variant affecting codon 226.

3. Riera-Escamilla et al. describe an NM_001282718:c.1759dupG variant, however, position c.1759 is not a G. Electropherograms were provided by the authors upon request, which clarified the variant is in fact NM_001282718:c.1762dupG, which is the equivalent to NM_012447.3:c.1936dupGp.(Ala646Glyfs*9).

DNA variant numbering is based on GenBank reference DNA sequence NM_012447.3, with the A of the ATG initiation codon designated +1. Chromosomal variants are described according to the nucleotide sequence NC_000007.13 (GRCh37). Predicted protein annotations are based on NP_036579.2.

In variant and amino acid change columns, correct nomenclature with reference to NM_012447.3 and NP_036579.2 is provided in bold. Erroneous nomenclature or variants described using a different transcript in the literature are indicated underneath.

NMD, non-sense mediated decay; POI, premature ovarian insufficiency; NOA, non-obstructive azoospermia; ND, not determined; NP, not performed.

Table III Clinical data of the reported POI patients with STAG3 variants.

	Caburet et al. (2014)	Le Quesne Stabej et al. (2016)	He et al. (2017)	Colombo et al. (2017)	França et al. (2018)	Heddar et al. (2019)	Xiao et al. (2019)	Our study
Age at diagnosis	17–20 (four sisters)	11 (younger sister)	19 (younger sister)	28 (elder sister)	21 (younger sister)	13 (younger sister)	18 (elder sister)	15
Menses	PA Menarche with ET No spontaneous puberty Undeveloped breast	PA Menarche with ET No spontaneous puberty Development with ET	PA Menarche with ET Undeveloped breast Sparse pubic/axillary hair	PA PA PA PA	PA PA PA PA	PA PA PA PA	PA PA PA PA	PA PA PA PA
Secondary sex characters	Undeveloped breast	Undeveloped breast	Undeveloped breast	Breast Tanner I/II Sparse pubic hair Development with ET	Development with ET Breast Tanner III	No spontaneous puberty	Breast Tanner I	Delayed puberty Breast Tanner I-II Pubic and axillary hairs Tanner I
Height	N	N	N	-1.2 SD	N	-1.5 SD	N	+1 SD
Weight	ND	ND	ND	+0.6 SD	N	-2 SD	N	+1 SD
US	Streak gonads	Small uterus Streak gonads	Streak gonads	Streak gonads (fibrous tissue)	Small uterus Ovaries not seen	Small uterus Streak gonads	Uterus and ovaries not seen Small ovaries	Small uterus Small right ovary with small follicles, atrophic left ovary (not seen)
FSH IU/l	>45	136	48.69	48.38	89	86	51	72.19
LH IU/l	>18	31	26	25.51	37	27.5	11.08	18.58
Estradiol pg/ml	<22	<10	N	N	<13	<3	<10	<10
Other hormonal levels	INHB undetectable	INHB undetectable	AMH: 0.03 ng/ml Prolactin N Thyroid hormone N INHB undetectable	Testosterone N INHB undetectable	INHB low	ND	AMH undetectable	SHBG: 23 nmol/l (low)
Karyotype	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX
Auto-Ab	Auto-Ab -ve	Ovarian auto-Ab -ve	Auto-Ab -ve	Ovarian auto-Ab -ve	Adrenal or thyroid auto-Ab -ve	Ovarian auto-Ab -ve	Adrenal or thyroid auto-Ab -ve	Adrenal or thyroid auto-Ab -ve
FMR1	N	ND	N	ND	N	N	N	N
Other	Consanguineous parents Gonadoblastoma, complex tumour in one of the sisters	Consanguineous parents Unaffected parents and brother het. carriers	Consanguineous parents Het. carriers with premature menopause or irregular menstruation/oligomenorrhoea	Ovarian auto-Ab -ve	Adopted woman Parental DNA non-available	Non-consanguineous parents	Consanguineous parents	Consanguineous parents One infertile brother (non-obstructive azoospermia)

Hormonal levels were converted to a unique unit of measure. PA, primary amenorrhoea; POI, primary ovarian insufficiency; US, ultrasonographic examination; LH, luteinising hormone; INHB, inhibin beta; AMH, anti-müllerian hormone; SHBG, sex hormone-binding globulin; Ab, antibodies; ET, oestrogen therapy; N, normal; SD, standard deviation; ND, not determined/described; het., heterozygous.

recurrence of the affected amino acid position 650 p.(Tyr650*) with two different loss-of-function substitutions resulting in the same protein damage (Le Quesne Stabej et al., 2016; França et al., 2019). All but four variants were predicted to generate non-sense-mediated decay, leading to *STAG3* loss-of-function. Of the remaining variants, functional experiments performed for two demonstrated also a complete loss of function, with absence of any binding to interacting proteins (Xiao et al., 2019). The two missense reported variants were both associated with a severe variant in a compound heterozygous state (Heddar et al., 2019; van der Bijl et al., 2019). We report the first homozygous missense variant in the SCD. The strong conservation of this domain among the *STAG* proteins, and the pathogenic *in-silico* predictions, suggests that a missense variant at this position can deleteriously impact protein function.

STAG3-like genes lead to difficulties in identification of *STAG3* variants by MPS

STAG3 is a meiosis-specific gene which consists of 34 exons and encompasses more than 30 kb of the genomic DNA. The *STAG3* gene is the precursor of a family of truncated genes or *STAG3*-like (*STAGL*) genes (*STAG3L1* to *STAG3L6*), all on chromosome 7, displaying 90–98% identity. These paralogues correspond to truncated copies of *STAG3* that have originated through genomic duplications from the ancestral *STAG3* gene, with most of them transcribed normally although the production of a functional protein is not demonstrated. For some of the *STAG3L* genes, 85% similarity to the middle part of *STAG3*, including the entire SCD, is predicted (Pezzi et al., 2000). These data are in line with the difficulty in detecting the *STAG3* variants, which introduce a change in the ARM repeat of the SCD of the protein. We can deduce that the variant identified in our patient is located in the similar region of *STAG3/STAG3L1-2-3*. The 124 bp exon of *STAG3* in which the variant falls has 100% identity with regions of *STAG3L1*, *STAG3L2* and *STAG3L3*. This led to failure of variant detection by one WES protocol and ambiguous results with another WES protocol as well as subsequent Sanger sequencing. We solved the ambiguity by the development of a long-range nested PCR. For variants in multi-mapping regions such as these, the most conclusive data come from long-range nested PCR, and not WES. Allele-specific drop-out due to SNVs in primer-binding sites remains a theoretical possibility, however, in this case is unlikely given the lack of common/reported SNPs at primer-binding sites, the fact that both alleles successfully amplified in each heterozygous parent, the strong gene:phenotype match and the lack of *STAG3* in patient biopsy, providing functional evidence to support the involvement of this gene.

Conclusion

This study reports for the first time a *STAG3* missense variant leading to POI and NOA, strengthening the existence of shared genetic factors causing both these infertility conditions. Furthermore, this study highlights the role of meiosis-specific genes of the cohesion complex in POI pathogenesis but also in male infertility, particularly NOA. Interpretation of *STAG3* variants can be challenging due to a

lack of uniformity of variant nomenclature in the literature, as well as the limitations of WES for detecting variants in repetitive regions of the genome. Exome sequencing is now a major tool allowing the elucidation of key genetic factors leading to infertility, however, it requires careful analysis when considering genes within homologous regions of DNA, such as *STAG3*. In such cases, manual inspection of aligned sequences and complementary techniques such as long-range PCR should be performed to establish variant inheritance and pathogenicity.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Molecular Human Reproduction* online.

Authors' roles

S.J., E.J.T. and A.H.S. conceived and designed the study. L.A., A.S.N., E.V.G., S.O. and C.R. were involved in the patients care and evaluation. S.J., K.M. and E.J.T. acquired the data. S.J., E.J.T., K.M., A.B., K.L.A. and R.S. analysed and interpreted the data. M.B., G.R., E.L. and J.V.D.B. supplied technical support. K.B. and B.N. supplied bioinformatics support. F.G. and F.V. were involved in the acquisition of additional data. M.A.B.R., K.L.A., A.H.S. and E.J.T. participated in the project supervision. S.J. and E.J.T. wrote the manuscript. F.V. and A.H.S. critically reviewed the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the patients for taking part in our research.

Funding

This work was supported by CHU Rennes and Rennes I University, Faculty of Medicine in France, a Peter Doherty Early Career Fellowship (1054432; to E.J.T.), a National Health and Medical Research Council programme grant (1074258; to A.H.S.), a fellowship (1062854; to A.H.S.) from the Australian National Health and Medical Research Council, the Victorian Government's Operational Infrastructure Support Program, a research grant from the European Society of Pediatric Endocrinology (to A.B.), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR), ANR-10-LABX-73 REVIVE and ANR-17-CE14-0038-01 (to K.M.).

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Azibi K, Fagart J, Fèvre A, Todeschini AL, Veitia RA, Beldjord C et al. Identification of

- multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:4541–4550.
- Brooker AS, Berkowitz KM. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods Mol Biol* 2014;**1170**:229–266.
- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2014;**370**:943–949.
- Colombo R, Pontoglio A, Bini M. A STAG3 missense mutation in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;**216**:269–271.
- Ellermeier C, Smith GR. Cohesins are required for meiotic DNA breakage and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:10952–10957.
- Fauchereau F, Shalev S, Chervinsky E, Beck-Fruchter R, Legois B, Fellous M, Caburet S, Veitia RA. A non-sense MCM9 mutation in a familial case of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2016;**89**:603–607.
- França MM, Nishi MY, Funari MFA, Lerario AM, Baracat EC, Hayashida SAY, Maciel GAR, Jorge AAL, Mendonça BB. Two rare loss-of-function variants in the STAG3 gene leading to primary ovarian insufficiency. *Eur J Med Genet* 2019;**62**:186–189.
- He W-B, Banerjee S, Meng L-L, Du J, Gong F, Huang H, Zhang X-X, Wang Y-Y, Lu G-X, Lin G et al. Whole-exome sequencing identifies a homozygous donor splice-site mutation in STAG3 that causes primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2018;**93**:340–344.
- Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics* 2019;**294**:1527–1534.
- Jan SZ, Jongejan A, Korver CM, van Daalen SKM, Pelt AMM van, Repping S, Hamer G. Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development* 2018;**145**.
- Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: from genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol* 2015;**411**:243–257.
- Le Quesne Stabej P, Williams HJ, James C, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, Ocaka L, Lescai F, Storr HL, Bitner-Glindzicz M et al. STAG3 truncating variant as the cause of primary ovarian insufficiency. *Eur J Hum Genet* 2016;**24**:135–138.
- Llano E, Gomez-H L, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Caburet S, Barbero JL, Schimenti JC, Veitia RA, Pendas AM. STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Hum Mol Genet* 2014;**23**:3421–3431.
- Moriwaki M, Moore B, Mosbrugger T, Neklason DW, Yandell M, Jorde LB, Welt CK. POLR2C mutations are associated with primary ovarian insufficiency in women. *J Endocr Soc* 2017;**1**:162–173.
- Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, Loeuille G-A, Bashamboo A, McElreavey K, Zarkower D et al. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol* 2015;**22**:442–451.
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez AC, Barbero JL. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* 2000;**14**:581–592.
- Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 2015;**31**:761–763.
- Ren Y, Diao F, Katari S, Yatsenko S, Jiang H, Wood-Trageser MA, Rajkovic A. Functional study of a novel missense single-nucleotide variant of NUP107 in two daughters of Mexican origin with premature ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomic Med* 2018;**6**:276–281.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;**17**:405–424.
- Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, Benelli M, Natali A, Colpi GM, Ruiz-Castañe E et al. Sequencing of a “mouse azoospermia” gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019;**34**:978–988.
- Sadedin SP, Dashnow H, James PA, Bahlo M, Bauer DC, Lonie A, Lunke S, Macciocca I, Ross JP, Siemering KR et al. Cpipeline: a shared variant detection pipeline designed for diagnostic settings. *Genome Med* 2015;**7**:68.
- Tucker EJ, Grover SR, Bachelot A, Touraine P, Sinclair AH. Premature ovarian insufficiency: new perspectives on genetic cause and phenotypic spectrum. *Endocr Rev* 2016;**37**:609–635.
- Tucker EJ, Jaillard S, Grover SR, den Bergen J, Robevska G, Bell KM, Sadedin S, Hanna C, Dulon J, Touraine P et al. TP63-truncating variants cause isolated premature ovarian insufficiency. *Hum Mutat* 2019;**40**:886–892.
- van der Bijl N, Röpke A, Biswas U, Wöste M, Jessberger R, Kliesch S, Friedrich C, Tüttelmann F. Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019;**34**:2112–2119.
- Venselaar H, Te Beek TAH, Kuipers RKP, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010;**11**:548.
- Xiao W-J, He W-B, Zhang Y-X, Meng L-L, Lu G-X, Lin G, Tan Y-Q, Du J. In-frame variants in STAG3 gene cause premature ovarian insufficiency. *Front Genet* 2019;**10**:1016.

Article

DYRK1A Overexpression in Mice Downregulates the Gonadotropic Axis and Disturbs Early Stages of Spermatogenesis

Rodolphe Dard ^{1,2,3,*}, Manon Moreau ¹, Estelle Parizot ^{1,2}, Farah Ghieh ², Leslie Brehier ², Nadim Kassis ¹, Valérie Serazin ³, Antonin Lamaziere ⁴, Chrystèle Racine ⁴, Nathalie di Clemente ⁴, François Vialard ^{2,3,†} and Nathalie Janel ^{1,†}

- ¹ Laboratoire Processus Dégénératifs, Stress et Vieillesse, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), UMR 8251 CNRS, Université de Paris, 75205 Paris, France; manon.moreau@live.fr (M.M.); parizot.estelle@gmail.com (E.P.); nadim.kassis@univ-paris-diderot.fr (N.K.); nathalie.janel@univ-paris-diderot.fr (N.J.)
- ² Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, ENVA, BREED, 78350 Jouy-en-Josas, France; farah.ghieh@uvsq.fr (F.G.); leslie.brehier@hotmail.fr (L.B.); francois.vialard@uvsq.fr (F.V.)
- ³ Département de Génétique, CHI de Poissy St Germain en Laye, 78300 Poissy, France; valerie.serazin@ght-yvelinesnord.fr
- ⁴ Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne Université-INSERM, 75012 Paris, France; antonin.lamaziere@inserm.fr (A.L.); chrystele.racine@inserm.fr (C.R.); nathalie.diclemente-besse@univ-paris-diderot.fr (N.d.C.)
- * Correspondence: rodolphe.dard@ght-yvelinesnord.fr
- † Senior authorship.



Citation: Dard, R.; Moreau, M.; Parizot, E.; Ghieh, F.; Brehier, L.; Kassis, N.; Serazin, V.; Lamaziere, A.; Racine, C.; di Clemente, N.; et al. DYRK1A Overexpression in Mice Downregulates the Gonadotropic Axis and Disturbs Early Stages of Spermatogenesis. *Genes* **2021**, *12*, 1800. <https://doi.org/10.3390/genes12111800>

Academic Editor: Yann Herauld

Received: 24 October 2021

Accepted: 12 November 2021

Published: 16 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Down syndrome (DS) is the most common chromosomal disorder. It is responsible for intellectual disability (ID) and several medical conditions. Although men with DS are thought to be infertile, some spontaneous paternities have been reported. The few studies of the mechanism of infertility in men with DS are now dated. Recent research in zebrafish has indicated that overexpression of DYRK1A (the protein primarily responsible for ID in DS) impairs gonadogenesis at the embryonic stage. To better ascertain DYRK1A's role in infertility in DS, we investigated the effect of DYRK1A overexpression in a transgenic mouse model. We found that overexpression of DYRK1A impairs fertility in transgenic male mice. Interestingly, the mechanism in mice differs slightly from that observed in zebrafish but, with disruption of the early stages of spermatogenesis, is similar to that seen in humans. Unexpectedly, we observed hypogonadotropic hypogonadism in the transgenic mice.

Keywords: Down syndrome; infertility; DYRK1A

1. Introduction

Down Syndrome (DS, also referred to as trisomy 21 due to the extra copy of chromosome 21 (HSA21)) is the most common chromosomal disorder in humans. This genetic condition is associated with mild-to-moderate, intellectual disability (ID) and developmental delay in 95% of affected people. Moreover, several other health conditions are abnormally common in DS: congenital heart disease, hypothyroidism, obesity, West syndrome, Alzheimer's disease, and susceptibility to upper respiratory tract infections.

Over the last few decades, the life expectancy of people with DS has increased dramatically and can be as high as 60 years. In 1960, the life expectancy of people with DS in the USA was about 10 years [1]. This spectacular increase is due to better healthcare (particularly surgery and the treatment of infectious diseases during the first 5 years of life), and the implementation of routine prenatal ultrasound and DS screening policies in developed countries; malformed DS fetuses are more likely to be detected and aborted than normally formed DS fetuses. At present, most people with DS reach adulthood. Adults

with DS are partially autonomous and will usually develop affective and sentimental lives—sometimes with sexual activity [2].

Women with DS have low fertility, and men with DS are usually assumed to be infertile. Surprisingly, however, some spontaneous paternities have been reported [3,4]. Nevertheless, there are few studies of male infertility in DS, and none of the studies explored the underlying mechanisms. Hence, the precise mechanisms of infertility in men and women with DS remain to be characterized.

In contrast, it has been clearly established that the neurodevelopmental disorders observed in DS are due to overexpression of the *DYRK1A* gene [5]. *DYRK1A* is one of the 31 genes located in the Down syndrome critical region, defined as the smallest part of HSA21 required for a full DS phenotype. The gene product, DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) is expressed ubiquitously and acts as a transcription factor for several genes. Accordingly, DYRK1A's role in the DS phenotype is not restricted to the brain and ID [6].

Recently, Liu et al. reported that overexpression of *DYRK1A* in zebrafish embryo impairs gonadogenesis and decreases gonadic crest cell numbers and migration [7]. Thus, *DYRK1A* may well be involved in the pathogenesis of infertility in DS.

In order to characterize the mechanism by which *DYRK1A* alone might cause infertility in men with DS, we studied the fertility of a transgenic mouse model overexpressing *Dyrk1A* (hereafter referred to as the Tg mouse).

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Three-month-old mice carrying the murine BAC containing one copy of *Dyrk1A* (TgDyrk1A) and their WT littermates were genotyped as described elsewhere [8]. The murine bacterial artificial chromosome 189 N3 (mBACtgDyrk1A) strain was previously constructed in our laboratory by electroporating HM-1 embryonic stem cells with the retrofitted BAC-189N3 [8]. Mice carrying the murine BAC containing one copy of *Dyrk1A* (TgDyrk1A) were maintained on a C57Bl/6J background and genotyped as described [8]. The mouse model used is fully fertile. The mice were housed in a controlled environment, with unlimited access to food and water over a 12-h light/dark cycle. Male mice from the same litter were obtained by mating wild-type females with males TgDyrk1A. All procedures were carried out in accordance with French and European ethical standards and regulations (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). The animal experiments were authorized by the French Ministry of Agriculture (reference: 75–369), and the experimental protocol was approved by the institutional animal care and use committee at the Université de Paris (reference: CEEA40).

2.2. Blood Samples, Testis and Brain Tissue Collection, and Sperm Counts

Blood samples were collected by retro-orbital sinus sampling with heparinized capillary tubes, collected in tubes containing 3.8% of sodium citrate, and immediately placed on ice. Plasma was isolated by centrifugation at 2500 g and 4 °C for 15 min. The plasma samples were stored at −80 °C until use.

Three-month mice were killed by cervical dislocation. Testis and brain samples were harvested by dissection. Both testes were weighed. The right testis was frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C, and the left testis was fixed in 4% paraformaldehyde for histological assessment. Total brains were frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C.

The epididymis was dissected in 250 µL of cryoprotective solution at 37 °C (1.8 g raffinose + 0.3 g non-fat milk powder + 10 mL water). After the addition of 250 µL of PBS, the solution was placed on ice to freeze the spermatozooids. After 1/50 dilution, the spermatozooids were counted under a light microscope on a Malassez counting chamber.

Heat-induced apoptosis in testis was obtained as described previously [9].

2.3. Hormone Assays

Levels of testosterone, LH, and FSH in half-diluted plasma were measured using an ELISA kit (Elabscience, Houston, TX, USA; E-EL-M0518 for testosterone, E-EL-M0057 for LH, and E-EL-M0511 for FSH). Serum levels of progesterone, testosterone, delta-4 androstenedione, aldosterone, deoxycorticosterone, and corticosterone were assayed using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [10]. Briefly, a mixture of the deuterated internal standard (150 μ L) was added to 100 μ L of serum. The samples were allowed to adsorb for 5 min onto supported liquid extraction columns (Isolute SLE+, Biotage, Uppsala, Sweden) before elution of the steroids through the addition of 0.9 mL methylene chloride (repeated once). The eluate (containing steroids) was evaporated to dryness and then reconstituted to 150 μ L in 1:1 methanol:water.

The steroids were separated using high-performance liquid chromatography on a Shimadzu Nexera XR system (Shimadzu France, Marne la Vallee, France) and a Coreshell C18 column (Kinetex, 2.6 μ m 100 \AA , 100 per 2.1 mm; Phenomenex, Le Pecq, France). Compounds were detected using a triple quadrupole mass spectrometer (Triple Quad 6500, ABSciex, Foster City, CA, USA). The LC-MS/MS data were analyzed using MultiQuant software (version 3.0, ABSciex) with built-in queries or quality control rules that allowed us to set compound-specific criteria and thus flag up outlier results. The flagging criteria included accuracies for standards and quality controls, quantifier ion per qualifier ion ratios, and lower and upper calculated concentration limits. For each calibration curve, the regression line used for quantification was calculated using least-squares weighting. Multiple-reaction monitoring transitions, declustering potentials, collision energy, collision cell exit potentials, quantifiers, and qualifiers values for the 16 steroids and stable isotope internal standards are available in Supplementary Materials Table S1.

2.4. Western Blotting

Total protein samples were prepared by homogenizing the whole tissue in PBS with a protease inhibitor cocktail. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). To assess the relative amounts of proteins, we used a slot blot method after testing the specificity of antibodies by Western blotting (see supplemental data and previous publication for Dyrk1a [11]). Protein preparations were blotted on a Hybond-C Extra membrane (GE Healthcare Europe GmbH, Chicago, IL, USA) using a Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad). After transfer, membranes were saturated by incubation in 10% *w/v* non-fat milk powder or 5% *w/v* bovine serum albumin in Tris-saline buffer (1.5 mM Tris base, pH 8; 5 mM NaCl; 0.1% Tween-20) and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with an antibody against DYRK1A (1/500 dilution, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan, catalog number NP_001387), PLZF (1/4000 dilution, Abcam, Cambridge, UK, catalog number ab189849), STRA-8 (1/1000 dilution, Abcam, catalog number ab49405), or AMH, as described elsewhere [12]. The binding of the primary antibody was detected by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Ponceau-S reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an internal control. For densitometric measurements, digitized images of the immunoblots obtained using a LAS-3000 imaging system (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) were analyzed using UnScan-It software (Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA).

2.5. mRNA Extraction, Reverse Transcription, and QPCR

Total RNA was isolated from the brain and testis using an RNeasy Lipid Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA concentration was determined by measuring the optical density (OD) at 260 nm. The quality of RNA was checked through the OD 260 nm/OD 280 nm ratio. To remove residual DNA contamination, the RNA samples were treated with RNase-free DNase (Qiagen) and purified on an RNeasy mini column (Qiagen). For each sample, 4 μ g of total RNA from each sample was reverse-transcribed using 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, MA, USA) and

random hexamer primers. Real-time quantitative PCR amplification reactions were carried out in a LightCycler 480 detection system (Roche, Basel, Switzerland) using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Roche). The primer sequences used are given in supporting Table S2. For each reaction, 40 ng of reverse-transcribed RNA was used as a template. All reactions were carried out in duplicate, with a no-template control. The PCR conditions were 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 10 s. The mRNA transcript level was normalized against the mean value for the genes *RpL19* and *Tbp*. The target gene level was quantified using the method described by Pfaffl et al. [13].

2.6. Immunohistochemistry Assays

Immunohistochemistry assays were performed at the Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines (UVSQ) histopathology facility on a fully automatized Leica BOND™ III platform, using a BOND™ Refine detection kit. Tissue fixation was performed in 4% paraformaldehyde overnight at room temperature. BOND™ Dewax Solution, 100% Alcohol, BOND™ Wash Solution were used as pre-programmed. Antigens were retrieved with BOND™ Epitope Retrieval ER2 (EDTA, pH 9.0) or ER1 (sodium citrate, pH 6.0) solutions for 10 min at 100 °C. Peroxides were blocked with a Refine Detection Kit Peroxide Block for 5 min. Next, the primary antibody was applied for 30 min after dilution in BOND™ primary dilution reagent: DYRK1A (1/1000, ER2 rabbit anti-DYRK1A (C-terminal) from Sigma-Aldrich, catalog number D1819), STRA-8 (1/150, ER1, Stra8 polyclonal antibody from Abcam, catalog number ab49405), SYCP3 (1/2000, ER2, SCP3 polyclonal antibody from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, catalog number PA1-31226, RRID AB_2087195), AR (1/100, ER2, AR polyclonal antibody from Santa Cruz, catalog number 441 sc-7305), cleaved CASPASE-3 (1/50, ER1, Cleaved CASP-3 Asp175 antibody from Cell Signaling, Danvers, MA, USA, catalog number 9664). The specific Refine Detection Kit was used as follows: polymer for 10 min, mixed DAB substrate reagent for 10 min, and hematoxylin counterstain for 5 min. The sample was dehydrated using a series of ethanol baths (70% for 5 min, 90% for 5 min, and 100% for 5 min) and xylene (20 min).

2.7. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean + SD. The normality of distribution was tested using the Shapiro–Wilk test. Statistical significance was determined in unpaired *t*-tests that took account of whether or not the samples had similar dispersions, followed by Bonferroni–Dunn, Holm–Sidak, or Welch correction (SDs). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 8.4.0 for Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In all tests, the threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Male Mice Overexpressing *Dyrk1A* Have Structurally Normal But Relatively Light Testes and a Low Sperm Count

Male mice overexpressing *Dyrk1a* are fully fertile. A standard histological analysis of the testis did not reveal any differences between Tg mice and wild type (WT) littermates with regard to the number, size, structure and cellular composition of the seminiferous tubules and Leydig cell compartments (Figure 1a–f). However, the testis weight was significantly lighter (as a proportion of body weight or in absolute weight) in Tg mice (Figure 1g; mean ± SD value: $88.9 \pm 5.9\%$ of the WT; $p = 0.0013$; $n = 9$ WT/7 Tg; absolute weight of mice/testis: WT: 24.4 ± 2.35 g/ 0.17 ± 0.017 g, Tg: 23.5 ± 2.18 g/ 0.14 ± 0.015 g, $p = n.s/p = 0.01$). Furthermore, the total sperm count in the epididymis (relative to the weight of the epididymis) was significantly lower in Tg mice (Figure 1h mean ± SD value: $71.3 \pm 20.03\%$ of the WT; $p = 0.0011$; $n = 10$ WT/10 Tg).

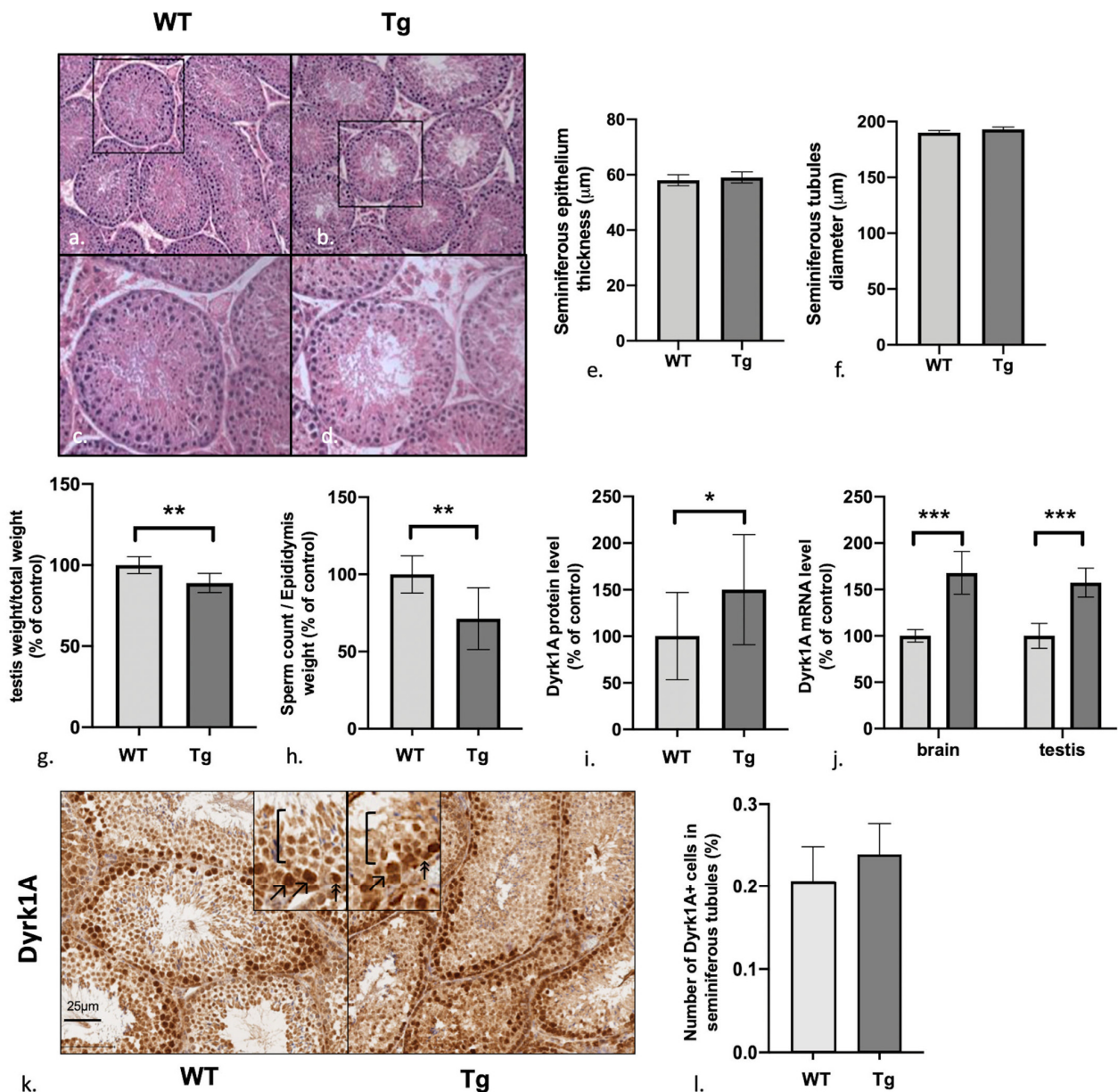


Figure 1. Experiments in Tg mice and WT controls. Standard histology of testis (a–d) shows no difference in number, size, and cellular compound of seminiferous tubules between Tg mice and control. Diameter (e), and thickness (f) of 100 seminiferous tubules per mouse were measured: histograms show mean and standard deviation, no significant difference was found; (g) testis weight; (h) sperm count; (i,j) protein and mRNA levels of Dyrk1A in testis and brain; (k,f,l) IHC assay for Dyrk1A in the testis of Tg mice and WT controls. The two groups of mice did not differ in the number and intensity of Dyrk1a+ cells in seminiferous tubules. In control mice, Dyrk1a was expressed by cells close to the basal membrane, corresponding to the early stages of spermatogenesis and as show in the cropped images: double arrowheads: small cells close to the basal membrane, corresponding to spermatogonia; single arrowheads: large cells not in contact with the basal membrane, corresponding to primary spermatocytes; square brackets: later stages of spermatogenesis, with a lower Dyrk1a intensity. *p* value : 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***)

3.2. Dyrk1A (over)Expression in Tg Mice Is Predominantly Observed in the Early Stages of Spermatogenesis

Real-time quantitative RT-PCR analysis of Dyrk1A mRNA and Western blotting of Dyrk1A protein confirmed that Dyrk1A was overexpressed in Tg mice by a factor of 1.5 vs. WT in the testis (Figure 1i: mean \pm SD in a Western blot: $150 \pm 59\%$ of the WT value; $p = 0.019$, $n = 12$ WT/16 Tg; Figure 1j: mean \pm SD in an RT-PCR: $157.9 \pm 58.9\%$ of the WT

value; $p < 0.001$; $n = 12$ WT/16 Tg. See supplementary Figure S1 for blot) and in brain tissue (Figure 1j; mean \pm SD value in an RT-PCR: $167.9 \pm 23.1\%$ of WT; $p < 0.001$, $n = 5$ WT/5 Tg). These differences were consistent with the presence of a ubiquitously and fully transcribed and translated third copy of Dyrk1A, as expected.

Furthermore, an immunohistochemical (IHC) assay revealed that Dyrk1A expression was predominant in the early stages of spermatogenesis (Figure 1k: double arrows: spermatogonia; single arrows: primary spermatocytes; brackets: low expression in the later stages of spermatogenesis), with no significant difference between Tg mice and C57b6/j WT controls in the number of positive cells in the whole seminiferous tubule (Figure 1l: $0.20 \pm 0.04\%$ for WT mice vs. 0.23 ± 0.04 for Tg mice; $p = 0.27$; $n = 4$ WT/6 Tg).

3.3. Defects in the Gonadotrophic Axis, Testosterone Levels, and Steroidogenesis But Elevated Levels of Anti-Müllerian Hormone

An ELISA revealed that plasma levels of gonadotrophic hormones were generally lower in Tg mice (Figure 2a); we observed significantly lower levels of LH ($p < 0.001$, $n = 6$ WT/6 Tg; 25.1 ± 0.35 pg/mL for Tg vs. 28.3 ± 0.43 pg/mL for WT), FSH ($p < 0.001$, $n = 6$ WT/6 Tg, 1 ± 0.84 pg/mL for Tg vs. 1.4 ± 0.76 pg/mL for WT), and testosterone ($p < 0.001$, $n = 6$ WT/6 Tg, 1 ± 0.12 pg/mL for Tg vs. 1.64 ± 0.18 pg/mL for WT). Conversely, testis levels of anti-Müllerian hormone (AMH) were significantly higher in Tg mice (Figure 2b; $p = 0.048$, $n = 6$ WT/8 Tg; $221.76 \pm 132.3\%$ of the WT value).

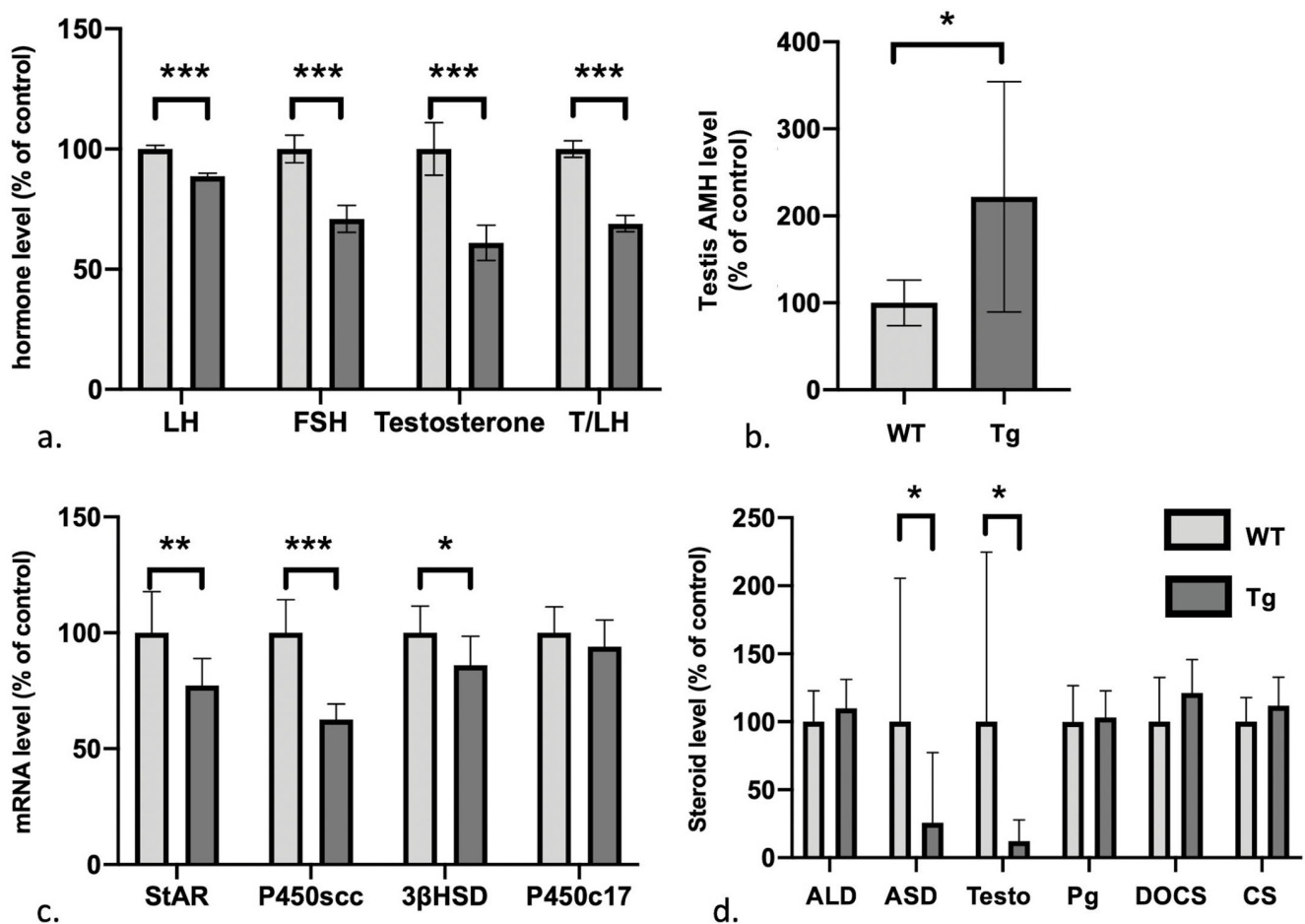


Figure 2. The gonadotrophic axis. Light grey: WT, dark grey: Tg; (a,b,d) gonadotrophic axis and steroid level in plasma and testis; (c); mRNA levels of steroidogenesis enzymes in the testis. ALD: aldosterone, ASD: androstenedione, Testo: testosterone, Pg: progesterone, DOCS: deoxycorticosterone, CS: corticosterone. p value : 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

We next used RT-PCRs to assess defects in testis steroidogenesis (Figure 2c). mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein StAR ($p = 0.003$, $n = 10$ WT/10 Tg), the cholesterol side-chain cleavage enzyme p450scc ($p < 0.001$, $n = 10$ WT/10 Tg) and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β HSD ($p = 0.02$, $n = 10$ WT/10 Tg) were significantly lower in Tg mice than in WT mice. In contrast, the level of p450c17 mRNA was similar ($p = 0.23$, $n = 10$ WT/10 Tg). Consistently, an analysis of the androgen cascade (using liquid chromatography coupled with mass spectrometry detector) showed that only levels of testosterone ($p = 0.0024$; $n = 10$ WT/7 Tg) and androstenedione ($p = 0.0096$; $n = 10$ WT/7 Tg) were significantly lower in Tg mice than in WT mice. There were no significant differences in plasma levels of progesterone ($p = 0.91$, $n = 10$ WT/7 Tg) or the control adrenal steroids (Figure 2d) aldosterone ($p = 0.72$, $n = 10$ WT/7 Tg), deoxycorticosterone ($p = 0.45$, $n = 10$ WT/7 Tg), and corticosterone ($p = 0.67$, $n = 10$ WT/7 Tg).

3.4. Spermatogenesis Failure in Early Stages of Meiosis with Excess Numbers of Spermatogonial Stem Cells

Each stage in spermatogenesis was explored (using specific markers) using Western blots, RT-PCRs, and IHC assays (Figure 3). To avoid any bias in seminiferous tubules histological analysis due to differential spermatogenic stages in each tubules, five to ten tubules per slice were analyzed, in five whole testis cross-sections from five different mice of each genotype (5 Tg/5 WT). The results are described below, starting with the earliest steps. In an RT-PCR, mRNA levels of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor GFR α 1 (which is specific for undifferentiated spermatogonia A/spermatogonial stem cells (SCCs)) were significantly higher in Tg mice than in WT mice (Figure 3b: $124.4 \pm 22.1\%$ of the WT value; $p = 0.0061$, $n = 10$ WT/10 Tg). In the Western blot assay, levels of promyelocytic leukemia zinc finger protein (Plzf, a transcription factor involved in cell cycle regulation in SCCs) were higher in Tg mice but the difference was not statistically significant (Figure 3a: $131 \pm 30.8\%$ of the WT value; $p = 0.09$, $n = 14$ WT/16 Tg, See supplementary Figure S2 for blot). In the RT-PCR, however, mRNA levels of Plzf were significantly higher in Tg mice than in WT mice (Figure 3b: $133.7 \pm 9\%$ of the WT value; $p < 0.0001$, $n = 10$ WT/10 Tg). mRNA levels of kit ligand (kit-L, a marker of the first steps in the differentiation response by spermatogonia to retinoic acid) were similar in Tg and WT mice (Figure 3b). These data suggest that in the early stages of spermatogenesis, Tg mice have abnormally high numbers of undifferentiated spermatogonia A and normal numbers of differentiating spermatogonia A.

In the Western blot assay, levels stimulated by retinoic acid 8 (STRA8, a specific marker of spermatogonia B responsible for the mitosis-to-meiosis switch from spermatogonia B to primary spermatocytes) were found to be significantly higher in Tg mice than in WT mice (Figure 3a: $129.7 \pm 49.8\%$ of the WT value; $p = 0.04$, $n = 9$ WT/12 Tg). Interestingly, an IHC assay evidenced a significantly higher STRA8+ spermatogonia B count in seminiferous tubules in Tg mice than in WT mice (8.13 ± 1.4 vs. 6.05 ± 0.48 cell/100 μ m, respectively; $p = 0.0002$, $n = 5$ WT/5 Tg) and a significantly higher number of STRA8+ tubules in Tg mice than in WT mice ($18.3 \pm 0.032\%$ vs. $0.093 \pm 0.056\%$, respectively; $p = 0.0018$, $n = 5$ WT/5 Tg). The STRA8 in Tg mice was normally located in the basal membrane (Figure 3c–f). These results suggest that the numbers of spermatogonia B and SCCs are abnormally high in Tg mice.

In an RT-PCR assay, levels of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3, part of the synaptonemal complex found in early stages of meiosis I in primary spermatocytes) were significantly higher in Tg mice than in WT mice (Figure 3b: $123.1 \pm 6.1\%$ of the WT value; $p < 0.0001$, $n = 10$ WT/10 Tg). Intriguingly, an IHC assay revealed the misexpression of SYCP3 in spermatogonia in Tg mice (Figure 3g,h). We observed (i) low SYCP3 expression in the cortical part of tubules (i.e., where spermatocytes are located) in Tg mice, (ii) strong SYCP3 expression close to the basal membrane (i.e., where spermatogonia are located) (Figure 3i), and differences in cell morphology and size (Figure 3g,h: crop, and Figure 3j). These observations are consistent with the spermatogonial expression of SYCP3 in Tg mice, with normal overall levels of expression.

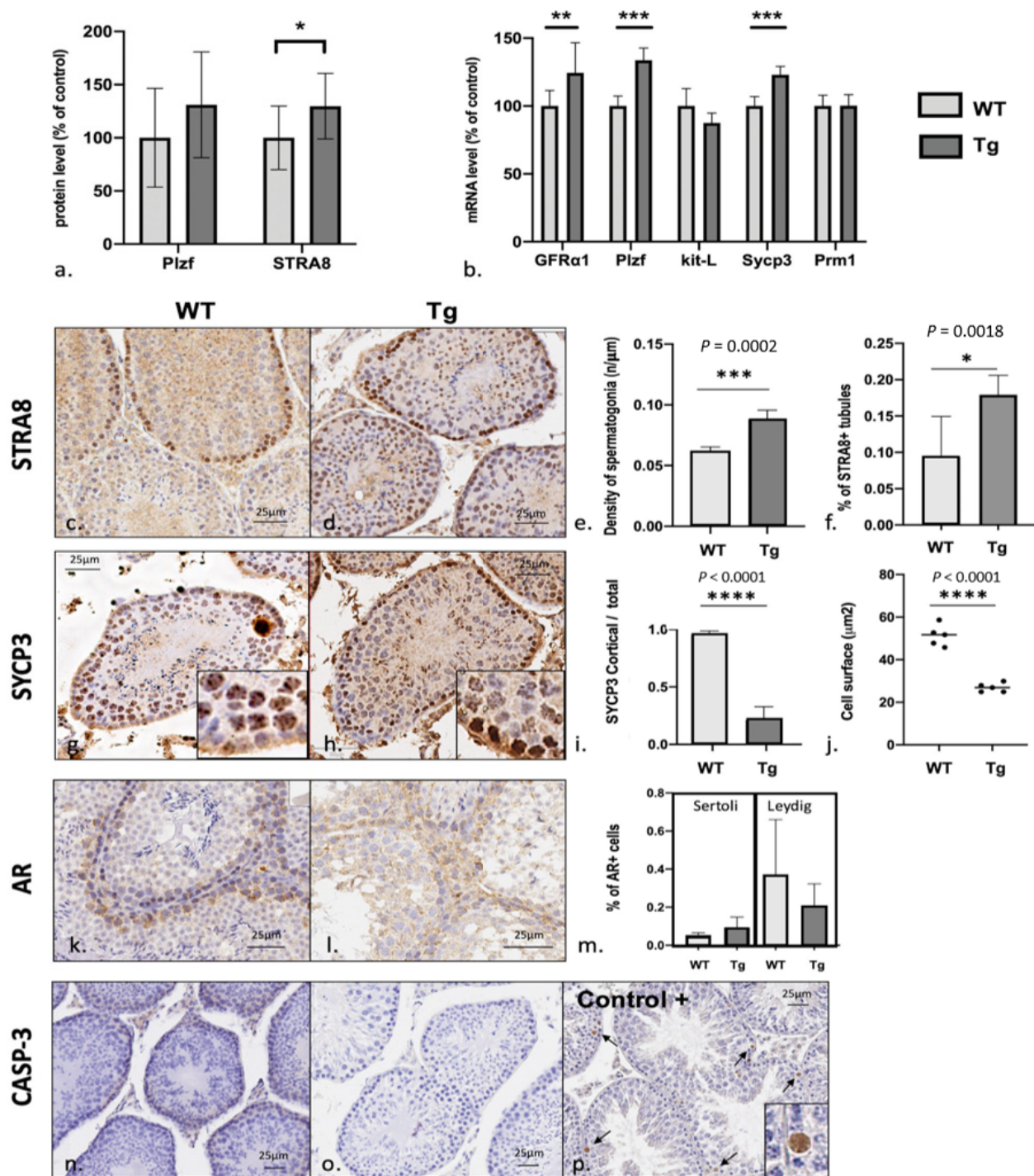


Figure 3. Spermatogenesis. (a,b): protein and mRNA levels of specific proteins involved in spermatogenesis from spermatogonial stem cells (GFRa1), spermatogonia A (Plzf and kit-L), spermatogonia B (STRA8), primary spermatocytes (SYCP3), and spermatids (Prm1). (c–p) IHC assay of testis in Tg mice and WT controls for STRA8, SYCP3, androgen receptor (AR), and caspase 3 (CASP3, an apoptosis marker). STRA8 immunostaining revealed an elevated quantity of spermatogonia B in Tg mice, in terms of the number of positive cells per tubule and the number of positive tubules in the whole section. In Tg mice, SYCP3 staining revealed aberrant expression in cells with the same morphology as spermatogonia, i.e., small cells close to the basal membrane. In WT mice, the stained cells corresponded to primary spermatocytes, as expected. There was no intergroup difference in AR staining. There was no difference in cleaved caspase-3 staining between Tg and WT mice; no apoptosis was observed in either group, relative to a heat-induced positive control (arrows). *p* value : 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***)

In an RT-PCR, mRNA levels of protamine (Prm, the protein that replaces histones during spermiogenesis to obtain highly condensed DNA in the spermatozoan's nucleus and is specifically found in spermatids and spermatozoa) were similar in Tg mice and WT mice (Figure 3b).

Using an IHC assay, we found that androgen receptor (AR) expression was higher in Leydig cells than in Sertoli cells in both Tg and WT mice (Figure 3k–m). We noticed that AR is predominantly found in the cytoplasm with poor nuclear staining as usually found with other antibodies.

Lastly, levels of the apoptosis marker caspase 3 were low in both Tg and WT mice, relative to a heat-induced apoptosis control (Figure 3n–p).

4. Discussion

The Tg mouse model provides valuable information on DYRK1A's putative involvement in various aspects of DS in general and ID in particular. Hemizygous DYRK1A Tg mice show a significant impairment in hippocampal-dependent memory tasks and changes in two types of synaptic plasticity [14]. To avoid bias due to the production of litters by Tg dams, the females are WT and males carry the genetic construct. The Tg mouse model is thought to be fully fertile but we demonstrated an infra-clinical disturbance of fertility in this model. Interestingly, DYRK1A seems to play a core role in fertility but is involved in a different manner according to species: from gonadogenesis in zebrafish to central and peripheral disturbance in mouse, and spermatogenesis alteration in DS men.

Our results indicate that male Tg mice have reduced testes weight and a lower sperm count than control (C57b6/J WT) mice. This abnormally low level of sperm production is not related to testicular dysgenesis or morphological or structural changes in seminiferous tubules. Indeed, Liu et al.'s [7] study of *DYRK1A* mRNA injection into embryonic zebrafish suggested that Tg mice lacked primordial germ cells and could not perform spermatogenesis.

In contrast, an IHC assay of STRA8 revealed abnormally high numbers of spermatogonia B. Interestingly, this change was associated with a subtle impairment in the following stages of spermatogenesis, with abnormal spermatogonial differentiation and meiosis entry. We observed an impairment in the spermatogonium to primary spermatocyte switch consistent with mitosis to meiosis initiation, although there was no maturation arrest (see below). Our experiments evidenced all stages in spermatogenesis, which is consistent with the Tg mouse's fertility. This switch (which depends on the STRA8 protein present in spermatogonia B in WT mice [15]) is associated with aberrant expression of SYCP3 in spermatogonia and primary spermatocytes in Tg mice. This might constitute a weak meiotic blockade in spermatogenesis. In fact, SYCP3 is a part of the synaptonemal complex and is first expressed during the first step of meiosis in primary spermatocytes but not in spermatogonia B [16], as observed in Tg mice. This blockade might be responsible for the abnormally high number of STRA8+ spermatogonia upstream.

Intriguingly, DYRK1A is predominantly expressed in the early stages of spermatogenesis. Thus, the normal mitosis-to-meiosis transition might be disrupted by the local dysregulation of transcription caused by abnormally high amounts of DYRK1A. As shown by Li et al., DYRK1A is able to activate STAT3 [17,18], which in turn promotes GDNF expression [19]. GDNF is a major factor for stem cell renewal and non-differentiation commitment [20].

STAT signals are crucial for the maintenance of both SSCs and somatic cyst progenitor cells in *Drosophila* testis niches [21]. In mouse spermatogenesis, STAT3 is not essential for SSC maintenance; conversely, STAT3 signaling might promote the differentiation of SSCs into undifferentiated mouse spermatogonia [22]. Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in Sertoli cells depend on either the cells' location or spermatogenic activity [23].

DYRK1A has been found to phosphorylate STAT3 Ser-727 in a simian fibroblast (COS-7) cell line [24] and in human B cell precursor of leukemia (MUTZ-5) cells [18]. Inhibition of DYRK1A with small interfering RNAs in human epithelial lung cancer cell

lines (A549 and NCI-H460 cells) [17] inhibits the expression and nuclear translocation of STAT3. Pharmacological inhibition of DYRK1A in human primary and BV2 microglial LPS-activated cells (using KVN93) leads to a reduction in cytosolic and nuclear levels of p-STAT3 (Ser727) [25]. In APP/PS1 mice, it has been shown that truncated DYRK1A has a higher affinity for STAT3 α than full length-DYRK1A does. Furthermore, truncated DYRK1A contributes to inflammatory cytokine production by astrocytes via activation of the STAT3 pathway. In mBACtgDyrk1A mice, Tlili et al. [26] showed that overexpression of DYRK1A increases the hepatic expression of STAT3 and decreases Tyr-705 phosphorylation but does not influence Ser727 phosphorylation.

We further hypothesize that local overexpression of DYRK1A in the early stages of spermatogenesis disrupts the GDNF/retinoic acid balance (Figure 4), which in turn would determine the fate of SSCs (i.e., self-renewal vs. differentiation and entry into spermatogenesis) [20]. DYRK1A might activate STAT3 in the testis; this activation is known to promote GDNF expression in other tissues [19]. We hypothesize that a similar cascade could be present in testis; STAT3 might be overactivated by an excess of DYRK1A, which in turn would slow the differentiation of spermatogonia into spermatocytes (Figure 4b). Consistently, we did not observe any apoptosis or any defects in Sertoli cells, Leydig cells (Figure 3), or seminiferous tubules, relative to other phenotypes described in the literature [27,28].

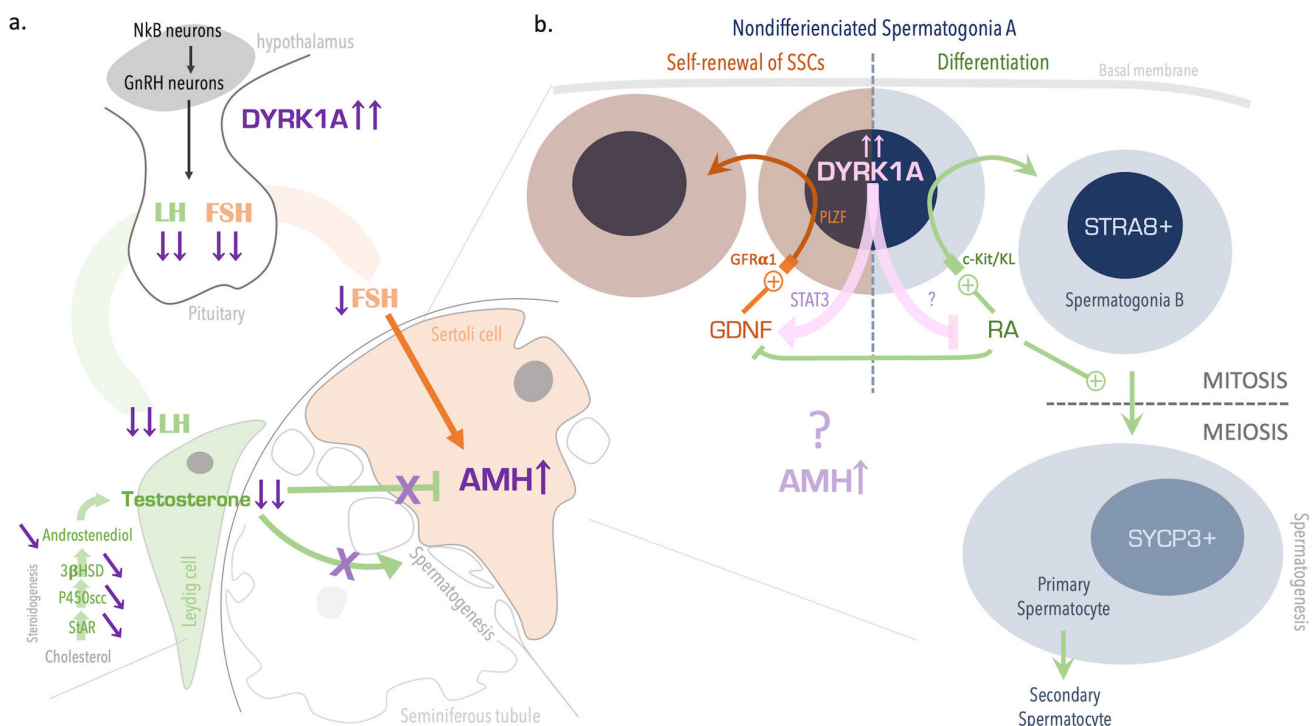


Figure 4. Mechanisms of impaired fertility in Tg mice overexpressing DYRK1A. Hypogonadotropic hypogonadism (a) might be induced by central overexpression of DYRK1A in the hypothalamus and/or the pituitary; the overexpression might be responsible for lowering the production of LH and FSH gonadotrophins. In the testis, low LH levels slow down steroidogenesis and reduce testosterone levels, which in turn reduced spermatogenesis stimulation and upregulation of AMH levels in Sertoli cells. In germ cells (b), overexpression of DYRK1A in the early stages of spermatogenesis prompts spermatogonia to self-renew rather than to differentiate and enter meiosis. This process might be mediated by activation of STAT3 and GDNF, downregulation of retinoic acid (RA), and perturbation of the mitosis-to-meiosis transition by excess AMH.

Furthermore (Figure 4a), the hormone assay data revealed hypogonadotropic hypogonadism in Tg mice, with low plasma FSH, LH, and testosterone levels and an elevated plasma AMH level. This situation has been reported in other disorders, such as delayed puberty (i.e., childhood levels or hormones) and central hypogonadism (high AMH levels

for age) [29–31]. AMH is secreted by prepubertal Sertoli cells in response to FSH, and AMH levels are elevated during fetal life and throughout puberty. At that point, Sertoli cells express ARs and increase their androgen activity, which inhibits AMH production [32]. The level of AMH reflects prepubertal Sertoli cell activity and the action of FSH and androgens on the testis [30]. Thus, an elevated AMH might correspond to a defect in androgen synthesis or signaling, Sertoli cell immaturity, or a central defect in the gonadotrophic axis. Interestingly, we found that that steroidogenesis was defective in Tg mice, with low levels of testosterone, the testosterone precursor androstenedione, and LH; these findings suggest that central control of steroidogenesis is defective. Indeed, a lowering of central gonadotrophin levels results in less intense Leydig cell stimulation and testosterone production. Testicular testosterone is required for the stimulation of spermatogenesis and for Sertoli cell activity. In contrast, AR expression was normal in Sertoli cells from Tg mice (Figure 3k–m), which is consistent with the normal maturation of these cells. However, AR expression using our specific antibody is found mainly cytoplasmic whereas nuclear expression was also expected. AR is a cytoplasmic receptor translocated to the nucleus when activated. Further analysis of Leydig and Sertoli cells should be of great interest to confirm our first results.

The low level of FSH in Tg mice might reflect moderate hypogonadotropic hypogonadism. Our present results indicate that the impairment in fertility in Tg mice is due to both central and peripheral defects. This impairment is subtle or subclinical (i.e., hypofertility) because this DS mouse model can still produce offspring.

We are aware of 12 reports (published from 1960 onwards) on infertility in over 120 men with DS [33–44]. Most of the studies describe azoospermia or oligospermia, elevated LH and FSH levels, normal testosterone levels, and small testes. However, some variability is observed, and normal LH and FSH levels and normal testis size have been reported. These observations are suggestive of gonadal insufficiency in males with DS. Interestingly, Attia et al. reported that 12 of the 21 men studied (57%) were sexually active [38].

The eight histology studies are now dated old (eight studies from 1965 to 1983) [45–52], but all described various levels of spermatogenesis failure, from moderate hypospermatogenesis [50], to complete spermatogenic arrest at the primary spermatocyte stage, with no mature spermatozoa [45,52]. Intriguingly, Johannisson et al. reported that many tubules show an abundance of spermatogonia (as we observed in Tg mice) but did not investigate the topic further [46]. Thus, gonadal insufficiency in Tg mice correlates with the human phenotype, except that men with DS do not appear to have hypogonadotropic hypogonadism; the latter feature might be specific for this mouse model. Nevertheless, DS is known to include hypothalamic and hypophyseal impairments of the thyrotropic axis; these impairments might be related to central overexpression of DYRK1A.

Interestingly, our observations in Tg mice are in line with histological studies of men with DS, with impairments in the early stages of spermatogenesis (i.e., upstream of the primary spermatocytes). Unfortunately, there are no recent histological studies of men with DS.

Our findings in a Tg mouse model differed somewhat from those reported in zebrafish and humans but emphasized the involvement of DYRK1A in the fertility disturbance observed in DS. Nevertheless, our results highlight the limitations of animal models for understanding human disease. Although the Tg mouse is clearly more similar to DS than the Dyrk1a zebrafish is, an even more analogous model of DS is now required. In the Dyrk1a zebrafish model developed by Liu et al. by the injection of mRNA into embryos, the magnitude of Dyrk1A overexpression is variable and this overexpression is not controlled in time and space. In contrast, Dyrk1a overexpression in Tg mice is controlled normally in time and space, and the magnitude of overexpression is similar to that seen in people with DS (Figure 1d). We notably showed that Tg mice overexpress Dyrk1a 1.5 times more than the WT, which is consistent with trisomy 21 [53]. Furthermore, the Tg mice overexpress Dyrk1a in testis and in many areas of the brain [54], which might therefore result in possible peripheral and central effects. Nevertheless, DS is clearly due to overexpression of several

genes in the extra HSA21. The roles of the other genes of interest and the cytogenetic disturbance remain to be evaluated. A more complex mouse model of DS might provide further insights into the mechanisms of changes in fertility.

Women with DS, are fertile but suffer of premature ovarian failure. The role of DYRK1A in woman fertility disturbance remains to be assessed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12111800/s1>; Table S1: Multiple-reaction monitoring transitions, declustering potentials (DP), collision energies (CE), collision cell exit potentials (CXP), quantifiers (Q), and qualifiers (q), for the 16 steroids and stable isotope internal standards. Table S2: Primers used for real time quantitative RT-PCR of specific mRNAs. Figure S1: Slot-blot of Dyrk1a WT and Tg mice in testis. Figure S2: Plzf western blot in WT and Tg mice performed to assess the specificity of specific antibody.

Author Contributions: Conceptualization, F.V. and N.J.; methodology, F.V., N.J., C.R. and N.d.C.; software, R.D.; validation, C.R. and N.d.C.; formal analysis, R.D., F.G., M.M. and E.P.; investigation, R.D., F.G., M.M., L.B., A.L., N.K. and E.P.; resources, R.D., F.G., M.M., V.S. and E.P.; data curation, R.D.; writing—original draft preparation, R.D.; writing—review and editing, R.D., N.J., F.V., C.R. and N.d.C.; visualization, R.D.; supervision, F.V. and N.J.; project administration, F.V. and N.J.; funding acquisition, F.V. and N.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All procedures were carried out in accordance with French and European ethical standards and regulations (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). The animal experiments were authorized by the French Ministry of Agriculture (reference: 75–369), and the experimental protocol was approved by the institutional animal care and use committee at the Université de Paris (reference: CEEA40).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the manuscript and supporting materials.

Acknowledgments: The authors thank the staff at the UVSQ histopathology facility for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Presson, A.P.; Partyka, G.; Jensen, K.M.; Devine, O.J.; Rasmussen, S.A.; McCabe, L.L.; McCabe, E.R.B. Current Estimate of Down Syndrome Population Prevalence in the United States. *J. Pediatr.* **2013**, *163*, 1163–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Watson, S.L.; Richards, D.A.; Miodrag, N.; Fedoroff, J.P. Sex and Genes, Part 1: Sexuality and Down, Prader–Willi, and Williams Syndromes. *Intellect. Dev. Disabil.* **2012**, *50*, 155–168. [[CrossRef](#)]
3. Sheridan, R.; Llerena, J., Jr.; Matkins, S.; Debenham, P.; Cawood, A.; Bobrow, M. Fertility in a Male with Trisomy 21. *J. Med. Genet.* **1989**, *26*, 294–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pradhan, M.; Dalal, A.; Khan, F.; Agrawal, S. Fertility in Men with Down Syndrome: A Case Report. *Fertil. Steril.* **2006**, *86*, 1765.e1–1765.e3. [[CrossRef](#)]
5. Feki, A.; Hibaoui, Y. DYRK1A Protein, A Promising Therapeutic Target to Improve Cognitive Deficits in Down Syndrome. *Brain Sci.* **2018**, *8*, 187. [[CrossRef](#)]
6. Laham, A.J.; Saber-Ayad, M.; El-Awady, R. DYRK1A: A down Syndrome-Related Dual Protein Kinase with a Versatile Role in Tumorigenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 603–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Liu, Y.; Lin, Z.; Liu, M.; Wang, H.; Sun, H. Overexpression of DYRK1A, a Down Syndrome Candidate Gene, Impairs Primordial Germ Cells Maintenance and Migration in Zebrafish. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Guedj, F.; Pereira, P.L.; Najas, S.; Barallobre, M.-J.; Chabert, C.; Souchet, B.; Sebrerie, C.; Verney, C.; Herault, Y.; Arbones, M.; et al. DYRK1A: A Master Regulatory Protein Controlling Brain Growth. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 190–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Miura, M.; Sasagawa, I.; Suzuki, Y.; Nakada, T.; Fujii, J. Apoptosis and Expression of Apoptosis-Related Genes in the Mouse Testis Following Heat Exposure. *Fertil. Steril.* **2002**, *77*, 787–793. [[CrossRef](#)]
10. Fiet, J.; Le Bouc, Y.; Guéchet, J.; Hélin, N.; Maubert, M.-A.; Farabos, D.; Lamazière, A. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Profile of 16 Serum Steroids, Including 21-Deoxycortisol and 21-Deoxycorticosterone, for Management of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J. Endocr. Soc.* **2017**, *1*, 186–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Souchet, B.; Guedj, F.; Sahún, I.; Duchon, A.; Daubigney, F.; Badel, A.; Yanagawa, Y.; Barallobre, M.J.; Dierssen, M.; Yu, E.; et al. Excitation/Inhibition Balance and Learning Are Modified by Dyrk1a Gene Dosage. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *69*, 65–75. [[CrossRef](#)]

12. Rey, R.; al-Attar, L.; Louis, F.; Jaubert, F.; Barbet, P.; Nihoul-Fékété, C.; Chaussain, J.L.; Josso, N. Testicular Dysgenesis Does Not Affect Expression of Anti-Müllerian Hormone by Sertoli Cells in Premeiotic Seminiferous Tubules. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1689–1698.
13. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ahn, K.-J.; Jeong, H.K.; Choi, H.-S.; Ryoo, S.-R.; Kim, Y.J.; Goo, J.-S.; Choi, S.-Y.; Han, J.-S.; Ha, I.; Song, W.-J. DYRK1A BAC Transgenic Mice Show Altered Synaptic Plasticity with Learning and Memory Defects. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *22*, 463–472. [[CrossRef](#)]
15. Ferder, I.C.; Fung, L.; Ohguchi, Y.; Zhang, X.; Lassen, K.G.; Capen, D.; Brown, D.; Xavier, R.J.; Wang, N. Meiotic Gatekeeper STRA8 Suppresses Autophagy by Repressing Nr1d1 Expression during Spermatogenesis in Mice. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Griswold, M.D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 1–17. [[CrossRef](#)]
17. Li, Y.-L.; Ding, K.; Hu, X.; Wu, L.-W.; Zhou, D.-M.; Rao, M.-J.; Lin, N.-M.; Zhang, C. DYRK1A Inhibition Suppresses STAT3/EGFR/Met Signalling and Sensitizes EGFR Wild-Type NSCLC Cells to AZD9291. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 7427–7437. [[CrossRef](#)]
18. Bhansali, R.S.; Rammohan, M.; Lee, P.; Laurent, A.P.; Wen, Q.; Suraneni, P.; Yip, B.H.; Tsai, Y.-C.; Jenni, S.; Bornhauser, B.; et al. DYRK1A Regulates B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia through Phosphorylation of FOXO1 and STAT3. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, 135937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ke, R.-H.; Xiong, J.; Liu, Y. Adenosine A2a Receptor Induces GDNF Expression by the Stat3 Signal in Vitro. *Neuroreport* **2012**, *23*, 958–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Saracino, R.; Capponi, C.; Di Persio, S.; Boitani, C.; Masciarelli, S.; Fazi, F.; Fera, S.; Vicini, E. Regulation of *Gdnf* Expression by Retinoic Acid in Sertoli Cells. *Mol. Reprod. Dev.* **2020**, *87*, 419–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. De Cuevas, M.; Matunis, E.L. The Stem Cell Niche: Lessons from the Drosophila Testis. *Development* **2011**, *138*, 2861–2869. [[CrossRef](#)]
22. Oatley, J.M.; Kaucher, A.V.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. Regulation of Mouse Spermatogonial Stem Cell Differentiation by STAT3 Signaling. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 427–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nagasawa, K.; Imura-Kishi, K.; Uchida, A.; Hiramatsu, R.; Kurohmaru, M.; Kanai, Y. Regionally Distinct Patterns of STAT3 Phosphorylation in the Seminiferous Epithelia of Mouse Testes. *Mol. Reprod. Dev.* **2018**, *85*, 262–270. [[CrossRef](#)]
24. Wiechmann, S.; Czajkowska, H.; de Graaf, K.; Grötzinger, J.; Joost, H.-G.; Becker, W. Unusual Function of the Activation Loop in the Protein Kinase DYRK1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 403–408. [[CrossRef](#)]
25. Lee, H.-J.; Woo, H.; Lee, H.-E.; Jeon, H.; Ryu, K.-Y.; Nam, J.H.; Jeon, S.G.; Park, H.; Lee, J.-S.; Han, K.-M.; et al. The Novel DYRK1A Inhibitor KVN93 Regulates Cognitive Function, Amyloid-Beta Pathology, and Neuroinflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160*, 575–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tlili, A.; Noll, C.; Middendorp, S.; Duchon, A.; Jouan, M.; Benabou, E.; Héroult, Y.; Paul, J.-L.; Delabar, J.-M.; Janel, N. DYRK1A Overexpression Decreases Plasma Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity and Apolipoprotein A-I Levels. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *110*, 371–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Liu, T.; Wang, L.; Chen, H.; Huang, Y.; Yang, P.; Ahmed, N.; Wang, T.; Liu, Y.; Chen, Q. Molecular and Cellular Mechanisms of Apoptosis during Dissociated Spermatogenesis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 188. [[CrossRef](#)]
28. Johnson, C.; Jia, Y.; Wang, C.; Lue, Y.-H.; Swerdloff, R.S.; Zhang, X.-S.; Hu, Z.-Y.; Li, Y.-C.; Liu, Y.-X.; Hikim, A.P.S. Role of Caspase 2 in Apoptotic Signaling in Primate and Murine Germ Cells. *Biol. Reprod.* **2008**, *79*, 806–814. [[CrossRef](#)]
29. Young, J.; Chanson, P.; Salenave, S.; Noël, M.; Brailly, S.; O’Flaherty, M.; Schaison, G.; Rey, R. Testicular Anti-Müllerian Hormone Secretion Is Stimulated by Recombinant Human FSH in Patients with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 724–728. [[CrossRef](#)]
30. Grinspon, R.P.; Rey, R.A. Anti-Müllerian Hormone and Sertoli Cell Function in Paediatric Male Hypogonadism. *Horm. Res. Paediatr.* **2010**, *73*, 81–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Valeri, C.; Lovaisa, M.M.; Racine, C.; Edelsztejn, N.Y.; Riggio, M.; Giulianelli, S.; Venara, M.; Bedecarrás, P.; Ballerini, M.G.; di Clemente, N.; et al. Molecular Mechanisms Underlying AMH Elevation in Hyperoestrogenic States in Males. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Xu, H.-Y.; Zhang, H.-X.; Xiao, Z.; Qiao, J.; Li, R. Regulation of Anti-Müllerian Hormone (AMH) in Males and the Associations of Serum AMH with the Disorders of Male Fertility. *Asian J. Androl.* **2019**, *21*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Stearns, P.E.; Droulard, K.E.; Sahhar, F.H. Studies Bearing on Fertility of Male and Female Mongoloids. *Am. J. Ment. Defic.* **1960**, *65*, 37–41.
34. Benda, C.E. *Down’s Syndrome: Mongolism and Its Management*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1970. [[CrossRef](#)]
35. Salvadorini, F.; Saba, P.; Galeone, F.; Tognetti, G.; Carnicelli, A.; Busoni, C.A. Studies of the dynamics of anterior pituitary gonadotropic activity in the Langdon-Down syndrome. *Acta Neurol.* **1975**, *30*, 78–83.
36. Horan, R.F.; Beitins, I.Z.; Bode, H.H. LH-RH Testing in Men with Down’s Syndrome. *Acta Endocrinol.* **1978**, *88*, 594–600. [[CrossRef](#)]
37. Hasen, J.; Boyar, R.M.; Shapiro, L.R. Gonadal Function in Trisomy 21. *Horm. Res.* **1980**, *12*, 345–350. [[CrossRef](#)]
38. Jagiello, G. *Reproduction in Down Syndrome*; University Park Press: Baltimore, MD, USA, 1981; p. 152.
39. Campbell, W.A.; Lowther, J.; McKenzie, I.; Price, W.H. Serum Gonadotrophins in Down’s Syndrome. *J. Med. Genet.* **1982**, *19*, 98–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Hsiang, Y.H.; Berkovitz, G.D.; Bland, G.L.; Migeon, C.J.; Warren, A.C. Gonadal Function in Patients with Down Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1987**, *27*, 449–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Arnell, H.; Gustafsson, J.; Ivarsson, S.A.; Annerén, G. Growth and Pubertal Development in Down Syndrome. *Acta Paediatr.* **1996**, *85*, 1102–1106. [[CrossRef](#)]
42. Pueschel, S.M.; Orson, J.M.; Boylan, J.M.; Pezzullo, J.C. Adolescent Development in Males with Down Syndrome. *Am. J. Dis. Child* **1985**, *139*, 236–238. [[CrossRef](#)]
43. Sakadamis, A.; Angelopoulou, N.; Matziari, C.; Papameletiou, V.; Souftas, V. Bone Mass, Gonadal Function and Biochemical Assessment in Young Men with Trisomy 21. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2002**, *100*, 208–212. [[CrossRef](#)]
44. Attia Sexual and Reproductive Functions in Men with Down's Syndrome. Available online: <https://www.mmj.eg.net/article.asp?issn=1110-2098;year=2015;volume=28;issue=2;spage=471;epage=476;aulast=Attia> (accessed on 2 July 2021).
45. Sasaki, M. Meiosis in a Male with Down's Syndrome. *Chromosoma* **1965**, *16*, 652–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Finch, R.; Böök, J.A.; Finley, W.H.; Finley, S.C.; Tucker, C.C. Meiosis in Trisomic Down's Syndrome. *Ala. J. Med. Sci.* **1966**, *3*, 117–120.
47. Hungerford, D.A.; Mellman, W.J.; Balaban, G.B.; LaBadie, G.U.; Messatzzia, L.R.; Haller, G. Chromosome Structure and Function in Man. 3. Pachytene Analysis and Identification of the Supernumerary Chromosome in a Case of Down's Syndrome (Mongolism). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 221–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hultén, M.A.; Lindsten, J. The behaviour of structural aberrations at male meiosis In Information from man. In *Human Populations Cytogenetics*; Pfizer Medical Monographs; Edinburgh University Press: Edingburgh, UK, 1970; pp. 24–61.
49. Kjessler, B.; De la Chapelle, A. Meiosis and Spermatogenesis in Two Postpubertal Males with Down's Syndrome: 47, XY, G+. *Clin. Genet.* **1971**, *2*, 50–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Schröder, J.; Lydecken, K.; De la Chapelle, A. Meiosis and Spermatogenesis in G-Trisomic Males. *Humangenetik* **1971**, *13*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Giraud, F.; Luciani, J.M.; Mattei, J.F.; Galinier, L.; Stahl, A.; Gascard, E. Clinical, mitotic and meiotic study of a trisomy 21 with diabetes in a 52 year old man. *Mars Med.* **1971**, *108*, 31–41. [[PubMed](#)]
52. Johannisson, R.; Gropp, A.; Winking, H.; Coerd, W.; Rehder, H.; Schwinger, E. Down's Syndrome in the Male. Reproductive Pathology and Meiotic Studies. *Hum. Genet.* **1983**, *63*, 132–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ait Yahya-Graison, E.; Aubert, J.; Dauphinot, L.; Rivals, I.; Prieur, M.; Golfier, G.; Rossier, J.; Personnaz, L.; Creau, N.; Bléhaut, H.; et al. Classification of Human Chromosome 21 Gene-Expression Variations in Down Syndrome: Impact on Disease Phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 475–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. London, J.; Rouch, C.; Bui, L.C.; Assayag, E.; Souchet, B.; Daubigney, F.; Medjaoui, H.; Luquet, S.; Magnan, C.; Delabar, J.M.; et al. Overexpression of the DYRK1A Gene (Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A) Induces Alterations of the Serotonergic and Dopaminergic Processing in Murine Brain Tissues. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 3822–3831. [[CrossRef](#)]

COMMUNICATIONS

Communications orales

- **Ghieh F.** « *Les arrêts méiotiques de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique* »
Journées Reprosiences (en ligne), le 27-28-29 avril 2021.
- **Ghieh F.** « *Azoospermia and reciprocal translocations: The two hits hypothesis* »
102e congrès des Morphologistes et 25^e journées du CHEC (en ligne), le 11 et le 12 mars 2021.
- **Ghieh F.** « *Actualités pratiques en infertilité et génétique : Quel bilan génétique en cas d'anomalies de la spermatogénèse ?* »
25e Journées de la FFER (Clermont Ferrand) le 23-24-25 septembre 2020.
- **Ghieh F.** « *IOP et défauts génétiques : anomalies de la méiose* »
29th Salon de Gynécologie Obstétrique Pratique (Paris) le 20 mars 2019.
- **Ghieh F.** « *Identification et caractérisation d'altérations géniques chez des patients présentant une azoospermie par arrêt de maturation* »
2nd Paris Saclay Junior Conference on Computational Biology (Orsay), le 14 Novembre 2018.
- **Ghieh F.** « *Intérêt de l'analyse des puces chromosomiques dans l'arrêt de la méiose* »
XXIVe Colloque de l'ACLF (Saint Malo, France), le 13-14 septembre 2018.

Communications affichées

- **Ghieh F.**, AL Barbotin, C Leroy, N Swierkowsky-Blanchard, J Fortemps, C Le Sciellour, C Hue, B Herve, S Jaillard, F Boitrelle, M Bailly, V Izard, F Marcelli, J Pravisoran, V Serazin, M Delcroix, HJ Garchon, A Louboutin, B Mandon-Pépin, S Ferlicot, F Vialard.
« *Whole-exome sequencing and clinical management of idiopathic spermatogenic arrest* »

Journées ABM (Agence de la Biomédecine) AMP, Diagnostic prénatal, Diagnostic génétique, le 7 et 8 octobre 2021.
- **Ghieh F.**, V. Mitchell, M. Bailly, V. Izard, B. Mandon-Pépin, F. Vialard.
« *Les arrêts méiotiques : de l'identification des défauts génétiques à l'approche thérapeutique* »

3^{ème} Journées Reprosiences, 24-26 avril 2019, Toulouse, France.