Andrologie 2003, 13, N° 2 148-157

Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches

Marc FELLOUS[1], Jean-Pierre SIFFROI[2]

[1] INSERM 0021, Université Paris 7, Paris,
[2] Service Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique, Hôpital Tenon, Paris.

RESUME

15 % des couples dans le monde ont des difficultés à se reproduire, à cause d'une infertilité. À ce jour, très peu de causes génétiques ont été associées à une infertilité de l'homme et la femme.

Jusqu'à présent, l'identification de mutations monogéniques causant une infertilité chez l'Homme est un domaine peu étudié et celles-ci sont probablement à l'origine d'un grand nombre d'infertilités dites idiopathiques et qu'il nous reste à décrypter.

En effet des modèles murins ont été créés depuis quelques années par invalidation de gène par recombinaison génétique : plus de 200 gènes ont ainsi été caractérisés responsables d'infertilité isolée ou syndromique, c'est le cas des gènes contrôlant la méiose.

Le déroulement de la méiose et des gènes associés a été largement caractérisé chez la levure. Récemment, des homologues de mammifères ont été clonés et invalidés chez la souris, montrant leurs rôles essentiels au cours de la méiose et pour la gamétogenèse. De plus, le phénotype gonadique de ces animaux mutants et celui de certains patients atteints d'infertilité inexpliquée est similaire. Une recherche d'éventuelles mutations dans des gènes de méiose, gènes hautement conservés au cours de l'évolution des espèces est en cours de réalisation.

Ces modèles murins sont d'une grande richesse pour étudier et disséquer les différentes étapes de la gamétogenèses normale et pathologique chez les mammifères.

Tous ces progrès faciliteront dans un avenir proche un diagnostic plus précis et donc un conseil génétique éclairé chez ces couples infertiles.

Mots clés : *infertilité, causes génétiques, mutations monogéniques, gènes de méiose*

I. INTRODUCTION

Bien que de nombreux arguments soient en faveur d'un défaut génétique à l'origine de certains cas d'infertilité, pour le moment très peu de gènes impliqués dans l'infertilité masculine ont été identifiés [4]. Parmi les arguments en faveur d'une origine génétique de l'infertilité, les suivants ont été mentionnés :

1) des réarrangements chromosomiques sont retrouvés avec une fréquence supérieure à la normale chez des hommes infertiles. Ces réarrangements pourraient être responsables d'une anomalie mécanique de la méïose mais aussi de l'inactivation d'un gène crucial pour la spermatogenèse ; 2) des cas familiaux de stérilité ont été décrits dans la littérature, où plusieurs membres d'une fratrie, ou plusieurs individus infertiles sur plusieurs générations de la même famille (oncle-neveu par exemple) sont atteints ; 3) la présence de consanguinité chez les parents de certains patients stériles laisse supposer une transmission récessive d'un gène muté impliqué dans la spermatogenèse; 4) des modèles animaux, montrent que des mutations géniques spontanées ou induites sont responsables d'infertilité.

On estime sur la base de l'extrapolation des données obtenues à partir de l'étude du génome de la drosophile ou de la souris à l'homme, que les gènes impliqués dans le bon déroulement de la spermatogenèse sont plusieurs centaines, voire milliers. En outre, on sait que le testicule est un site important d'expression de nombreux gènes, parfois d'isoformes issues d'un épissage alternatif spécifique du testicule. Il est donc fort probable que des mutations dans ces gènes aient des répercussions sur la spermatogenèse.

Correspondance :
Pr. Marc Fellous - Human Genetics, Inserm 0021, Université Paris 7, Pavillon Baudeloque, Inserm U361, Hôpital Cochin, 123 Boulevard de Port-Royal, 75014 Paris -
Tel 33 (0)1.53.10.43.59 - Fax 33 (0)1.53.10.43.78 -
Email fellous@cochin.inserm.fr

Les facteurs génétiques de l'infertilité masculine peuvent être chromosomiques ou géniques, autosomiques ou gonosomiques, à effet pléiotropique ou limités à la lignée germinale.

C'est principalement sur le bras long du chromosome Y que se trouvent les gènes nécessaires à la spermatogenèse et candidats pour l'infertilité masculine d'origine génétique. En effet, dans les années 70, des réarrangements importants du chromosome Y ont été observés dans le caryotype d'hommes atteints d'azoospermie sécrétoire [42]. Les anomalies décrites comprenaient une délétion de la majeure partie du bras long du chromosome Y, facilement repérable par la perte de la fluorescence terminale. Ces observations établies sur de nombreux patients ont conduit à l'hypothèse de l'existence d'un facteur, nommé AZF pour AZoospermia Factor, indispensable à la spermatogenèse et codé par un ou des gènes portés par le chromosome Y.

II. GAMETOGENESE ET ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

Les anomalies génétiques les plus fréquemment associées à des troubles de la gamétogenèse, et plus particulièrement chez l'homme, sont les anomalies chromosomiques que l'on peut classer en deux grandes catégories, celles affectant le nombre des chromosomes (aneuploïdies) et celles touchant leur structure. Si certaines d'entre elles sont associées à un syndrome clinique particulier, d'autres peuvent se révéler uniquement par un phénotype d'infertilité.

Le syndrome de Klinefelter est sûrement la cause chromosomique d'infertilité masculine la plus fréquente. Ce syndrome est caractérisé par la grande fréquence des mosaïques qui font qu'un certain nombre de patients présente une oligozoospermie, souvent extrême, au lieu de l'azoospermie habituelle. Dès lors, la question se pose de savoir si le chromosome X surnuméraire ne risque pas d'être transmis à la descendance lors de la prise en charge de ces patients par ICSI. Par rapport à un mode de ségrégation chromosomique théorique, qui aboutirait à un pourcentage égal de spermatozoïdes à caryotype équilibré ou déséquilibré et à deux fois plus de spermatozoïdes 23,X que de 23,Y, les données cytogénétiques sur les gamètes ne montrent qu'un faible pourcentage de formes disomiques et souvent un taux plus élevé de formes 23,YY qui traduisent une erreur de ségrégation en méïose II [5, 10, 18, 27, 36]. L'hypothèse la plus probable, et qui a été vérifiée sur des modèles murins, est que seule des cellules 46,XY sont capables d'achever leur différenciation chez des sujets qui sont en fait en mosaïque mais que celle-ci se fait dans un environnement testiculaire défavorable (Leydig et Sertoli 47,XXY par exemple) ce qui augmenterait de quelques pourcents seulement les erreurs de ségrégation à la fois en première et en deuxième division méïotique [28]. La question se pose alors de savoir si ce risque plus élevé de malségrégation chromosomique peut affecter également des autosomes comme le 21.

D'autres aneuploïdies peuvent toucher avec une plus grande fréquence les populations d'hommes infertiles comme les doubles Y ou les petits marqueurs surnuméraires [43]. La nature hétérochromatique de ces derniers fait qu'ils s'associent souvent au bivalent XY et qu'ils peuvent gêner la formation de la vésicule sexuelle.

Parmi les anomalies de structure des chromosomes, les translocations Robertsoniennes (fusions centriques) et réciproques peuvent être également responsables d'infertilité [17, 43]. Etant donné le caractère plutôt aléatoire des points de cassure chromosomique rencontrés, il paraît peu vraisemblable que l'atteinte de la gamétogenèse soit due à la cassure d'un gène d'intérêt impliqué dans la formation des cellules germinales. Le risque de malségrégation chromosomique dans les gamètes augmente la probabilité de voir naître un enfant porteur d'un syndrome malformatif avec retard mental mais également celui de fausses-couches spontanées précoces, ce qui peut aboutir à un certain degré d'hypofertilité pour les couples concernés. De plus, ces remaniements chromosomiques entraînent des modes d'appariement méïotique compliqués avec des zones d'asynapsis probables. Celles-ci interagissent avec le bivalent XY dans la vésicule sexuelle ce qui aboutit à une extension du processus d'inactivation des gonosomes sur un segment autosomique et donc à un blocage de la méïose par déséquilibre de l'activité génique [1, 13, 16, 40]. Le degré d'infertilité serait alors fonction du pourcentage de cellules dans lequel une telle association se produirait.

Moins fréquentes que les translocations, les inversions, péricentriques mais surtout paracentriques, peuvent donner un phénotype d'infertilité en raison des figures méïotiques caractéristiques en boucle qu'elles produisent [14]. Des asynapsis locaux pourraient aussi être à l'origine d'un dysfonctionnement génique des cellules [8]. De plus, en cas de crossing-over à l'intérieur de ces boucles, l'aneusomie de recombinaison qui s'ensuit aboutit à un chromosome déséquilibré qui peut donner une fausse couche. Dans les inversions paracentriques, ce chromosome est, de plus, dicentrique ce qui entraîne un blocage mécanique de la ségrégation et la mort de la cellule.

Classiquement, les anomalies chromosomiques sont plutôt associées à l'infertilité chez l'homme, en raison des problèmes liés à l'existence de la vésicule sexuelle. Chez la femme, les mêmes anomalies aboutissent le plus souvent à une fertilité normale ou à une simple hypo-fertilité qui peut passer inaperçue lorsque le conjoint a un spermogramme normal. Si ce dernier a lui même des problèmes de procréation, ces couples se retrouvent alors parmi les candidats à la fécondation *in vitro* ce qui explique la fréquence élevée

des anomalies du caryotype féminin (4,84% d'après l'étude récente de J. Gekas) [15] dans la population des couples pris en charge en ICSI.

III. LE CAS PARTICULIER DES MICRODELETIONS MOLECULAIRES DU CHROMOSOME Y

Grâce à l'utilisation de sondes moléculaires, le chromosome Y a pu être subdivisé en 7 intervalles [44] et l'observation de patients présentant des délétions du bras long a permis d'assigner à la région Yq11 (intervalles 5 et 6), située au-dessus de la portion hétérochromatique (intervalle 7), un rôle majeur dans le maintien de la spermatogenèse. Grâce à ces outils, des délétions, non plus terminales mais interstitielles et invisibles au microscope, ont pu être décrites dans cette région du chromosome Y chez des patients infertiles [45]. Les progrès récents dans la cartographie physique du génome humain ont rendu possible la multiplication des marqueurs anonymes disponibles le long du chromosome Y (STS : sequence tagged sites) [11, 48]. Ces derniers, dont la taille varie de quelques dizaines à centaines de paires de bases, sont facilement amplifiables par PCR à partir de l'ADN extrait d'une prise de sang, rendant ainsi détectable leur présence ou leur absence chez un individu. L'utilisation de ces outils a permis d'observer un certain nombre de patients infertiles dont les délétions n'étaient pas chevauchantes ce qui a conduit à subdiviser le facteur AZF en trois loci différents, AZFa dans l'intervalle 5, AZFb à cheval sur les intervalles 5 et 6 et AZFc dans l'intervalle 6 [46].

Dès lors, un ensemble de travaux a abouti à la publication de séries importantes d'hommes infertiles présentant des azoospermies ou des oligospermies sévères de nature sécrétoire. Selon les études, différant quant à la gravité de l'atteinte spermatique prise en compte pour l'inclusion des patients et au caractère idiopathique ou non de celle-ci, l'incidence des microdélétions du chromosome Y dans ces populations d'hommes infertiles varie entre 3 % et 28 % [11, 23, 32, 34, 35, 39]. Pour autant que les STS aient été correctement choisis, il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre de marqueurs testés et la fréquence des délétions [38]. Par contre, une étude récente a montré que l'association de microdélétions de l'Y avec d'autres pathologies affectant la spermatogenèse, comme une varicocèle ou des antécédents de cryptorchidie, pouvait être possible, ce qui n'est pas étonnant étant donnée la fréquence de ces dernières chez les hommes [23]. Il n'est pas impossible enfin que les variations dans la fréquence des microdélétions traduisent des différences ethniques ou géographiques en relation avec des haplotypes particuliers de l'Y ou avec des facteurs environnementaux. Ce type d'hypothèse est en cours d'étude dans le cadre d'analyses de populations.

Si les délétions moléculaires de la région Yq11 sont constamment associées à une infertilité masculine, puisqu'elles ne sont jamais retrouvées dans des populations contrôles d'hommes normospermiques, la gravité de l'atteinte testiculaire peut, par contre, varier selon les cas. Il a été montré [47], qu'en général, les délétions d'AZFa s'accompagnent d'une azoospermie par absence totale de cellules germinales dans les tubes séminifères (syndrome SCO : Sertoli Cell Only) alors que celles d'AZFb sont plutôt associées à un arrêt de maturation de ces dernières à un niveau variable de la spermatogenèse. Les microdélétions du locus AZFc sont rencontrées à la fois chez des patients présentant des azoospermies et des oligozoospermies sévères, inférieures à 1 ou 2 millions de spermatozoïdes/ml. De plus, chez ces derniers, l'histologie testiculaire peut montrer d'importantes variations d'un tube séminifère à un autre avec un aspect de SCO sur certaines sections et une spermatogenèse plus ou moins conservée sur d'autres. Un dernier facteur susceptible de modifier le phénotype associé à une microdélétion est l'âge des patients puisqu'il a pu être montré une aggravation de l'atteinte testiculaire au cours des années chez certains hommes porteurs d'une délétion. Ce dernier point est à prendre en compte dans le conseil génétique et la prise en charge thérapeutique par ICSI de tels patients.

Malgré ces données, un certain nombre d'éléments paraissent relativement constants. La probabilité de trouver une délétion de l'Y est plus importante chez les patients azoospermiques que chez les oligozoospermiques et ceci d'autant plus que l'infertilité est idiopathique. Si les délétions d'AZFa sont moins fréquentes mais associées à des défauts spermatogénétiques plus graves, la perte des locus AZFb ou AZFc aboutit tout de même à une azoospermie si la délétion est de grande taille [26].

La description récente [6] d'une famille dans laquelle un père a pu transmettre une délétion d'AZFc à quatre fils tous infertiles soulève de nombreuses questions : les rapports entre l'existence d'une délétion sur l'Y et le génome particulier d'un individu, ses antécédents cliniques ou certains facteurs environnementaux peuvent en effet moduler l'impact de l'anomalie génétique sur la spermatogenèse. De plus, l'âge, auquel certains patients avec délétion, présentant une oligospermie modérée voire sévère, voient leurs chiffres de spermogramme s'effondrer peut varier d'un sujet à l'autre. Ceci explique que certains d'entre eux puissent quand même être féconds à un moment donné lorsque leur conjointe est particulièrement fertile. Ce dernier point peut conduire les médecins à conseiller une autoconservation de sperme si les hommes concernés ne désirent pas ou ne peuvent pas avoir une paternité rapidement. Enfin, le diagnostic de l'atteinte testiculaire chez un patient doit tenir compte de l'extrême variabilité qui peut exister entre des régions différentes d'un même testicule, voire entre des tubes séminifères voisins. Si cette hétérogénéité a pu être montrée chez certains patients porteurs d'une délétion, elle

est également fréquente chez les hommes présentant une altération idiopathique de leur spermatogenèse. Dans ces cas, elle pourrait être due à des facteurs génétiques difficiles à diagnostiquer (mosaïques 47, XXY ou 45, XO confinées au testicule) ou à des causes extérieures (perturbations vasculaires locales).

IV. GENES IMPLIQUES ET MECANISME D'APPARITION DES DELETIONS DU CRHOMOSOME Y

La mise en évidence de délétions chez des patients infertiles a conduit à rechercher les gènes candidats pour faire partie du facteur AZF, c'est à dire ceux dont la perte peut être responsable d'une atteinte sévère de la spermatogenèse. Plusieurs gènes ou familles de gènes ont été identifiés. Ils peuvent être divisés entre ceux qui s'expriment de façon ubiquitaire dans l'organisme (gènes de ménage), en général en copie unique sur l'Y mais possèdant souvent un homologue sur l'X qui échappe à l'inactivation, et ceux dont l'expression est limitée au testicule, généralement présents en multiples copies sur l'Y et sans homologue sur l'X.

L'intérêt de ces gènes vient évidemment de leur fonction respective mais surtout de leur implication dans le phénotype de stérilité. Ainsi, le gène DFFRY, qui code pour une protéine de désubiquitination, joue probablement un rôle important dans la gamétogenèse en raison des mutations décrites chez la drosophile et dans le gène homologue USP9Y chez l'homme bien que, dans ce dernier cas, la mutation ponctuelle d'USP9Y ne semble donner qu'un arrêt de la maturation en méïose dans la majorité des cellules germinales [41]. Les délétions d'AZFa n'entraîneraient un SCO qu'à travers la perte d'USP9Y mais également du gène DBY voisin.

Echappant à la pression de la sélection naturelle en raison de l'absence de recombinaison, la majeure partie du chromosome Y accumule certaines séquences étrangères comme des séquences d'origine rétrovirale. Par leur grande ressemblance, celles-ci sont susceptibles de procéder à des recombinaison homologues qui aboutissent à la formation de boucles chromosomiques et à leur excision. Ce mode d'apparition des délétions a notamment été vérifié pour le locus AZFa dont les délétions sont le résultat de la recombinaison entre deux séquences HERV15 situées à ses extrémités [20, 41].

V. LES MODELES ANIMAUX D'INACTIVATION OU DE SUREXPRESSION GENIQUES [25]

L'étude des modèles animaux, et principalement celle des mutants murins créés par génie génétique, montre que l'inactivation d'un grand nombre de gènes, gonosomiques ou autosomiques, ou leur surexpression par transgenèse aboutit à un phénotype de stérilité ou d'hypofertilité chez les mâles et chez les femelles.

L'intérêt de ces modèles est double puisqu'ils mettent l'accent sur tel ou tel gène de stérilité et qu'ils permettent de localiser le niveau de l'atteinte dans la gamétogenèse par l'étude histologique de la gonade. Il est ainsi possible de différencier des gènes agissant sur la migration et la multiplication des cellules germinales primordiales, la méïose et les mécanismes de réparation de l'ADN, la maturation des spermatides et des spermatozoïdes chez l'homme ou la maturation folliculaire chez la femme (Tableau 1).

VI. DES GENES DE MEIOSE COMME CANDIDATS POTENTIELS D'INFERTILITE (Tableau 2).

La méiose est un mécanisme de division cellulaire, limité aux cellules germinales ; il permet la production de gamète haploïde.

Ce mécanisme, conservé dans l'évolution chez les organismes à reproduction sexuée permet l'intégrité et la diversité du génome de ces espèces, par le biais de la recombinaison homologue qui a lieu durant la prophase très longue de la première division de la méiose. Si la spermatogenèse est initiée à la puberté, il s'agit d'un processus continu durant toute la vie du sexe masculin alors que ce n'est pas le cas pour l'ovogenèse qui est initiée à l'opposé durant la phase prénatale : il s'agit d'un processus avec un stock fini d'ovocytes, bloqués en phase diplotène de la méiose. Malgré ces différences, de nombreux régulateurs communs sont utilisés pour la machine de la recombinaison et de réparation de l'ADN mâle et femelle.

D'ailleurs, chez la souris, les invalidations de ces gènes très conservées dans l'évolution comme Spo11, DMC1, ATM, MSH4 ou MSH5 entraînent une infertilité dans les deux sexes. Ainsi la mutation du gène ATM dans l'Ataxie Telangectasique entraîne une infertilité dans les deux sexes chez l'homme. C'est aussi le cas dans l'Anémie de Fanconi où les hommes ont une oligospermie et les femmes une ménopause précoce.

Les anomalies de la machinerie de contrôle de la méiose sont responsables d'anomalies du type aneuploïdie. La plus fréquente est la trisomie 21 due le plus fréquemment à une non-disjonction des chromosomes homologues 21 à la division de la méiose de l'ovogenèse. De tels aneuploïdes ont été retrouvés chez la souris lors de l'invalidation du gène de la protéine 3 du complexe synaptonemal (SycP3).

SYCP3 joue un rôle dans l'appariement des chromosomes homologues durant la méiose. Les souris invalides pour SYCP3 sont infertiles chez les mâles et hypofertiles chez les souris femelles avec une perte importante d'embryons aneuploïdes.

Tableau 1 : Etude des modèles animaux : principaux gènes dont la mutation, le Knock-out ou la sur expression entraînent une stérilité mâle chez la souris.

Gène	Fonctions de la protéine	Phénotype mutant
Expression dans les cellules germinales primordiales (PGC) et/ou dans les spermatogonies		
W (*dominant white spotting*)	Proto-oncogène c-Kit ; Récepteur tyrosine kinase.	Défaut de migration des PGC. Anomalies des spermatogonies.
S	Steel facture : ligand de c-kit.	Défaut de migration des PGC ; Blocage au stade de spermatogonies.
Tiar	Liaison à des particules ribo-nucléoprotéiques.	Réduction du nombre puis disparition des PGC ; Absence de spermatogonies.
mTR	Activité télophase.	Diminution de la prolifération des spermatogonies au cours des générations puis disparition de la spermatogenèse.
Zfx	Facteur de transcription.	Diminution du nombre des PGC.
Dazla	Liaison à l'ARN.	Diminution du nombre puis disparition des cellules germinales. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes chez les hétérozygotes.
c-myc	Proto-oncogène. Facteur de prolifération et de différenciation cellulaire.	Mauvaise différenciation des spermatocytes et spermatogonies en cas d'hyperexpression. Accumulation transitoire des spermatogonies et des spermatocytes en cas d'hyperexpression.
Bcl-2 (*exogène*)	Prévention de la mort cellulaire programmée (apodose).	Accumulation des spermatogonies et des spermatocytes préleptotènes.
Bax	Apoptose.	Augmentation du nombre de cellules apophatiques.
Expression en prophase de méiose I		
Dmc 1	Réparation de l'ADN ; Recombinaison méïotique.	Blocage de la méiose au stade zygotène. Apoptose.
Mlh 1	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN.	Blocage de la méiose au stade pachytène. Instabilité des microsatellites.
Pms 2	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN.	Anomalies synaptiques au stade pachytène. Instabilité des microsatellites.
Atm (*mutation dans l'ataxie télangiectasie*)	Détection des cassures double-brin de l'ADN. Recombinaison méiotique.	Blocage de la méiose aux stades zygotène-pachytène. Fragmentation Apoptose des chromosomes.
C-Abl	Association avec la protéine kinase dépendante de l'ADN, ADN-PK.	Défaut de progression en méiose après le stade pachytène.
Hsp 70-2	Désynapsis.	Apoptose en fin de stade pachytène.
A-myb	Régulation de la transcription.	Blocage de la méiose au stade pachytène
P53	Surveillance de l'intégrité du génome.	Apoptose. Dégénérescence des cellules pré-méiotiques et méiotiques. Présence de cellules géantes multiculturelles.
Expression aux stades méiotiques et postériorités		
B m p β b (bone morpho-genetic Proteins)	Protéine sécrétée de la famille du *transforming growth factor β (TGFβ).*	Défaut d'initiation de la méiose à la puberté. Augmentation de l'apoptose au stade pachytène chez l'adulte. Diminution du nombre des spermatides.
Bsg	Protéine transmembranaire de la superfamille des Ig.	Dégénérescence des cellules germinales au stade métaphase I.
Expression au stade haploïde		
CREM	Activateur de la transcription.	Blocage en début de spermatogénèse. Oligo- et térato-zoospermie chez l'hétérozygote.
mHR6B	Ubiquitinylation des histones 2A et 2B *in vitro*.	Absence quasi complète des spermatides. Tératozoospermie.
Bclw	Prévention de l'apoptose.	Blocage au stade des spermatides.
Prbp	Régulation traductionnelle.	Défaut de mise en place des protamines.
Acr	Acrosine. Protéase.	Retard dans la pénétration de la zone pellucide mais fertilité.
Ace	Enzyme de conversion de l'angiotensine.	Défaut de fixation à la zone pellucide.
Calmégine	Chaperone liée au Ca^2.	Défaut de fixation à la zone pellucide.

Tableau 2 : Infertilité mâle et gènes de méioses

GENE	FONCTIONS DE LA PROTEINE	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE HUMAINE (souris)	PHENOTYPE MUTANT		
			Mâle $^{-}/-$	Femelle $^{-}/-$	Phénotype des gonades
DMC 1 (Distrupted Meiotic cDNA1)	Réparation de l'ADN. Appariements homologues et échange d'ADN entre les chromosomes pendant la méiose.	22q12-13 (15)	Stérile	Stérile	Arrêt de gamétogenèse en prophase I : blocage de la méiose au stade zygotène précoce et apoptose.
Msh4 (Mut S homologue 4)	Synthèse d'ADN.	1p31 (3)	Stérile	Stérile	Défaut d'appariement pendant la méiose.
Msh5 (Mut S homologue 5)	Synthèse d'ADN. Réparation des mésappariements de l'ADN.	6p21.2-22.1 (17)	Stérile	Stérile	Non appariement des chromosomes en prophase I. Diminution de la taille testiculaire et perte complète des structures ovariennes.
SPO11	Initiation de la recombinaison méiotique.	20q13.2-13.3 (2)	Stérile	Stérile	Strutures des chromosomes modifiées. Erreur de recombinaison.
Cycline A1	Première division méiotique mâle.	13q12.3-13 (3)	Stérile	Fertile	Arrêt de spermatogénèse avant la 1ère division méiotique d'où apoptose. Défaut d'appariement des chromosomes. Réduction de l'activation de la kinase Cdc2 (protéine cible de CCNA1) en fin de prophase I.
Atm (mutation dans l'ataxie télangiectasie)	Kinase. Détection des cassures double-brin de l'ADN. Recombinaison méiotique.	11q23 (9)	Stérile	Stérile	Blocage de la méiose aux stades zygotène-pachytène : défaut d'appariement et fragmentation des chromosomes. Dégénérescence par apoptose.
Scp3 (SCYP3) (synaptonemal complex protein 3)	Protéine majeure de la formation du SC (synaptonemal complex) pendant la méiose.	(10)	Stérile	Fertile	Aucune formation des éléments axiaux/latéraux et du SC. Aucune synapse des chromosomes. Apoptose intense en prophase méiotique.
MRE11	Recombinaison, réparation et stabilité du génome en association avec RAD50 et p95.	11q21			
Mlh 1 (Mut L homologue 1)	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN : réparation de l'ADN et crossing-over méiotique.	3p21.3 (9)	Stérile	Stérile	Blocage de la méiose au stade pachytène. Instabilité des micro-satellites.
Pms 2	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN.	7p22 (5)	Stérile	Fertile	Anomalies synaptiques au stade pachytène. Instabilité des micro-satellites.
c-Abl (Abelson murine leukaemia oncogene)	Association avec la protéine kinase ADN dépendante, DNA-PK.	9p34.1 (2)	Mort périnatale	Mort périnatale	Défaut de progression en méiose après le stade pachytène. Létalité périnatale des deux homozygotes $^{-}/-$.
Hsp 70-2	Désynapsis.	14q24.1	Stérile	Fertile	Apoptose en fin de stade pachytène.
A-myb (mybl 1)	Régulation de la transcription.	8q22-23 (1)	Létal	Létal	Blocage de la méiose au stade pachytène. Apoptose Mortalité embryonnaire des homozygotes $^{-}/-$.

Fait à souligner chez l'homme, les mutations du gène de la myopathie de Duchenne sont plus souvent des délétions lors de l'ovogenèse, alors que les mutations ponctuelles de ce gène sont plus souvent retrouvées lors de la spermatogenèse. Cela suggère donc que les mécanismes de mutation et leur contrôle sont différents durant la gamétogenèse mâle et femelle.

Les mécanismes de la recombinaison génétique ont été largement étudiés chez la levure et font intervenir plusieurs gènes dits "de méiose". Récemment, certains de ces gènes ont été clonés et séquencés chez les mammifères, essentiellement souris et homme [7]. La souris est un bon modèle d'étude des conséquences de l'inactivation ou de la surexpression d'un gène donné, ce qui permet de tester la fonction biologique de ce gène. L'analyse des phénotypes de souris, dont certains gènes de méiose ont été invalidés par recombinaison homologue, montre que ces animaux présentent des caractéristiques gonadiques similaires à celles rencontrées dans certains cas d'infertilité dans l'espèce humaine. Nous allons nous attacher à présenter 5 gènes dit de méiose (DMC1, SPO11, MSH4, MSH5, CCNA1) qui sont fortement conservés au cours de l'évolution (de la levure à l'homme) (Tableau 2).

Quels sont les gènes de méiose retenus dans notre étude ?

1. Le gène DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA1)

Largement étudié chez *Saccharomyces cerevisiae*, le gène DMC1 code une protéine recombinase spécifique de la méiose qui présente des homologies avec la protéine Rec A, protéine intervenant pendant la mitose et la méiose [29]. La protéine DMC1 interviendrait dans la régulation du cycle cellulaire, l'appariement homologue et l'échange d'ADN entre les chromosomes [3]. Les souris Dmc1 $^{-}$/-, mâles ou femelles, sont stériles avec arrêt de la gamétogenèse dans la première prophase méiotique [9]. Les gonades des deux sexes sont plus petites chez les mutants. Chez les mâles, cette mutation nulle de Dmc1 entraîne un arrêt de méiose des spermatogonies au stade zygotène ; ces cellules dégénèrent ensuite par apoptose. Chez les femelles, l'ovogenèse s'arrête au cours de la vie fœtale. Les cellules germinales dégénèrent par la suite et sont absentes de l'ovaire adulte. Les ovaires deviennent donc très petits et ne contiennent ni ovocytes, ni follicules [30].

2. Le gène SPO 11

Le gène SPO11, gène initialement décrit chez la levure, est nécessaire pendant la recombinaison méiotique et la ségrégation des chromosomes et plus spécifiquement lors de la formation des cassures double-brins dans les chromosomes homologues appariés. Chez la souris, la protéine Spo11 pourrait générer les cassures de chromosomes qui initient la recombinaison méiotique à travers une série de réactions impliquant entre autre, la protéine DMC1 [21,37]. La délétion de ce gène conduit à un défaut de méiose responsable de l'infertilité de ces souris [2]. La structure des chromosomes est modifiée et des erreurs de recombinaison apparaissent conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et/ou à l'apoptose avant la première division. Chez le mâle SPO11 $^{-}$/-, les spermatocytes s'engagent dans la voie de l'apoptose en début de prophase. Chez les femelles $^{-}$/-, les ovocytes atteignent le stade diplotène en nombres normaux puis, dégénèrent rapidement après la naissance.

3. Les gènes Mut S Homologue (Mut S, E Coli Homolog of)

Le système MutS d'E.coli est hautement conservé durant l'évolution. Les membres de cette famille sont des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la recombinaison génétique et les modifications chimiques de l'ADN ou des pools de nucléotides. Deux gènes interviennent plus spécifiquement dans la méiose : Msh4 et Msh5. Chez la levure, ils interagissent pour former un complexe hétéroligomérique qui lui-même serait en interaction avec des intermédiaires de recombinaison lors de la méiose [31].

a) Msh4

Chez la levure, Msh4 est une protéine spécifique de la méiose mais non impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle intervient dans la ségrégation des chromosomes homologues en première division de méiose. Chez l'homme, les transcrits MSH4 sont présents dans le testicule et dans l'ovaire où ils contrôlent la méiose. Chez le mâle, la protéine MSH4 est présente dans le noyau des spermatocytes au cours de la prophase I précoce. L'inactivation de Msh4 dans la souris entraîne la stérilité des homozygotes mâles et femelles due à des défauts d'appariement au cours de la méiose. Les chromosomes ne se condensent plus, ce qui induit l'entrée en apoptose des spermatocytes lors de la prophase I. La méiose est aussi arrêtée chez les femelles Msh4^{-}/- au cours la prophase I. Cette erreur d'appariement induit l'apoptose et donc une perte du groupe d'ovocytes. Il en résulte un arrêt du développement des ovaires qui finissent par disparaître complètement à l'âge adulte [22].

b) MSH5

Comme Msh4, Msh5 est une protéine qui intervenient pendant la méiose chez la levure. Chez l'homme, le gène MSH5 est impliqué dans l'appariement des chromosomes au cours de la méiose [9]. Son inactivation, chez la souris, produit des animaux stériles mais viables. La méiose, chez ces animaux, est affectée par le non-appariement des chromosomes au cours de la prophase I. Cette erreur méiotique conduit à une diminution de la taille des testicules qui deviennent dépourvus de spermatozoïdes. L'observation des tubes séminifères chez ces mutants indiquent un arrêt de la spermatogenèse donc absence totale de spermatozoï-

des épidymaires causant ainsi une réduction de 70% de la taille testiculaire. Les femelles Msh5 -/- présentent des oviductes et des utéri normaux. Les ovaires sont normaux en taille à la naissance, mais dégénèrent progressivement, de manière concomitante avec le déclin du nombre d'ovocyte, si bien que l'adulte présente une perte complète des structures ovariennes. Les ovocytes en dégénérescence n'initient pas la folliculogenèse. La fonction normale de MSH5 est donc essentielle pour la progression de la méiose dans les deux sexes.

Les similitudes dans les phénotypes des souris Msh4 -/- et Msh5 -/- indiquent que chez les mammifères, MSH5 intervient en amont de MSH4, mais que ces deux protéines sont nécessaires au même moment de la méiose pour assurer l'intégrité de la synapse chromosomique [22].

4. Cycline de type A1

Les cyclines et leurs kinases constituent une grande famille de protéines intervenant entre autre dans la régulation du cycle cellulaire. Chez les mammifères, la famille des cyclines de type A est composée de deux membres, la cycline A1 codée par le gène Ccna1 et la cycline A2 codée par le gène Ccna2. La cycline A2 est impliquée dans les transitions G1/S et G2/M et l'inactivation de son gène dans la souris est létale. La cycline A1 est exprimée chez la souris adulte exclusivement dans les cellules germinales mâles en fin de prophase [33]. Chez l'Homme, elle est fortement exprimée dans le testicule. L'inactivation du gène Ccna1 a été effectuée chez la souris [24]. Les femelles Ccna1 -/- sont normales et fertiles. Les mâles -/- sont stériles suite à un arrêt de la spermatogenèse avant la première division méiotique. L'absence de cycline A1 induit l'apoptose dans les cellules germinales, suite à des anomalies d'appariement des chromosomes et à une diminution de l'activation de la kinase cdc29 (protéine cible de la cycline A1) en fin de prophase méiotique. Les auteurs en déduisent donc que la cycline A1 serait essentielle à l'entrée en première division méiotique du spermatocyte de souris, rôle ne pouvant être suppléé par d'autres cyclines.

Nous avons recherché les mutations hypothétiques dans 5 gènes de méiose (DMC1, SPO11, MSH4, MSH5, CCNA1) sur différents patients présentant une infertilité d'origine inconnue et bien caractérisées d'un point de vue clinique:

- 44 femmes âgées de 18 à 31 ans à caryotype normal 46,XX avec une insuffisance ovarienne précoce (sans BPES) et une aménorrhée primaire ou secondaire ;
- 101 hommes à caryotype normal 46,XY sans aucune micro-délétion sur le chromosome Y mais avec azoospermie ;
- 36 témoins fertiles obtenus par le Centre National du Génotypage.

Pour ceci, nous avons utilisé une approche de séquençage des exons des gènes retenus dans cette étude. L'ADN des patients et des témoins est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques du gène à tester. Ces produits de PCR sont ensuite séquencés. Chaque séquence obtenue est alignée (ainsi que les jonctions exon/intron) par comparaison avec la séquence du gène humain correspondant et disponible dans Genbank.

Nous avons dans notre étude préliminaire, observé des mutations des gènes DMC1 et MSH4 associées à des cas d'azoospermies et à un cas de ménopause précoce. Cependant des études familiales et l'effet de ces mutations chez la levure sont en progrès pour valider l'effet délétère de ces mutations.

VII. CONCLUSION

Le diagnostic d'infertilité en clinique humaine est rendu difficile par notre pauvre connaissance des mécanismes moléculaires responsables de ce phénotype. Pourtant il existe maintenant plusieurs modèles animaux obtenus par invalidation de gène, mais à ce jour ces gènes ne semblent pas expliquer à eux seuls, la grande majorité de cas observés en clinique humaine. Cela évidemment rend plus difficile un diagnostic précis et donc de possibles traitements chez ces couples.

À l'inverse, si des gènes conservés dans l'évolution sont responsables chez la souris invalidée d'infertilité, cela pourrait nous permettre de découvrir des cibles de contraception transitoire ou permanente.

REFERENCES

1. AYOUB N., RICHLER C., WAHRMAN J. : Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis. Chromosoma, 1997, 106 : 1-10.
2. BAUDAT F., MANOVA K., YUEN J.P., JASIN M., KEENEY S.: Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking spo11. Mol. Cell., 2000, 6 : 989-998.
3. BISHOP D.K., 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.
4. BHASIN S., MA K., SINHA I. et al. : The genetic basis of male infertility. Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 1998, 27 : 783-805.
5. BIELANSKA M., TAN S.L., AO A. : Fluorescence *in situ* hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter syndrome 46,XY/47,XXY male. Hum. Reprod., 15 : 440-444.
6. CHANG P.L., SAUER M.V., BROWN S. : Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. Hum. Reprod., 1999, 14 : 2689-2694.
7. Comité Consultatif National d'Ethique - Génétique et médecine :

de la prédiction à la prévention. Cahiers du CCNE pour les Sciences de la vie et de la Santé, 1996, 6.

8. DE PERDIGO A., GABRIEL-ROBEZ O., RUMPLER Y. : Analysis of synaptonemal complexes in a heterozygous human male carrier of a reciprocal translocation involving an acrocentric chromosome : heterosynapsis without previous homosynapsis. Hum. Genet., 1991, 87 : 602-606.

9. EDELMANN W., COHEN P.E., KNEITZ B. et al. : Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. Nat. Genet., 1999, 21 : 123-127.

10. ESTOP A.M., MUNNE S., CIEPLY K.M., VANDERMARK K.K., LAMB A.N., FISH H. : Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence *in situ* hybridization analysis. Hum. Reprod., 1998, 13 : 124-127.

11. FOOTE S., VOLLRATH D., HILTON A., PAGE D.C. : The human Y chromosome : overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. Science, 1992, 258 : 60-66.

12. FORESTA C., FERLIN A., GAROLLA A., ROSSATO M., BARBAUX S., DE BORTOLI A. : Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1997, 82 : 1075-1080.

13. GABRIEL-ROBEZ O., RUMPLER Y. : The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness. II. Robertsonian and reciprocal translocations. A European collaborative study. Ann. Genet., 1996, 39 : 17-25.

14. GABRIEL-ROBEZ O., RATOMPONIRINA C., CROQUETTE M., MAETZ J.L., COUTURIER J., RUMPLER Y. : Reproductive failure and pericentric inversion in man. Andrologia, 1987, 19 : 662-669.

15. GEKAS J., THEPOT F., TURLEAU C. et al. : Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI : an equal risk of constitutional aberrations in women and men. Hum. Reprod., 2001, 16 : 82-90.

16. GUICHAOUA M.R., DE LANVERSIN A., CATALDO C. et al. : Three dimensional reconstruction of human pachytene spermatocyte nuclei of a 17;21 reciprocal translocation carrier : study of XY-autosome relationships. Hum. Genet., 1991, 87 : 709-715.

17. GUICHAOUA M.R., DELAFONTAINE D., NOEL B., LUCIANI J.M. : Male infertility of chromosomal origin. Contracept. Fertil. Sex., 1993, 21 : 113-121.

18. GUTTENBACH M., MICHELMANN H.W., HINNEY B., ENGEL W., SCHMID M. : Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype : a FISH analysis. Hum. Genet., 1997, 99 : 474-477.

19. JAAFAR H., GABRIEL-ROBEZ O., RUMPLER Y. : Chromosomal anomalies and disturbance of transcriptional activity at the pachytene stage of meiosis : relationship to male sterility. Cytogenet. Cell. Genet., 1993, 64 : 273-280.

20. KAMP C., HIRSCHMANN P., VOSS H., HUELLEN K., VOGT P.H. : Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. Hum. Mol. Genet. 2000, 9 : 2563-2572.

21. KEENEY S., GIROUX C.N., 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.

22. KNEITZ B., COHEN P.E., AVDIEVICH et al. : 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.

23. KRAUSZ C., BUSSANI-MASTELLONE, C., GRANCHI, S. et al. : Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing ICSI procedure. Hum. Reprod., 1999, 14 : 1717-1721.

24. LIU D., MATZUK M.M., SUNG W.K., GUO Q., WANG P., WOLGEMUTH D.J. : Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. Nat. Genet., 1998, 20 : 377-380.

25. MATZUK M., LAMB S. : Genetic dissection mammalian infertility pathways. Nat. Cell. Biol. an. Nat. med., 2002, 1 : 41-49.

26. McELREAVEY K., KRAUSZ C., BISHOP C.E. : The human Y chromosome and male infertility. In : McElreavey K. eds. The Genetic Basis of Male Infertility. Heidelberg, Springer, 1999, 211.

27. MOREL F., ROUX C., BRESSON J.L. : Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men by multicolour fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Hum. Reprod., 2000, 6 : 566-570.

28. MROZ K., HASSOLD T.J., HUNT P.A. : Meiotic aneuploidy in the XXY mouse : evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. Hum. Reprod., 1998, 14 : 1151-1156.

29. PASSY S.I., YU X., LI Z. et al. : Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, 96 : 10684-10688.

30. PITTMAN D.L., COBB J., SCHIMENTI K. et al. : Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. Mol. Cell., 1998, 1 : 697-705.

31. POCHART P., WOLTERING D., HOLLINGSWORTH N.M. : Conserved properties between functionally distinct MutS homologs in yeast. J. Biol. Chem., 1997, 272 : 30345-30349.

32. PRYOR J.L., KENT-FIRST M., MUALLEM A. et al. : Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. N. Engl. J. Med., 1997, 336 : 534-539.

33. RAVNIK S.E., WOLGEMUTH D.J. : Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis : the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. Dev. Biol., 1999, 207 : 408-418.

34. REIJO R., ALAGAPPAN R.K., PATRIZIO P., PAGE D.C. : Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet, 347 : 1290-1293.

35. REIJO R., LEE T.Y., SALO P. et al. : Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat. Genet., 10 : 383-393.

36. RIVES N., JOLY G., MACHY A., SIMEON N., LECLERS P., MACE B. 2000. : Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males : comparison with fertile and infertile males with normal karyotypes. Mol.

Hum. Reprod., 2000, 6 : 107-112.

37. ROMANIENKO P.J., CAMERINI-OTERO R.D. : The mouse spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. Mol. Cell., 2000, 6 : 975-987.

38. SIMONI M., KAMISCHKE A., NIESCHLAG E. : Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. Hum. Reprod., 1998, 13 : 1764-1768.

39. SIMONI. M., GROMOLL J., DWORNICZAK B. et al. : Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. Fertil. Steril., 1997, 67 : 542-547.

40. SOLARI A.J. : Synaptonemal complex analysis in human male infertility. Eur. J. Histochem., 1999, 43 : 265-276.

41. SUN C., SKALETSKY H., BIRREN B., : An azoospermic man with a *de novo* point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. Nat. Genet., 1999, 23 : 429-432.

42. TIEPOLO L., ZUFFARDI O. : Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum. Genet., 1976, 34 : 119-124.

43. VAN ASSCHE E., BONDUELLE M., TOURNAYE H. et al. : Cytogenetics of infertile men. Hum. Reprod., 1996, 11 Suppl 4 : 1-24, discussion 25-26.

44. VERGNAUD G., PAGE D.C., SIMMLER M.C. et al. : A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. Am. J. Hum. Genet., 1986, 38 : 109-124.

45. VOGT P., CHANDLEY A.C., HARGREAVE T.B., 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.

46. VOGT P.H., EDELMANN A., KIRSCH S. et al. : Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum. Mol. Genet., 1996, 5 : 933-943.

47. VOGT PH., EDELMANN A., KIRSCH S. et al. : Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum. Mol. Genet., 1996, 5 : 933-943.

48. VOLLRATH D., FOOTE S., HILTON A. et al. : The human Y chromosome : a 43-interval map based on naturally occurring deletions. Science, 1992, 258 : 52-59.

ABSTRACT

New approaches to the genetics of male infertility

Marc FELLOUS, Jean-Pierre SIFFROI

15% of couples worldwide present with reproduction difficulties related to infertility. To date, very few genetic causes have been associated with male or female infertility.

The identification of single-gene mutations causing male infertility is not a field of intense research at the present time, although they are probably responsible for a large number of so-called idiopathic cases of infertility.

Murine models were created several years ago by gene knock-out by genetic recombination: more than 200 genes have been shown to be responsible for isolated syndromic infertility. This is the case for genes controlling meiosis.

The course of meiosis and the genes associated with this process have been largely characterized in yeasts. Mammalian homologues were recently cloned and knocked out in mice, demonstrating their essential roles during meiosis and gametogenesis. The gonadal phenotype of these mutant animals is similar to that of certain patients with unexplained infertility. The search for possible mutations in meiosis genes, genes that have been highly preserved during evolution, is currently underway.

These murine models are very useful to study and dissect the various steps of normal and pathological gametogenesis in mammals.

This progress should lead, in the near future, to more precise diagnosis and therefore informed genetic counselling in these infertile couples.

Key-Words: *infertility, genetic causes, single-gene mutations, meiosis genes*