



**HAL**  
open science

# Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles

Aurélie Mouka

## ► To cite this version:

Aurélie Mouka. Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles. Biologie de la reproduction. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS300 . tel-01781045

**HAL Id: tel-01781045**

**<https://theses.hal.science/tel-01781045>**

Submitted on 29 Apr 2018

**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.

## Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée dans le service  
d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique de l'Hôpital Antoine Béclère

École doctorale n°568 signalisations et réseaux intégratifs en biologie Biosigne



Spécialité de doctorat : Recherche clinique, innovation technologique, santé  
publique

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 28 septembre 2017 par

**Aurélie Mouka**

Composition du Jury :

Pr Virginie ROUILLER-FABRE Professeur des Universités, Université Paris Diderot Paris 7, UMR967 Laboratoire de Développement des Gonades, CEA	Présidente
Pr Jean-Michel DUPONT PU-PH, Université Paris Descartes Paris 5, Hôpital Cochin	Rapporteur
Pr Jean-Pierre SIFFROI PU-PH, Université Pierre et Marie Curie Paris 6 Hôpital d'Enfants Armand Trousseau	Rapporteur
Dr Rima HADDAD Maître de Conférences, Université Paris Sud, UMR967 Laboratoire des cellules souches hématopoïétiques et leucémiques, CEA	Examinatrice
Pr Gabriel LIVERA Professeur des Universités, Université Paris Diderot Paris 7 UMR967 Laboratoire de Développement des Gonades, CEA	Examineur
Pr Gérard TACHDJIAN PU-PH, Université Paris Sud, Hôpital Antoine Béclère	Directeur de thèse
Dr Lucie TOSCA MCU-PH, Université Paris Sud, Hôpital Antoine Béclère	Co-Directrice de thèse



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique des Hôpitaux Universitaires Paris Sud, sur le site de l'Hôpital Antoine Béchère. Avant d'exposer mes travaux qui ont abouti à la rédaction de ce mémoire, je tiens à remercier l'école doctorale Biosigne pour m'avoir accordé un financement et pour m'avoir permis d'être monitrice et donc de pouvoir enseigner durant ces trois années de thèse.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, le Pr Jean-Michel Dupont et le Pr Jean-Pierre Siffroi, rapporteurs, le Pr Virginie Rouiller-Fabre, présidente, le Dr Rima Haddad et le Pr Gabriel Livera, examinateurs, pour avoir accepté d'expertiser ce travail de thèse et ainsi de participer à ma soutenance. Je remercie particulièrement les Pr Virginie Rouiller-Fabre et Jean-Michel Dupont pour avoir évalué le travail à mi-parcours.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Pr Gérard Tachdjian, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance, ainsi que votre soutien positif durant ces années passées au sein du laboratoire.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Dr Lucie Tosca pour son encadrement hors pair qui a permis l'aboutissement de ce travail. Je te remercie pour ton implication, ta rigueur scientifique, ta disponibilité et tes qualités humaines qui m'ont profondément touchée. Merci pour tes conseils avisés et ton soutien durant ces années. Je te suis très reconnaissante pour le temps que tu as pris pour m'aider à réaliser mon projet. Je n'aurais pas pu souhaiter ni même espérer meilleur encadrement. Merci beaucoup Lucie.

Je remercie également le Dr Sophie Brisset avec qui j'ai pu faire mes premiers pas dans l'enseignement. Merci pour ta pédagogie, ta gentillesse et ta bonne humeur. Je les ai particulièrement appréciées durant ces années de thèse.

Je tiens également à remercier mon voisin de bureau, le Dr Loïc Drévilion, pour cette bonne ambiance que dis-je... cette « joie de vivre » qui s'est instaurée dans notre bureau. Merci pour ta bonne humeur, pour ton aide et tes encouragements.

Je souhaiterais également exprimer ma gratitude pour tous ces bons moments passés auprès de mes anciens collègues. En particulier à Jessika Anasthase qui me manque tout particulièrement. Ces deux premières années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans ta présence.

J'adresse aussi mes remerciements à mes amies et collègues Ingrid Wieder et Lilia Kerkabou sans qui cette dernière année de thèse n'aurait pas eu la même saveur. Je suis reconnaissante pour vos encouragements, votre soutien affectif et votre bonne humeur quotidienne. Merci pour l'ambiance de travail très agréable que vous avez su créer.



Je remercie l'équipe de l'institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes du CEA de Fontenay-aux-Roses pour son accueil et pour les moyens matériels nécessaires à l'accomplissement d'une partie de mes travaux. Merci à Rafika Jarray et Franck Yates pour leur gentillesse, leur disponibilité ainsi que leur participation. Un grand merci tout particulier au Dr Leila Maouche-Chrétien, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer et qui a été d'une aide précieuse tout au long de cette thèse. Merci beaucoup Leila pour ta disponibilité, ta sympathie, tes conseils et tes critiques. Cela a guidé mes réflexions.

J'associe à ces remerciements le Pr Gabriel Livera et toute équipe du Laboratoire de Développement des Gonades du CEA de Fontenay-aux-Roses pour leur accueil chaleureux, leur sympathie et pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvée au CEA. Un remerciement tout particulier à Brahim Arkoun pour l'initiation à l'univers de la différenciation germinale.

Je tiens à remercier les patients et leurs familles pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie l'ensemble de l'équipe technique de Cytogénétique et de Biologie Moléculaire, la secrétaire ainsi que la cadre du service et en particulier Virginie Benoit pour son aide au cours de ces derniers mois.

Je désire en outre remercier les médecins prescripteurs : les Dr Vincent Izard, Sophie Brisset et Claire Bouvattier, sans qui ce travail n'aurait pas pu se concrétiser.

Merci au Dr Anne Mayeur avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer et qui s'est montrée d'une aide précieuse pour les prélèvements. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité.

Je remercie vivement monsieur Didier Goidin pour son accompagnement tout au long du design de la puce et pour le temps qu'il a consacré.

Je ne pourrais finir ces remerciements sans penser à ma famille et mes amis, qui m'ont accompagnée, aidée, soutenue et encouragée tout au long de la réalisation de ce mémoire. Et plus particulièrement à ma mère pour m'avoir toujours soutenue et pour avoir toujours cru en moi. Je te remercie pour ton soutien affectif sans faille sans lequel je n'aurais pas pu mener à bien mes projets d'étude.

Enfin, le dernier, mais certainement pas le moindre, je remercie Jean-Philippe pour ses encouragements constants, pour m'avoir aidé à me vider la tête quand il le fallait et surtout pour avoir toujours été là pour moi. Ces années de thèses n'auraient pas été les mêmes sans toi à mes côtés. Merci Jean-Philippe.



## Publications

- Primordial germ cells differentiation from human induced pluripotent stem cells of infertile men carrying genetic abnormalities. **Mouka A**, Arkoun B, Dréville L, Jarray R, Brisset S, Mayeur A, Petersen L, Mehrjouy MM, Tommerup N, Boland-Auge A, Deleuze JF, Yates F, Livera L, Tachdjian G, Maouche-Chrétien L, Tosca L (en préparation).
- Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal rearrangement as a genetic model for infertility studies. **Mouka A**, Izard V, Tachdjian G, Brisset S, Yates F, Mayeur A, Dréville L, Jarray R, Leboulch P, Maouche-Chrétien L, Tosca L *Sci Rep* 2017;7:39760.
- *In Vitro* Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility. **Mouka A**, Tachdjian G, Dupont J, Dréville L, Tosca L *Stem Cells Dev* 2016;25(7):509-21.

## Participation à des congrès nationaux / internationaux

### Communications affichées :

- **Mouka A**, Dréville L, Benabides M, Izard V, Goidin D, Brisset S, Tosca L, Tachdjian G. Cryptic copy number variations identification in a cohort of men with non-obstructive azoospermia by custom-designed high-density array-CGH. 11<sup>th</sup> European Cytogenetics Association (ECA) Conference Florence, Italie 1<sup>er</sup>- 4 juillet 2017.
- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Yates F, Mayeur A, Dréville L, Jarray R, Tachdjian G, Maouche-Chrétien L, Tosca L. Génération de cellules iPS comme modèle génétique pour l'étude de l'infertilité associée à un remaniement chromosomique. Colloque Recherche de la Faculté de Médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre 6 décembre 2016.
- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Dréville L, Anasthase., Tachdjian G, Tosca L. Characterization of a *de novo* complex chromosomal rearrangement with five breakpoints associated with azoospermia. 10<sup>th</sup> European Cytogenetics Association (ECA) Conference, Strasbourg, 4-7 juillet 2015.
- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Dréville L, Tachdjian G, Tosca L, Characterization of a *de novo* complex chromosomal rearrangement with five breakpoints associated with azoospermia. Journées ReproSciences, Rennes 13-15 avril 2015.

### Communications orales :

- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Yates F, Mayeur A, Dréville L, Jarray R, Tachdjian G, Maouche-Chrétien L, Tosca L. Dérivation de cellules souches pluripotentes induites à partir d'un patient azoosperme porteur d'un remaniement chromosomique complexe : un modèle d'étude *in vitro* de l'infertilité. AG des Biologistes des laboratoires d'études de la fécondation et de la conservation de l'œuf (BLEFCO), Paris 17 mai 2017.
- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Yates F, Mayeur A, Dréville L, Jarray R, Tachdjian G, Maouche-Chrétien L, Tosca L. Generation and characterization of induced Pluripotent Stem Cells from an infertile man carrying a complex chromosomal rearrangement. Congrès annuel de la Société française de thérapie cellulaire génique (SFTCG). Marseille, 9-11 mars 2016.
- **Mouka A**. Caractérisation d'un remaniement chromosomique complexe associé à cinq points de cassure chez un patient azoosperme. DESC de Cytogénétique. Paris, 16 novembre 2016.
- **Mouka A**, Izard V, Brisset S, Dréville L, Tachdjian G, Tosca L, Characterization of a *de novo* complex chromosomal rearrangement with five breakpoints associated with azoospermia. Journées ReproSciences. Rennes, 13-15 Avril 2015.





- **Mouka A** Brisset S, Drévilion L, Petit F, Anasthase J, Guibert J, Izard V, Armanet N, Métay C, Mantel A, Tachdjian G, Tosca L. Caractérisation moléculaire de remaniements chromosomiques chez des patients azoospermes. 22<sup>ème</sup> colloque de l'association des cytogénéticiens de langue française (ACLF). Lyon, 10- 12 septembre 2014.

**Prix :**

- Prix Poster 11<sup>th</sup> European Cytogenetics Association (ECA) Conference 2017
- Prix Poster Colloque Recherche de la Faculté de Médecine Paris-Sud, 2016



## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	9
<b>INTRODUCTION</b> .....	11
<b>CHAPITRE 1 : Bases de la génétique de l'infertilité masculine et fonction de la reproduction</b> .....	12
<b>I. L'infertilité masculine</b> .....	13
<b>A. Généralités</b> .....	13
1. Définition de l'infertilité	
2. Considérations sur l'infertilité masculine	
3. Etiologies de l'infertilité masculine	
<b>B. Evaluation de l'infertilité masculine en pratique médicale</b> .....	15
1. Examen clinique	
2. Principales étiologies masculines mises en évidence par l'analyse du spermogramme	
3. Bilan génétique	
<b>II. Cellules germinales primordiales et développement gonadique chez les mammifères</b> .	18
<b>A. Origine et migration des cellules germinales primordiales</b> .....	18
1. Origine fœtale des cellules germinales primordiales	
2. Migration et survie des cellules germinales primordiales	
<b>B. De l'ébauche gonadique au testicule</b> .....	23
1. Mise en place et contrôle génétique des structures sexuelles indifférenciées	
2. Contrôle génétique de la formation des crêtes génitales	
<b>C. Etapes du déterminisme sexuel : du sexe génétique au sexe gonadique</b> .....	24
1. Le rôle déterminant du chromosome Y et du gène <i>SRY</i>	
2. Les voies génétiques du déterminisme sexuel : <i>SRY</i> et la cascade des gènes impliqués	
<b>D. Développement des voies génitales masculines</b> .....	29
1. Différenciation des voies génitales masculines	
2. Contrôle hormonal du sexe phénotypique	
<b>III. La spermatogenèse et son contrôle</b> .....	32
<b>A. Le testicule : lieu de la spermatogenèse</b> .....	32
<b>B. Haploïdisation des cellules germinales</b> .....	33
1. La méiose	
2. La spermiogenèse : étape de maturation terminale	
<b>IV. Contrôle hormonal de la fonction testiculaire</b> .....	36
<b>A. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique</b> .....	37
<b>B. Spermatogenèse et messages hormonaux</b> .....	37
1. Régulation de la spermatogenèse par les androgènes	
2. FSH et spermatogenèse	
<b>V. Génétique de l'infertilité masculine</b> .....	40
<b>A. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine</b> .....	40
1. Anomalies de nombre des chromosomes	
2. Formation et appariement des remaniements chromosomiques lors de la méiose	
3. Anomalie chromosomique et défaut de formation de la vésicule sexuelle	
4. Mécanisme de formation des remaniements chromosomiques	



<b>B. Microdélétions des régions AZF du chromosome Y</b> .....	47
<b>C. Désordres du développement sexuel et infertilité : pathologies du développement gonadique</b> .....	48
1. Les hommes 46,XX DSD	
2. Les hommes 46,XY DSD	
<b>D. Gènes et anomalies de la spermatogenèse</b> .....	51
1. Hypogonadisme hypogonadotrope	
2. Atteintes testiculaires de l'infertilité masculine	
3. Défaut spécifique des spermatozoïdes	
4. Infertilité et défaut post-testiculaire	
<b>E. Microremaniements cryptiques et infertilité</b> .....	53
<b>CHAPITRE 2 : Cellules souches pluripotentes induites (iPS) et différenciation germinale</b> ....	54
<b>I. Les cellules souches embryonnaires murines et humaines</b> .....	55
<b>A. Stade blasocyste et cellules souches pluripotentes</b> .....	55
<b>B. Découverte et dérivation des cellules pluripotentes <i>in vitro</i></b> .....	56
1. Historique	
2. Deux états dynamiques de cellules souches pluripotentes : naïf et amorcé	
3. Les cellules ES humaines : un état naïf ou amorcé de la pluripotence ?	
<b>C. Intérêt et enjeux de la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines</b> .....	63
<b>D. Enjeux éthiques et limites de la recherche sur l'embryon et les cellules hES</b> .....	64
<b>II. Les cellules souches pluripotentes induites : une alternative aux cellules ES</b> .....	65
<b>A. La reprogrammation cellulaire induite</b> .....	65
<b>B. Choix des cellules reprogrammées</b> .....	66
<b>C. Facteurs de reprogrammation</b> .....	66
1. Combinaisons des facteurs de transcription	
2. Composées chimiques augmentant l'efficacité de la reprogrammation cellulaire	
<b>D. Evolution des techniques de reprogrammation</b> .....	68
1. Méthodes de reprogrammation et vecteurs intégratifs	
2. Méthodes de reprogrammation sans modification du génome	
<b>E. Les cellules hiPS : une alternative aux cellules hES ?</b> .....	71
1. Des caractéristiques comparables aux cellules souches embryonnaires	
2. Les cellules iPS sont-elles différentes des cellules ES ?	
3. Intérêt des cellules iPS en recherche et en thérapie cellulaire	
4. Différenciation des cellules hiPS	
<b>III. Différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules de la lignée germinale</b> .....	74
<b>A. IPS et état naïf de pluripotence : un entretien et une spécification plus efficace</b> .....	74
<b>B. Différenciation des cellules souches pluripotentes vers la lignée germinale</b> .....	75
→ <b>REVUE</b>	
<b>OBJECTIFS</b> .....	78
<b>PATIENTS ET METHODES</b> .....	80
<b>I. Patients, répartition et éléments cliniques</b> .....	81
<b>A. Critères d'inclusion et d'exclusion</b> .....	81
<b>B. Patient azoosperme à caryotype anormal</b> .....	81



C. Patients présentant un désordre du développement sexuel .....	82
D. Patients à caryotype normal (cohorte de 43 patients) .....	83
<b>II. Caractérisation par cytogénétique conventionnelle et moléculaire .....</b>	<b>83</b>
A. Caryotype standard .....	83
B. Hybridation <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) .....	84
1. Le principe	
2. Application	
C. Hybridation génomique comparative sur puce à ADN (technologie CGH-array) .....	85
1. Principe	
2. Protocole expérimental (technologie Agilent)	
3. Confection d'une CGH-array à façon	
4. Analyse et interprétations des données	
D. Recherche de microdélétions du chromosome Y .....	88
E. Séquençage .....	88
1. Séquençage de type mate-pair (Patient 1)	
2. Séquençage génome entier (Patient 2)	
<b>III. Génération d'un modèle de cellules iPS à partir d'érythroblastes de patients .....</b>	<b>90</b>
A. Purification des cellules mononucléées du sang périphérique et expansion des érythroblastes .....	90
B. Reprogrammation non-intégrative des érythroblastes .....	90
C. Pluripotence des cellules hiPS générées .....	91
<b>IV. Différenciation des cellules iPS en cellules de la lignée germinale .....</b>	<b>92</b>
A. Réversion de l'état amorcé vers l'état naif de la pluripotence .....	92
B. Différenciation des cellules hiPS à l'état naif en cellules de la lignée germinale .....	92
<b>RESULTATS .....</b>	<b>95</b>
I. Génération d'une lignée de cellules pluripotentes induites à partir d'érythroblastes d'un homme azoosperme porteur d'un remaniement chromosomique complexe : un modèle <i>in vitro</i> pour l'étude de l'infertilité masculine .....	96
→ ARTICLE 1	
II. Modélisation <i>in vitro</i> de l'infertilité masculine : différenciation germinale à partir de cellules iPS humaines naïves issues de deux patients infertiles .....	98
→ ARTICLE 2	
III. Identification et caractérisation de microremaniements chromosomiques cryptiques chez des patients présentant une azoospermie-cryptozoospermie ou un désordre du développement sexuel par CGH personnalisée .....	100
A. Contribution à l'identification de microremaniements chromosomiques cryptiques à l'origine de l'azoospermie non-obstructive-cryptozoospermie d'une cohorte de 43 hommes .....	100
1. Caractérisation générale des CNV	
2. Les CNV récurrents	
3. Association de CNV et infertilité : cas des gènes <i>GSTM1</i> et <i>GSTT1</i>	
4. Identification de CNV isolés au sein de la cohorte	
5. Microremaniements des régions AZF	
B. Contribution à l'identification de microremaniements chromosomiques cryptiques à l'origine d'un désordre du développement sexuel .....	109
1. Patient 2 : 46,XX-SRY-négatif DSD	





- Patient 3 : 46,XY-SRY positif DSD

<b>DISCUSSION</b> .....	111
<b>I. Génération de cellules iPS</b> .....	112
<b>A. Caractérisation cytogénétique et moléculaire des patients 1 et 2</b> .....	112
1. Caractérisation moléculaire d'un remaniement chromosomique complexe	
2. Caractérisation moléculaire d'un homme 46,XX-SRY-négatif	
<b>B. Génération de cellules iPS à partir des patients 1 et 2 présentant une anomalie génétique</b> .....	113
<b>II. Développement d'un modèle cellulaire <i>in vitro</i> de cellules germinales dans un contexte d'anomalies chromosomiques : différenciation de cellules iPS de patients infertiles en cellules germinales primordiales</b> .....	115
<b>A. Choix d'une stratégie</b> .....	115
1. Le choix de la conversion vers un état naïf de la pluripotence	
2. Stabilité chromosomique et méthode de repiquage cellulaire	
3. BMP2/4 et différenciation germinale	
<b>B. Différenciation germinale dans un contexte de remaniement chromosomique complexe</b> .....	118
1. Comportement méiotique des RCC et fertilité	
2. Point de cassure et gène <i>SYCP3</i>	
<b>C. Modélisation d'un développement précoce anormal à l'aide de cellules souches pluripotentes induites et de CGP : expression des gènes et régulation épigénétique au cours du développement embryonnaire précoce</b> .....	120
<b>III. Développement d'une puce CGH-array personnalisée pour les patients présentant une azoospermie-cryptozoospermie ou présentant un désordre du développement sexuel</b> .....	121
<b>A. Mise au point d'un outil de diagnostic pour l'infertilité masculine et les cas de DSD</b> .....	121
1. Interprétation des données	
2. Comparaison des formats de puce à ADN : exemple des gènes d'intérêt <i>SYCP3</i> et <i>SOX9</i>	
<b>B. Validation de la puce à façon par l'analyse d'une cohorte</b> .....	123
1. CNV récurrents	
2. Identification de CNV isolés au sein de la cohorte	
3. Microdélétions des régions AZF	
4. CNV et proximité de séquence génique d'intérêt	
5. CNV et désordre du développement sexuel	
<b>PERSPECTIVES</b> .....	132
<b>I. Cellules iPS et différenciation germinale</b> .....	133
<b>II. Etude chromosomique des hommes infertiles et perspectives</b> .....	134
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	136
<b>ANNEXES</b> .....	161



## LISTE DES ABREVIATIONS

4i	4 inhibiteurs (CHIR99021, PD0325901, SB203580 et SP600125)
ABP	Androgen binding protein
AMH	Anti-müllerian hormone
AMP	Assistance médicale à la procréation
ANO	Azoospermie non-obstructive
aPKC	atypical protein kinase C
AR	Androgen receptor
BMP	Bone morphogenic protein
CGH-array	Array comparative genomic hybridization
CGP	Cellule germinale primordiale
CM	Canaux de Müller
CSP	Cellule souche embryonnaire
CW	Canaux de Wolf
DHT	Dihydrotestostérone
DSD	Disorder of sex development
EB	Embryoid body
EGF	Epidermal growth factor
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid disodium
EpiSC	Epiblast stem cell
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FSH	Follicle-stimulating hormone
FST	Follistatine
GB	Gonade bipotentielle
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
hES	human embryonic stem cells
hiPS	human induced pluripotent stem cells
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
INSL3	Insulin-like 3
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Jpc	Jour post-coïtum
LH	Luteinizing hormone
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
p38	MAP kinases p38
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PRDM1(BLIMP1)	PR/SET domain 1
PRDM14	PR/SET domain 14
RSPO1	R-spondin 1
SCF	Stem cell factor
SCOS	Sertoli cell-only syndrome
SCP	Synaptonemal complex protein
SF1	Steroidogenic factor 1
SG	Semaine de grossesse
Spc	Semaine post-coïtum
SMAD	Homolog of drosophila 'mothers against decapentaplegic
SOX2	SRY box 2
SOX9	SRY box 9



SOX17	Transcription factor SOX-17
SPO11	Sporulation protein, meiosis specific, Spo11 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
SRC	Proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
SRY	Sex determining region of the Y chromosome
SSEA1	Stage-specific embryonic antigen-1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
Stra8	Stimulated by retinoic acid gene 8
SVF	Sérum de veau fœtal
TFAP2C	Transcription factor AP-2 gamma
TGF	Transforming growth factor
TGFβ	Transforming growth factor β
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
WT1	Wilm's tumor 1
ZFP42 (REX1)	ZFP42 zinc finger protein



## **INTRODUCTION**





# **CHAPITRE 1**

Bases de la génétique de l'infertilité masculine  
et de la fonction de reproduction

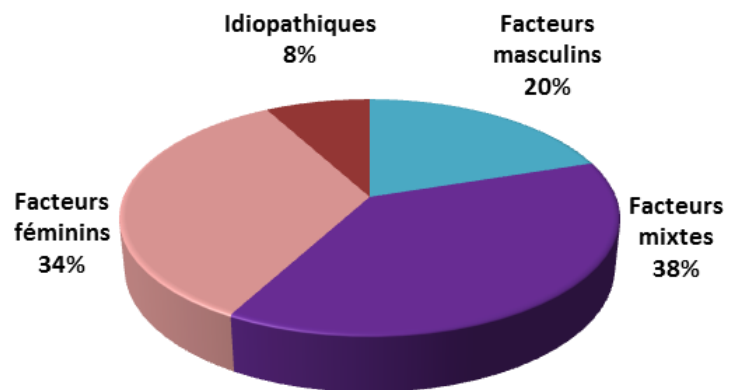


Figure 1 : Répartition des causes d'infertilité au sein des couples (d'après Thonneau *et al.*, 1991).

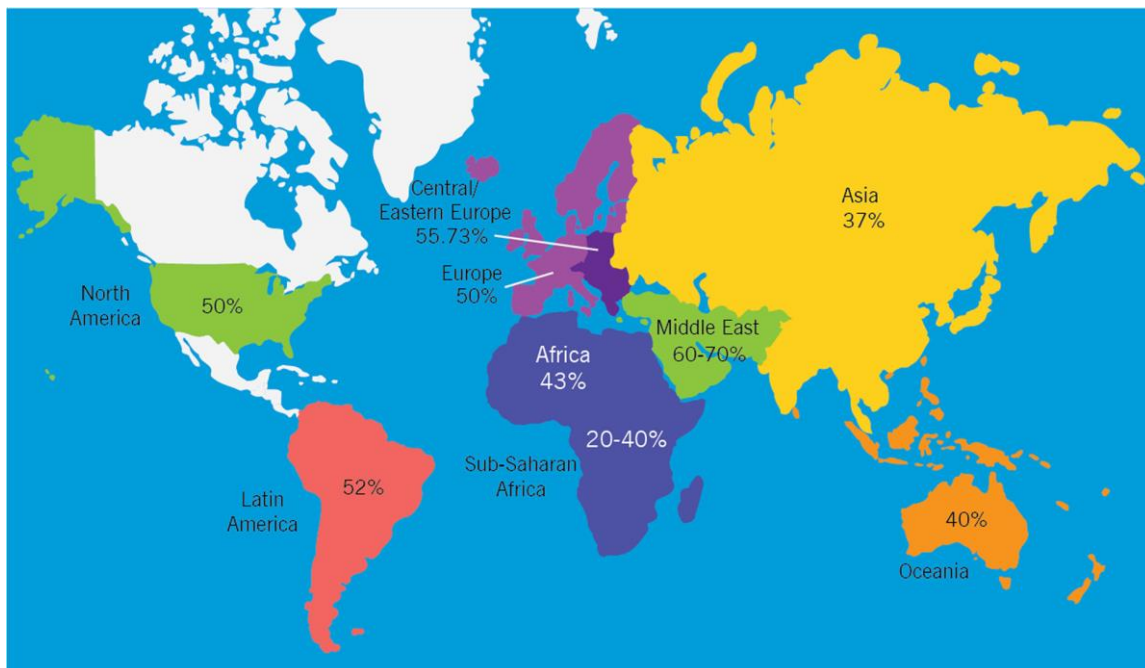


Figure 2 : Répartition à l'échelle mondiale du pourcentage de couples infertiles dont l'étiologie est uniquement masculine (Agarwal *et al.*, 2015).

## I. L'infertilité masculine

### A. Généralités

#### 1. Définition de l'infertilité

L'infertilité est un problème majeur de santé publique qui touche 10 à 15% des couples, soit approximativement 48,5 millions de couples dans le monde (Sharlip *et al.*, 2002, Ferlin *et al.*, 2007, Mascarenhas *et al.*, 2012). L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'infertilité comme l'incapacité pour un couple de concevoir un enfant après deux ans de rapports sexuels sans contraception (OMS 2010). Elle concerne aussi bien les femmes que les hommes (OMS 1999). Dans près de 30% des cas, un trouble de la fonction de reproduction est constaté chez les deux partenaires du couple, et dans 20% des cas, une étiologie masculine exclusive est retrouvée (Figure 1). Un facteur masculin est ainsi responsable de l'infertilité du couple, totalement ou partiellement, dans environ la moitié des cas (Thonneau *et al.*, 1991, Coutton *et al.*, 2012).

#### 2. Considérations sur l'infertilité masculine

L'infertilité masculine touche une part importante de la population (Figure 2). Une méta-analyse récente d'Agarwal collaborateurs, estime qu'au moins 30 millions d'hommes sont infertiles dans le monde (Agarwal *et al.*, 2015). Dans 40% des cas, des anomalies qualitatives et quantitatives des spermatozoïdes sont détectées. La qualité du sperme est un paramètre important pour évaluer la fertilité. Ces dernières années, une augmentation des consultations pour infertilité a été constatée, en parallèle d'une diminution de la qualité du sperme (Virtanen *et al.*, 2017). En 2010, l'Organisation mondiale de la santé a ainsi établi de nouvelles valeurs de référence des paramètres spermatiques (numération et motilité des spermatozoïdes), nettement inférieures que les précédentes (OMS, 1999). Les valeurs présentées dans le tableau 1 sont actuellement admises comme représentatives d'un sperme normal.

Les anomalies de nombre des spermatozoïdes sont une des principales causes d'infertilité ou de sub-fertilité. L'azoospermie et l'oligozoospermie sévère font référence respectivement à l'absence complète et à une diminution significative (<5 million spermatozoïdes/ml) des spermatozoïdes dans l'éjaculat. On estime que 10 à 20% des hommes infertiles souffrent d'azoospermie, soit environ 1% des hommes dans la population générale (Jarow *et al.*, 1989).

L'infertilité est donc un phénomène relativement répandu et nombreux sont les couples à la recherche d'une assistance médicale à la procréation (AMP). De grandes avancées ont été réalisées dans le traitement de l'infertilité chez la femme et l'homme. Depuis l'introduction des méthodes d'assistance à la procréation dès le début des années 90, les hommes infertiles, incluant les cas les plus sévères peuvent espérer avoir leur propre enfant. Parmi ces méthodes, l'ICSI (intra-cytoplasmic sperm injection), consiste à injecter *in vitro* un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte. Les techniques d'AMP permettent ainsi en partie de palier à certaines difficultés de conception. Mais elles ne permettent pas d'offrir une réponse à tous les couples, en particulier lorsqu'il y a échec de production des gamètes. Malgré les connaissances cumulées dans le domaine de la

		Valeurs de référence	
Volume		1,5-6 ml	
pH		> 7,2	
Numération des spermatozoïdes		≥ 15 M/ml	
Mobilité	Grade (a): rapide et progressive	Mobilité progressive à 1h type (a+b): ≥ 32%	Mobilité progressive à 3h type (a+b+c): ≥ 40%
	Grade (B): lente ou faiblement progressive		
	Grade (c): mobile mais non progressive		
Morphologie normale		≥ 4% (classification Kruger)	≥ 15% (classification de David modifiée par Auger et Eustache)
Vitalité		≥ 58%	
Leucocytes		< 1M/ml	

Tableau 1 : Valeurs de référence des paramètres spermatiques, publiées par l’OMS en 2010.

reproduction, la physiopathologie sous-jacente aux défauts de la spermatogenèse n'est souvent pas élucidée. En effet, 30% des cas d'infertilité masculine sont étiquetés idiopathiques (Coutton *et al.*, 2012). L'infertilité représente donc un enjeu médical et scientifique important.

### 3. Etiologies de l'infertilité masculine

Les causes de l'infertilité masculine sont nombreuses et multifactorielles. La fertilité chez l'homme est influencée par un grand nombre de facteurs impactant la quantité et la qualité des spermatozoïdes. L'infertilité masculine peut avoir une origine post-testiculaire, la spermatogenèse est normale mais il existe un obstacle dans les voies génitales (anomalie excrétoire), ou pré-testiculaire et testiculaire, associée à une perturbation directe du processus de spermatogenèse (anomalie sécrétoire).

Des anomalies anatomiques perturbant la migration des spermatozoïdes dans les voies génitales peuvent être à l'origine de l'infertilité. Dès leur production dans le testicule, les spermatozoïdes transitent dans les voies génitales mâles (tubes séminifères, tube droit, *rete testis*, canaux éférents, épидидyme et canal déférent) avant d'arriver jusqu'au canal éjaculateur puis au niveau de l'urètre. Les principales étiologies de cette obstruction sont l'agénésie congénitale unilatérale ou bilatérale des canaux déférents, ou encore un état infectieux ou inflammatoire pouvant causer l'obstruction bilatérale des épидидymes, des canaux déférents ou de l'urètre. Les cas d'infection du tractus reproducteur masculin représentent une cause fréquente d'infertilité. En effet, les infections peuvent causer des dommages testiculaires par l'apparition d'un état inflammatoire. Les réactions inflammatoires dans le tractus génital masculin ont un impact négatif sur le processus de spermatogenèse (cytokines, stress oxydatif). Ainsi, il existe des cas d'épididymites, mais aussi des infections de l'urètre, de la prostate (prostatite chronique), et d'inflammation de l'un ou des deux testicules (orchite) (Dohle *et al.*, 2003).

Les étiologies liées à une atteinte directe de la spermatogenèse sont associées à des modifications de l'environnement ou à des conditions défavorables au bon déroulement de la spermatogenèse.

Les testicules et les voies excrétrices protègent les spermatozoïdes des cellules immunitaires. Pourtant, certains hommes présentent au sein des testicules des anticorps dirigés contre leur propres spermatozoïdes nuisant ainsi à l'interaction spermatozoïdes-ovocytes ou à la survie des spermatozoïdes. Cette infertilité d'origine immunitaire peut être observée lorsque la barrière hémato-testiculaire (sang-épithélium) des voies génitales est altérée, ou lors d'un traumatisme (Bohring & Krause, 2003). La spermatogenèse chez l'homme et les mammifères, nécessite une température inférieure à celle du corps. La descente testiculaire dans le scrotum réduit la température dans les testicules de 2°C par rapport à la température corporelle. Ainsi, une augmentation de la température des testicules est susceptible d'altérer la spermatogenèse et de conduire à des problèmes de fertilité. Concernant la cryptorchidie, le ou les testicules restent dans l'abdomen et ne descendent pas dans le scrotum. Une dilatation du plexus pampiniforme des veines entourant le testicule (varicocèle) entraîne également une augmentation locale de la température



testiculaire en raison de l'augmentation de la pression intra-testiculaire et d'une hypoxie due à la diminution du flux sanguin (Kantartzi *et al.*, 2007). Le varicocèle représente 20 à 40% des causes d'infertilité masculine (Kupis *et al.*, 2015).

Le testicule est également sensible aux changements hormonaux. Les fonctions testiculaires endocrine et exocrine, sont effectivement contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophysaire de la puberté jusqu'à la fin de la vie. Certains troubles endocriniens peuvent entraîner un dysfonctionnement du mécanisme d'interaction entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les testicules, affectant directement la production des spermatozoïdes. L'hypogonadisme chez l'homme est défini par une altération de la production en testostérone par le testicule et correspond à un trouble endocrinien. L'hypogonadisme est classé en deux catégories. L'hypogonadisme hypergonadotrope, également qualifié d'hypogonadisme primaire, est la forme d'hypogonadisme la plus fréquente chez les hommes adultes (Fraietta *et al.*, 2013). Elle se caractérise par une atteinte testiculaire associée à des niveaux en hormone folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) élevés. A l'inverse, l'hypogonadisme hypogonadotrope se traduit par des taux plasmatiques bas en stéroïdes sexuels associés à des taux bas ou paradoxalement normaux en gonadotrophines. L'hypogonadisme hypogonadotrope peut être congénital ou acquis. La forme congénitale est encore divisée en deux groupes : anosmique (syndrome de Kallmann) et normosmique (hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique) (Fraietta *et al.*, 2013). L'incidence de l'hypogonadisme hypogonadotrope congénital est d'environ 1 à 10 pour 100 000 naissances vivantes et environ un tiers des cas sont idiopathiques (Fraietta *et al.*, 2013).

Outre les causes physiologiques et infectieuses, des facteurs de risque environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens (métaux lourds, pesticides, polluants organiques), ou comportementaux liés au mode de vie (tabac, alcool, drogue, obésité, stress) sont également responsables de l'infertilité masculine (Sharma *et al.*, 2013).

Enfin, plusieurs études ont démontré une fréquence élevée (10-15%) des anomalies chromosomiques chez l'homme infertile (Tahmasbpour *et al.*, 2014). La contribution de facteurs génétiques dans cette pathologie commence à être explorée, notamment grâce au développement de nouvelles techniques d'analyse du génome humain (cf partie V).

## **B. Evaluation de l'infertilité masculine en pratique médicale**

### **1. Examen clinique**

L'infertilité chez l'homme est investiguée sous divers angles. Un interrogatoire concernant l'homme et le couple est systématiquement réalisé afin de prendre connaissance des antécédents familiaux, des facteurs de risque d'infertilité masculine tels que des facteurs urologiques (cryptorchidie, infections, traumatisme, malformation congénitale, torsion du cordon spermatique), chirurgicaux, de l'existence chez le patient d'une maladie de type diabète, mucoviscidose, cancer, maladies endocriniennes, le mode de vie (alcool, tabac, drogues, alimentation), la présence de facteurs iatrogéniques, et enfin les habitudes sexuelles du couple (fréquence des rapports sexuels, dysfonctionnement sexuel).





Cet interrogatoire est complété par des tests tels que le bilan hormonal. Cet examen biologique consiste à doser dans le sang certaines hormones afin d'explorer le système endocrinien qui régule la fonction de reproduction et informe sur la qualité de la fonction gonadique. Le dosage de la FSH est réalisé avec d'autres hormones dont la LH, la testostérone et l'inhibine B. Le dosage de ces hormones renseigne sur le niveau d'atteinte : pré-testiculaire, testiculaire ou post-testiculaire. Les dosages de la FSH et de la LH permettent de déceler une éventuelle insuffisance testiculaire (hypogonadisme). Dans le cas d'une atteinte pré-testiculaire, c'est-à-dire d'une anomalie de la sécrétion des gonadotrophines, les niveaux de LH et de FSH seront faibles et les niveaux de testostérone bas ou normaux. Les taux circulants de testostérone renseignent sur l'imprégnation androgénique, et peuvent témoigner d'un hypogonadisme. De faibles taux en testostérone peuvent être la conséquence soit d'une insuffisance de sécrétion testiculaire, soit d'un défaut de stimulation des testicules par l'hypophyse. Par exemple, une azoospermie non-obstructive (ANO) est caractérisée par une FSH élevée et une inhibine B basse associées à un volume testiculaire diminué. A l'inverse, une azoospermie obstructive (AO) est compatible avec des taux de FSH et d'inhibine B normaux. L'inhibine B, produite par les cellules de Sertoli, constitue un marqueur sensible de la production spermatique.

L'évaluation se poursuit par l'examen physique général du patient qui comprend l'exploration de l'imprégnation androgénique par l'examen des caractères sexuels secondaires (pilosité, gynécomastie), mais aussi l'évaluation des organes génitaux afin de déceler une anomalie urogénitale. Pour cela, le pénis est examiné afin d'identifier une éventuelle localisation anormale du méat urétral (hypospade), et les testicules sont mesurés et palpés pour exclure un cancer du testicule, une cryptorchidie, une varicocèle, une atrophie ou une hypotrophie post-orchide. Les voies génitales sont également examinées, en particulier la présence et la consistance des épидидymes et canaux déférents par palpation bilatérale, et par la réalisation d'une échographie des voies génitales masculines.

L'examen de référence du bilan d'infertilité masculine reste le spermogramme. L'analyse du sperme est réalisée de façon systématique pour aider à déterminer la cause des difficultés à concevoir du couple. Réalisé après une période d'abstinence de 2 à 5 jours, il constitue l'examen essentiel permettant l'étude et la mesure précises des différents paramètres tels que les caractères physiques du sperme (volume, aspect, viscosité, pH et liquéfaction) mais aussi, le nombre, la motilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes. Différents constituants du liquide séminal (zinc, fructose, carnitine et anticorps anti-spermatozoïde) peuvent aussi être dosés. La mesure de ces paramètres est interprétée en fonction des valeurs de référence fixées par l'OMS (Tableau 1) et orientent la prise en charge du couple : soit vers une technique d'AMP, soit vers un don de sperme ou l'adoption. Lorsque cet examen révèle une anomalie, l'examen du spermogramme est répété une deuxième fois, à un intervalle de 3 mois, afin de confirmer le diagnostic. Le spermocytogramme représente aussi un élément essentiel de l'analyse du sperme en première intention. Il évalue la forme des spermatozoïdes (tête et flagelle) et permet ainsi de connaître le pourcentage de forme typique (normale) dans un sperme donné.

Paramètres		Définition de l'anomalie		
Volume		[Volume] < 1,5 ml	Hypospermie	
		[Volume] > 6 ml	Hyperspermie	
Nombre		[Spermatozoïdes] > 200 M/ml	Polyspermie	
		[Spermatozoïdes] < 15M/ml	Oligozoospermie modérée	
		[Spermatozoïdes] < 5M/ml	Oligozoospermie sévère	
		[Spermatozoïdes] < 0,1 M/ml	Cryptozoospermie	
Mobilité		Absence de spermatozoïde	Azoospermie	
		Grade (a): rapide et progressive	Mobilité progressive à 1h type (a+b): < 32%	Asthénozoospermie
Grade (c): mobile mais non progressive	Mobilité progressive à 3h type (a+b+c) des spermatozoïdes : < 40%			
Morphologie		[Spermatozoïdes normaux] < 4% (classification Kruger)	Tératozoospermie	
		[Spermatozoïdes normaux] < 15% (classification de David modifiée par Auger et Eustache)		
Vitalité		[Vitalité des spermatozoïdes] < 58%	Nécrozoospermie	
Leucocytes		[Leucocytes] > 1M/mL	Leucospermie	
Anomalie multiple		Oligozoospermie + Asthénozoospermie + Tératozoospermie	Oligoasthénotératozoospermie	

Tableau 2 : Variation des paramètres spermatiques et anomalies (OMS, 2010).

## 2. Principales étiologies masculines mises en évidence par l'analyse du spermogramme

Les infertilités masculines sont classées selon différentes catégories sur la base des normes du spermogramme fixées par l'OMS (Tableau 2).

Un spermogramme normal correspond à un nombre de spermatozoïdes supérieur à 15 millions par millilitre, un taux de morphologies normales supérieur à 50% ainsi qu'une motilité progressive de 40%. Dès lors qu'une diminution significative du nombre des spermatozoïdes est constatée on parle d'oligozoospermie (<15M/ml). Un défaut d'émission du sperme peut également être mis en évidence par l'absence d'éjaculation ou par une éjaculation rétrograde, c'est l'aspermie. En cas de mobilité ( $a+b < 32\%$ ;  $a+b+c > 40\%$ ) ou de vitalité (<58%) diminuées, on parle respectivement d'asthénozoospermie et de nécrospermie. La tératozoospermie se caractérise par des formes anormales supérieures à 50%. Le spermogramme peut également montrer des anomalies significatives de la morphologie et de la motilité du sperme, deux pathologies regroupées sous le terme d'oligoasthénotératozoospermie.

Parmi toutes les pathologies énumérées, l'azoospermie constitue la forme la plus extrême se traduisant par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat (Hamada *et al.*, 2013). Elle est constatée dans 10 à 15% des cas (Hamada *et al.*, 2013). Dans 60% des cas, l'azoospermie résulte d'un défaut de fabrication des spermatozoïdes par le testicule, c'est-à-dire la conséquence d'une altération directe de la spermatogenèse : on parle alors d'azoospermie non-obstructive (ANO). L'azoospermie peut être également due à une obstruction des voies génitales (épididyme, canal déférent, canal éjaculateur) ou des glandes excrétrices (vésicules séminales, prostate) : c'est l'azoospermie obstructive qui représente 40% des cas.

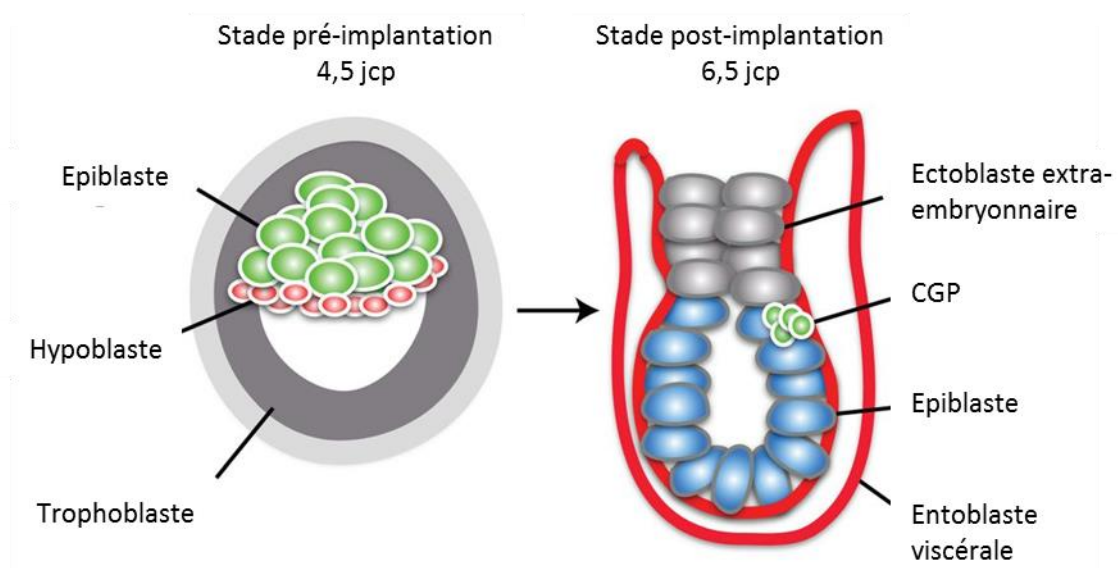
## 3. Bilan génétique

Les tests génétiques permettent de classer correctement les cas d'infertilité considérés comme idiopathiques. Des analyses génétiques sont proposées en seconde intention dans le cadre du bilan d'infertilité si une ou plusieurs des indication(s) suivante(s) est (sont) rencontrée(s) :

- oligozoospermie sévère ou azoospermie;
- testicules de petite taille, absence du canal déférent;
- fausses couches à répétition.

L'analyse du caryotype ainsi que la recherche des microdélétions du chromosome Y au niveau des régions AZF sont alors prescrites (cf chapitre 1, partie V). Un conseil génétique est recommandé si une anomalie génétique a été identifiée.

L'avènement de la micromanipulation *in vitro* des gamètes (insémination intra-utérine, fécondation *in vitro* et injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde) permet de palier certaines difficultés à concevoir. Dans certains cas d'azoospermie et d'oligozoospermie sévère, une biopsie testiculaire peut être proposée dans l'espoir de retrouver quelques spermatozoïdes ou autres



**Figure 3 :** Origine des cellules germinales primordiales au cours du développement embryonnaire chez la souris (adapté de Gunesdogan *et al.*, 2014).

cellules germinales. Dans la majorité des cas, aucun recueil de cellules germinales matures n'est possible, rendant l'ICSI non réalisable. Ainsi, l'azoospermie de type sécrétoire représente un réel facteur d'infertilité.

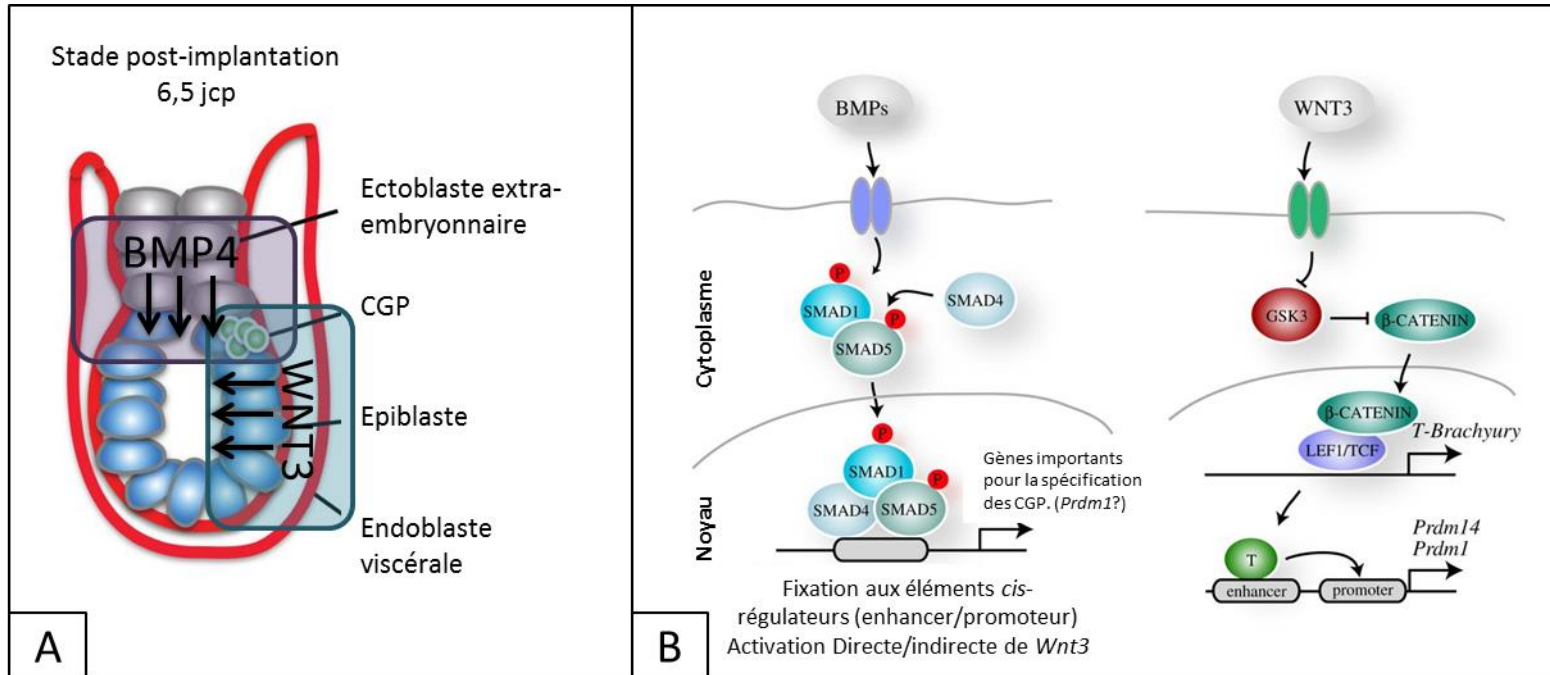
## **II. Cellules germinales primordiales et développement gonadique chez les mammifères**

### **A. Origine et migration des cellules germinales primordiales**

Chez les mammifères, les précurseurs des cellules de la lignée germinale sont les cellules germinales primordiales (CGP). Ces cellules correspondent initialement à des cellules souches indifférenciées qui se différencieront pour donner les gamètes. Les CGP constituent ainsi l'origine commune des spermatozoïdes et des ovocytes (Irie *et al.*, 2014). Elles apparaissent en dehors des futures gonades. La différenciation et le développement des CGP est un événement très précoce du développement embryonnaire et est essentiel pour assurer une fertilité et la transmission de l'information génétique à la descendance. Leur migration vers les ébauches gonadiques est un processus complexe, régulé spatialement et temporellement par des déterminants moléculaires définis. Chez la souris comme chez l'homme, la spécification des cellules germinales est contrôlée par des processus épigénétiques dépendant de signaux extérieurs produits par l'environnement cellulaire au cours de leur migration vers les futures gonades (Irie *et al.*, 2014).

#### **1. Origine foétale des cellules germinales primordiales**

Les CGP chez l'humain ont été peu étudiées en raison des obstacles éthiques liés à l'utilisation des embryons. Chez la souris, à la fin de l'implantation, à 4,5 jours post-coïtum (jpc), l'embryon est didermique c'est-à-dire constitué de deux feuillets embryonnaires, l'épiblaste ou ectoblaste primitif et l'hypoblaste ou entoblaste primitif (Figure 3) (De Felici, 2013, Irie *et al.*, 2014, Gunesdogan *et al.*, 2014). Au cours de la gastrulation, l'épiblaste génère l'embryon et une partie des annexes embryonnaires. L'hypoblaste, qui fait face au blastocèle, ne participe pas au développement de l'embryon proprement dit. Il correspond à une structure transitoire qui contribue au développement du mésoblaste extra-embryonnaire, au sac vitellin et au chorion (Gilbert, 2000). Les précurseurs communs des CGP et de la future allantoïde se manifestent initialement dans l'épiblaste à côté de l'ectoblaste extra-embryonnaire. Au cours de la gastrulation (6,5 jpc), processus au cours duquel se met en place le troisième feuillet embryonnaire (mésoblaste) à partir de l'ectoblaste, ces précurseurs sont exclus de l'épiblaste postérieur et migrent dans le mésoblaste extra-embryonnaire (De Felici, 2013, Irie *et al.*, 2014). Cette migration s'effectue grâce aux signaux d'induction provenant des tissus extra-embryonnaires ce qui restreint alors leur potentiel de différenciation vers la lignée germinale. Durant cette migration, une partie de ces précurseurs se différencient et donnent l'allantoïde, et une autre partie donne naissance aux CGP dans une région alors extra-embryonnaire entre l'allantoïde et la vésicule ombilicale (De Felici, 2013). Les CGP en formation à la base de l'allantoïde sont initialement indiscernables des cellules embryonnaires voisines. Durant cette phase extra-embryonnaire, les cellules reçoivent un signal d'induction provenant des tissus extra-embryonnaires



**Figure 4** : Voies de signalisation médiées par BMP et WNT et apparition des cellules germinales primordiales. **(A)** BMP4 exprimé par l'ectoblaste extra-embryonnaire (en conjugaison avec BMP8b et BMP2) et WNT3 exprimé par l'épiblaste sont nécessaires pour induire la génération des CGP au cours du développement embryonnaire chez la souris. **(B)** Signalisation médiée par BMP et WNT et initiation d'un programme cellulaire unique axé sur la coopération des facteurs de transcriptions PRDM1 et PRDM14 (adapté de Gunesdogan *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, les déterminants moléculaires et leur niche cellulaire respective, impliqués dans la spécification de la lignée germinale ont été décrits principalement dans la souris. Certains d'entre eux, sont à présent reconnus comme étant les facteurs clés de la spécification germinale. Parmi les voies de signalisation contrôlant la spécification des CGP, des membres de la grande famille du TGF $\beta$  (transforming growth factor) et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP : bone morphogenetic protein), jouent un rôle crucial (De Felici, 2013) (Figure 4). Chez la souris, les signaux provenant de l'ectoblaste extra-embryonnaire proximal (BMP4 et BMP8b) et de l'entoblaste viscéral (BMP2) sont essentiels à l'induction des CGP (De Felici, 2013).

L'expression des protéines BMP et la fixation à leurs récepteurs déclenchent leur activation et une cascade de signalisation intracellulaire, faisant intervenir les protéines de la famille Smad (Smad1, 4 et 5) (Figure 4). Une fois les protéines Smad1/5 phosphorylées, le complexe Smad1/4/5 agit comme un facteur de transcription pour activer les gènes clés du déterminisme germinale tel que *Blimp1* (B-Lymphocyte induced maturation protein-1), aussi connu sous le nom de *Prdm1* (PR domain-containing 1), et *Prdm14* (Figure 4). Ainsi, la signalisation BMP/Smad est essentielle à l'orientation des cellules souches vers une identité CGP (Ying & Zhao, 2001). En effet, l'inactivation de ces gènes chez la souris est associée à une altération du développement des CGP (absence de spécification, réduction significative du nombre des CGP) (Lawson *et al.*, 1999, Chang & Matzuk, 2001, Hayashi *et al.*, 2002). La signalisation médiée par WNT/ $\beta$ -catenin est également essentielle pour la différenciation des CGP (Ohinata *et al.*, 2009). WNT3 est en effet indispensable pour fournir aux cellules de l'épiblaste leur capacité à répondre à BMP4 (Ohinata *et al.*, 2009). Ainsi, c'est durant cette phase extra-embryonnaire que les cellules issues de l'épiblaste adoptent leur destin de CGP.

Malgré le peu d'investigations réalisées chez l'homme, il est évident que des voies de signalisation communes existent chez les mammifères et éventuellement chez l'ensemble des vertébrés (Donovan & de Miguel, 2003). Chez la souris, les répresseurs transcriptionnels BLIMP1 et PRDM14 interagissent avec de nombreux régulateurs épigénétiques distincts favorisant ainsi l'expression de gènes spécifiques des CGP, la répression des gènes de la lignée somatique, et le maintien de la pluripotence (Saitou *et al.*, 2012). BLIMP1 et PRDM14 sont respectivement exprimés dès 6,25 jpc et 6,5 jpc dans l'épiblaste proximal (Saitou *et al.*, 2012). Les cellules exprimant le gène *Blimp1*, prolifèrent et commencent à exprimer d'autres marqueurs des CGP tels que *Fragilis* (interferon-inducible gene) et *Stella* qui contribuent alors à la répression des membres de la famille des gènes *Hox* (*Hoxb1* et *Hoxa2*), fortement exprimés dans le tissu somatique mésodermique voisin et impliqués dans l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur (Saitou *et al.*, 2002). Ohinata et son équipe ont observé chez des embryons de souris déficientes pour le gène *Blimp1*, une absence de migration des CGP ainsi qu'une absence de répression des gènes *Hox* (Ohinata *et al.*, 2005). *Blimp1* contribue également à ré-activer un état de pluripotence (Saitou *et al.*, 2002). En plus des gènes spécifiques des cellules germinales, les CGP expriment également les gènes associés à la pluripotence, essentiels à la spécification, la prolifération, et la survie des CGP tels que *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* (Kehler *et al.*, 2004, Chambers *et al.*, 2007, Campolo *et al.*, 2013). *Prdm14*, est exprimé exclusivement dans la lignée germinale et dans les cellules pluripotentes (Yamaji *et al.*, 2008). Chez



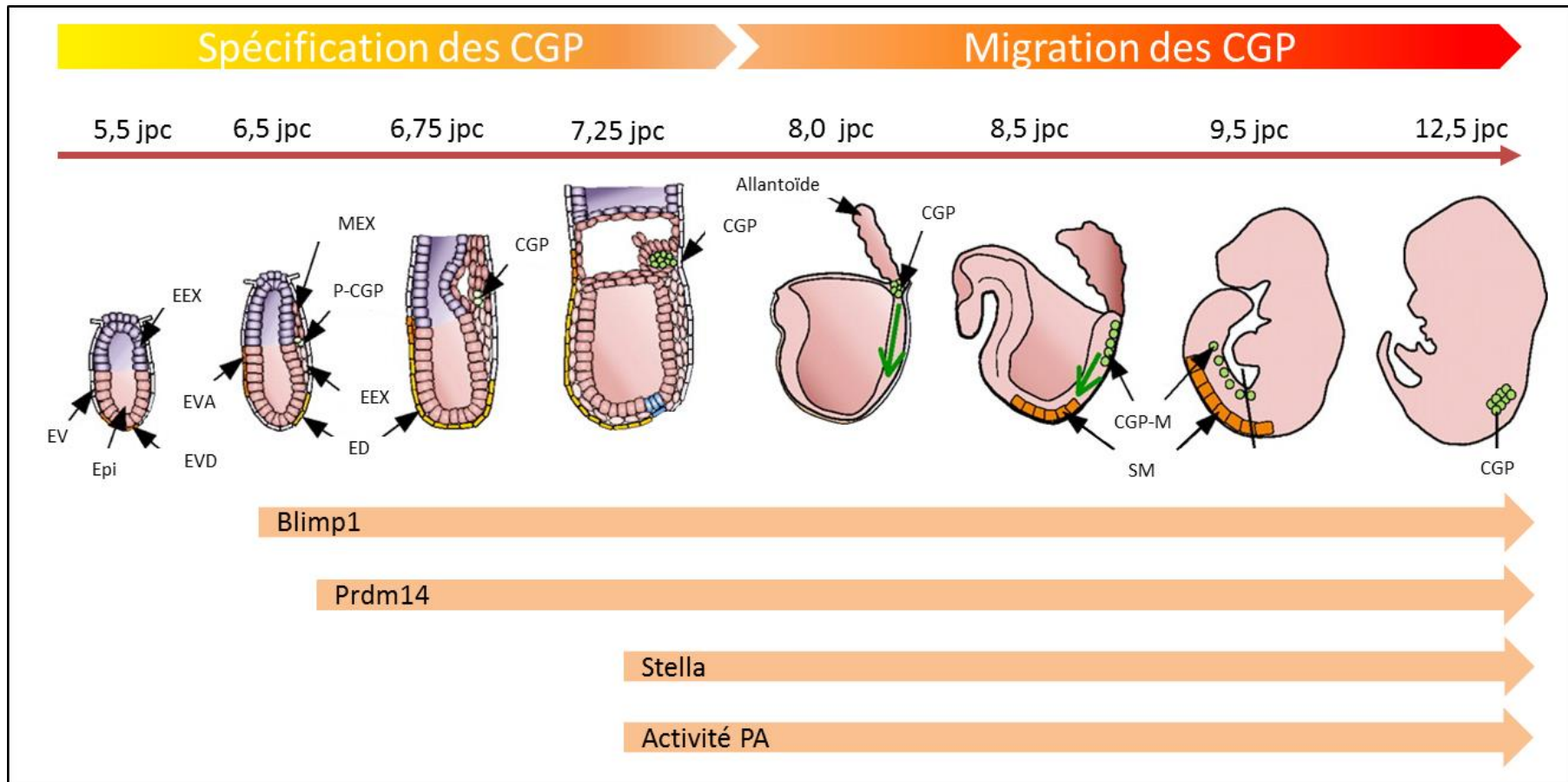


Figure 5 : Représentation schématique de la spécification des cellules germinales primordiales au cours du développement embryonnaire chez la souris. Expression dans le temps de *Blimp1*, *Prdm14*, *Stella* et apparition de l'activité de la phosphatase alcaline. CGP : cellules germinales primordiales; CGP-M : cellules germinales primordiales migratoires; ED : entoblaste distal; EEX : Ectoblaste extra-embryonnaire; MEX : mésoblaste extra-embryonnaire; Epi : épiblaste; EV : entoblaste viscéral; EVA : entoblaste viscéral antérieur; EVD : entoblaste viscéral distal; EEX : ectoblaste extra-embryonnaire; PA : phosphatase alcaline; P-CGP : précurseur des cellules germinales primordiales; SM : somites (adapté de Saitou *et al.*, 2012).

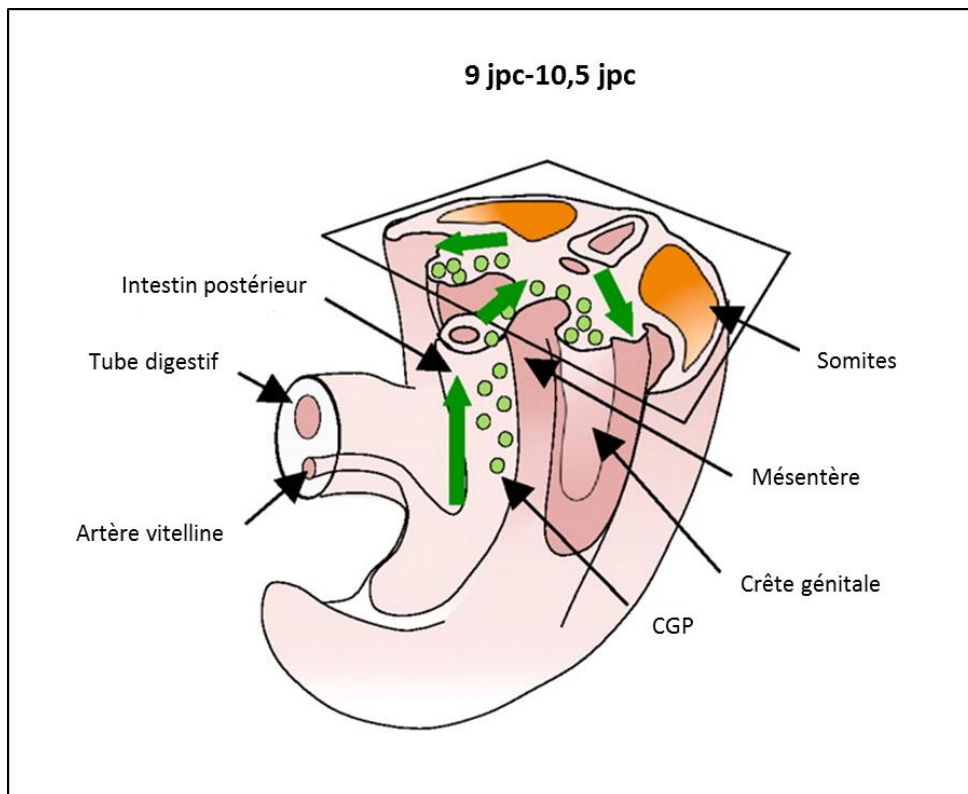
des embryons de souris invalidés pour le gène *Prdm14*, la proportion des précurseurs des CGP est diminuée, ces cellules ne parviennent pas à regagner leur potentiel de pluripotence et subissent une reprogrammation épigénétique anormale associée à un défaut de ré-acquisition de l'expression du gène clé de la pluripotence, *Sox2*, et une absence d'augmentation de l'expression du marqueur des CGP, *Stella* (Yamaji *et al.*, 2008). *Prdm14* agit indépendamment de *Blimp1*, pour assurer la réactivation de la pluripotence et une reprogrammation épigénétique nécessaire à la spécification des CGP (Yamaji *et al.*, 2008). *Blimp1* et *Prdm14* sont les deux principaux facteurs de transcription orchestrant la mise en place des CGP chez les mammifères (Yamaji *et al.*, 2008) (Figure 5).

Ainsi, chez la souris, les CGP apparaissent en réponse aux signalisations médiées par BMP et WNT émanant de l'ectoblaste extra-embryonnaire et de l'entoblaste viscéral. Elles sont alors identifiables par l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques tels les gènes *Blimp1*, *Prdm14*, *Tnap* (tissue non-specific alkaline phosphatase) codant la phosphatase alcaline, *Fragilis*, *Stella* ou encore *Tfap2c/AP2-γ* (Transcription factor AP-2 gamma) et *Lin28* (Lin-28 Homolog). L'expression des gènes *LIN28* (Childs *et al.*, 2012), *BLIMP1* (Eckert *et al.*, 2008) et *TFAP2C* également appelé AP2γ (Pauls *et al.*, 2005) a été rapportée dans des embryons humains de 6 à 10 semaines du développement embryonnaire. Néanmoins, des différences existent. Chez l'homme par exemple, SOX17 plutôt que BLIMP1 semble être le principal régulateur de la spécification germinale (Irie *et al.*, 2015). Par conséquent, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la spécification des CGP chez l'homme restent encore à éclaircir.

## 2. Migration et survie des cellules germinales primordiales

Les voies de signalisation qui contrôlent la spécification et la migration des CGP chez l'homme ne sont pas clairement définies. Chez l'homme et la souris, les CGP ont été décrites pour migrer depuis le tube digestif par le mésentère dorsal de l'intestin postérieur durant les 4<sup>ème</sup>-5<sup>ème</sup> semaines post-coïtum (spc) chez l'homme et dès 8 jpc chez la souris. Dès lors, elles envahissent les crêtes génitales en développement le long de la partie ventrale des mésonéphros autour de la 6<sup>ème</sup> semaine du développement chez l'homme et à 10 jpc chez la souris.

Les CGP vont alors migrer depuis le tube digestif par le mésentère dorsal de l'intestin postérieur afin de venir coloniser, à la 6<sup>ème</sup> semaine du développement chez l'homme et à 10 jpc chez la souris, leur emplacement définitif, les crêtes génitales (Ge *et al.*, 2015, Tachdjian *et al.*, 2016) (Figure 6). Cette migration s'effectue grâce au développement de l'embryon et aux mouvements amiboïdes au niveau de la paroi du tube digestif. Les CGP évoluent ensuite pendant leur migration sous l'influence de signaux chimio-attractifs. Chaque étape fait appel à une fenêtre de réceptivité et à une niche cellulaire particulière, marquées par l'influence d'inducteurs spécifiques et par l'expression ou l'inhibition de déterminants moléculaires clés (Tosca *et al.*, 2011, Mouka *et al.*, 2016). Ces éléments sont déterminants pour le contrôle de la migration extra-embryonnaire puis intra-embryonnaire, la prolifération et la survie des CGP.



**Figure 6** : Migration des cellules germinales primordiales chez la souris. Les CGP migrent dans l'embryon le long de la paroi de la vésicule vitelline jusqu'au canal vitellin et le long de la paroi de l'intestin postérieur (adapté de Saitou *et al.*, 2012).

## 2.1. Signaux contrôlant la migration des cellules germinales primordiales

Plusieurs facteurs de croissance et des interactions adhésives sont nécessaires pour contrôler la migration, la prolifération et la survie des CGP lors de leur migration intra-embryonnaire pour coloniser les crêtes génitales : KITL (kit ligand ou stem cell factor, SCF), LIF (leukemia inhibitory factor), CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4)/CXCL12 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4/ligand 12) et bFGF (fibroblast growth factor) (Molyneaux *et al.*, 2004).

KITL et LIF ont tous deux montré leur effet sur l'augmentation de la survie des CGP en culture (Pesce *et al.*, 1993). Il a également été suggéré que KITL est capable d'orienter les CGP lors de leur migration. La famille de ligands FGF est connue pour contrôler de nombreux aspects du développement, y compris la croissance, la différenciation et la migration (Powers *et al.*, 2000). La signalisation médiée par FGF est importante dans le comportement des cellules germinales pendant la migration. FGF2 a été rapporté pour agir comme mitogène sur les CGP *in vitro* et se lier aux CGP en culture, suggérant la présence de récepteurs de FGF à la surface des CGP (Matsui *et al.*, 1992, Resnick *et al.*, 1998). Cette signalisation n'a pas d'impact sur la migration proprement dite des CGP mais elle est nécessaire pour maintenir une motilité ainsi qu'un nombre de cellules germinales normales pendant la migration (Takeuchi *et al.*, 2005).

Le récepteur et marqueur de surface cellulaire CXCR4 et son ligand CXCL12 sont requis pour la colonisation des crêtes génitales par les CGP et pour leur survie. Ils représentent un signal chimio-attractant clé de la migration des CGP (Lewellis & Knaut, 2012, Doitsidou *et al.*, 2002, Molyneaux *et al.*, 2003). L'expression du gène *Cxcr4* s'effectue au sein de la membrane des CGP en migration. Les CGP sont alors recrutées à leur position finale par le ligand CXCL12. Le domaine d'expression de *Cxcl12* se situe au plus proche des CGP migratoires au fil de leur progression, puis plus tard dans les crêtes génitales afin de guider les CGP vers le site des futures gonades. L'absence d'expression de CXCL12 ou de son récepteur CXCR4 entraîne des défauts irréversibles de migration des CGP (Doitsidou *et al.*, 2002).

La survie et la localisation des CGP seraient également sous le contrôle de BMP4 produit par le mésoblaste extra-embryonnaire (Fujiwara *et al.*, 2001). En effet, les CGP en migration expriment les récepteurs des protéines BMP (Molyneaux *et al.*, 2004, Dudley *et al.*, 2007). Par ailleurs, les cellules somatiques des crêtes génitales expriment les protéines SMAD révélant la présence d'une signalisation BMP active dans les crêtes génitales. Le traitement par un antagoniste de BMP4 sur des embryons de souris de 9.5 jpc a conduit à une incapacité des CGP à coloniser les crêtes urogénitales, l'absence des protéines Smads et enfin le blocage de l'expression du gène *Kitl*. Ainsi, les protéines BMP réguleraient le nombre et la localisation des CGP migratoires en contrôlant l'expression de gènes tout au long de leur déplacement et au sein des crêtes génitales (Dudley *et al.*, 2007).

D'autres signaux sont impliqués dans la régulation de la migration de la colonisation des CGP. Cette migration fait en effet intervenir des interactions avec la matrice extra-cellulaire (fibronectine et

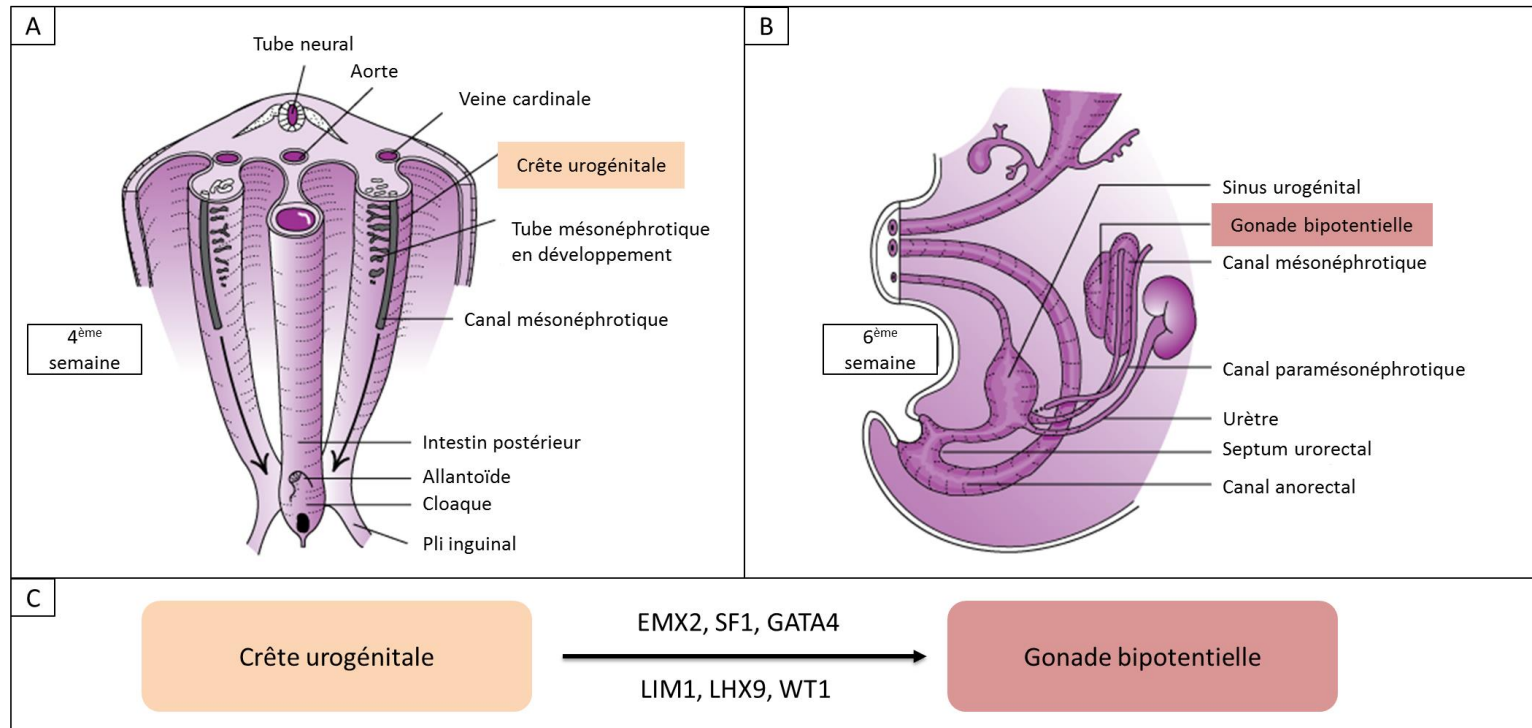


intégrine  $\beta 1$ ). La matrice extra-cellulaire semble jouer un rôle crucial dans la migration des cellules germinales primordiales. Il a été démontré, chez la souris, que les CGP adhèrent aux éléments de la matrice extra-cellulaire (glycoprotéines, fibronectine, laminine et collagène IV). Parmi ces éléments on retrouve la fibronectine nécessaire au déplacement des CGP, ainsi que l'intégrine  $\beta 1$  (Alvarez-Buylla & Merchant-Larios, 1986, Anderson *et al.*, 1999). Les cellules germinales qui n'ont pas le récepteur à l'intégrine  $\beta 1$  sont incapables de migrer vers les gonades (Anderson *et al.*, 1999).

## 2.2. Marqueurs des CGP migratoires

Ces cellules vont, au cours de leur migration, activer un programme germinale et inhiber le programme somatique tout en maintenant leur pluripotence (Tosca *et al.*, 2011, Mouka *et al.*, 2016). Durant toute leur migration, les CGP vont être guidées tel un système de rails jusqu'aux gonades indifférenciées (chimiotactisme et interaction avec la matrice extra-cellulaire). Les CGP précoces chez l'homme sont identifiées par l'expression de marqueurs spécifiques communs avec les cellules souches embryonnaires, parmi lesquels *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *TNAP*, *PRDM14*, *LIN28*, *BLIMP1*, *STELLA*, *FRAGILIS* et *PIWIL2*. Ceci souligne la possibilité que les cellules souches embryonnaires puissent provenir de la lignée germinale, mais aussi des marqueurs spécifiques germinaux tels que, *CXCR4*, *SOX17*, *STRA8*, *GDF3* et *c-KIT* (Geijsen *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2011, Mouka *et al.*, 2016).

Une fois les crêtes génitales colonisées, les CGP se différencient finalement en gonocytes qui se différencieront à leur tour en gamètes à travers les processus de méiose et de différenciation cellulaire (Mouka *et al.*, 2016, Tachdjian *et al.*, 2016). Chez l'homme, les CGP tardives et les gonocytes (stade post-migration) exprimeront alors des marqueurs plus spécifiques tels que *VASA* et *DAZL* (Mouka *et al.*, 2016).



**Figure 7** : Formation et maintien de la gonade bipotentielle. **(A)** crête génitale d'un embryon humain de 4 semaines de grossesse. **(B)** Evolution des crêtes génitales en gonade bipotentielle à 6 semaines de grossesse (adapté de DeCherney *et al.*, 2012).

## B. De l'ébauche gonadique au testicule

### 1. Mise en place et contrôle génétique des structures sexuelles indifférenciées

En début de vie embryonnaire, les gonades apparaissent comme une ébauche indifférenciée ou crête génitale identique chez l'embryon XX comme XY (Gilbert, 2000). Jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine de vie embryonnaire chez l'homme, les crêtes génitales sont bipotentielles, c'est à dire capables de s'engager dans les deux voies de différenciation : ovaire ou testicule (Tachdjian *et al.*, 2016). Le sexe génétique déterminera ensuite le destin testiculaire ou ovarien des crêtes génitales.

Les crêtes urogénitales sont les précurseurs communs des systèmes urinaires et génitaux et du cortex surrénal. Chez l'humain, elles se développent au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine post-fécondation à la surface ventrale du mésonéphros crânial, par les processus de prolifération et de colonisation cellulaires (Rey *et al.*, 2000, DeCherney, 2012) (Figure 7A). Le mésonéphros, structure transitoire, est un rein primitif fonctionnel drainé par les canaux mésonéphrotiques ou canaux de Wolff (CW) qui s'abouchent au niveau du sinus urogénital (Tachdjian *et al.*, 2016). Le développement génital est en rapport étroit avec celui du système urinaire (DeCherney, 2012) (Figure 7A et B). La différenciation gonadique est marquée par trois principales étapes : la prolifération cellulaire à partir de l'épithélium coelomique, la migration de ces cellules au sein des gonades bipotentielles et la colonisation par les CGP (Piprek *et al.*, 2016).

Le développement des gonades indifférenciées, initialement formées exclusivement de cellules somatiques, est marqué par l'arrivée des CGP qui envahissent la région présumée des futures gonades (Rey *et al.*, 2000). Ce phénomène de colonisation induit une prolifération importante des cellules du mésonéphros et de l'épithélium coelomique. Cette prolifération cellulaire s'effectue au sein de l'épithélium coelomique du mésonéphros, initialement unistratifié, et va contribuer progressivement à l'apparition de la gonade indifférenciée sous le mésonéphros (Figure 7B). Ces cellules vont alors migrer et envahir le mésenchyme sous-jacent en envoyant des travées qui constitueront les cordons sexuels primitifs qui entourent les CGP (Rey *et al.*, 2000) (Figure 6). Les cellules de ces cordons sexuels se différencieront ultérieurement en cellules de Sertoli chez le mâle, et en cellules folliculaires chez la femelle.

À 6 SG, les gonades sont à l'état indifférencié et sont composées des cellules germinales, d'un tissu particulier présentant un potentiel de différenciation en cellules de la granulosa ou en cellules de Sertoli, d'un mésenchyme qui donnera les cellules de la thèque ou les cellules de Leydig et enfin des CW et des canaux de Müller (CM) coexistant côte à côte. Les gènes impliqués dans le déterminisme sexuel orienteront par la suite la différenciation des différents types cellulaires vers la voie masculine ou féminine.

### 2. Contrôle génétique de la formation des crêtes génitales

Chez les mammifères, plusieurs gènes incluant *Wt1* (Wilms' tumor suppressor 1), *Sf1* (steroidogenic factor 1), *Emx2* (empty-spiracles homeobox gene 2), *Lhx9* (Lim homeobox gene 9), *Gata4* (Gata-binding protein 4), et *Lim1* (LIM homeobox 1) ont été montré impliqués dans le





développement et le maintien de la gonade indifférenciée (Rey *et al.*, 2000) (Figure 7C). Chez l'homme, ces mêmes gènes sont exprimés vers la 5<sup>ème</sup> SG et contribuent au développement du bourgeon génital en crêtes génitales. Entre l'homme et la souris, des mutations de ces gènes provoquent des phénotypes différents.

Le gène *Sf1* code pour un récepteur nucléaire orphelin qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ainsi que le développement gonadique (Majdic *et al.*, 2002). C'est l'un des facteurs les plus précoces et les plus essentiels agissant sur le développement primitif du tractus reproducteur humain (et chez la souris). La nécessité de la fonction de *SF1* pour le développement surrénalien et gonadique a été démontrée chez l'homme et la souris (Schimmer & White, 2010). Des souris déficientes pour *SF1* (*SF1*<sup>-/-</sup>) présentent une agénésie surrénalienne, une dysgénésie testiculaire complète, des structures müllériennes persistantes chez des animaux XY et un hypogonadisme hypogonadotrope partiel (Majdic *et al.*, 2002). Des mutations du gène *SF1* chez l'humain ne correspondent pas totalement au phénotype sévère observé chez les souris invalidées pour ce gène (Rey *et al.*, 2000). Les patients présentent une agénésie gonadique sévère ou partielle, une anorchidie, ou encore une virilisation normale associée à une infertilité (Rey *et al.*, 2000). Le gène suppresseur de tumeur *WT1* joue un rôle central dans le développement précoce de la gonade primitive et de ses canaux internes bipotentiels avant la détermination du sexe. Des mutations/délétions du gène *Wt1* chez les souris transgéniques ont été associées à une létalité, un échec de développement gonadique et rénal (Kreidberg *et al.*, 1993). Chez l'homme, des mutations du gène *Wt1* sont liées à une dysgénésie gonadique et au développement de tumeurs de Wilms (Pelletier *et al.*, 1991). *Lhx9* est un gène essentiel pour la prolifération des cellules somatiques des crêtes génitales. En interagissant avec *Wt1*, le produit de ce gène régule l'expression du gène *Sf1* (Birk *et al.*, 2000). Les souris *Lhx9*<sup>-/-</sup> présentent des caractéristiques comparables à celles des souris *Sf1*<sup>-/-</sup> et *Wt1*<sup>-/-</sup> marquées notamment par une infertilité (Birk *et al.*, 2000). Les souris chez lesquelles le gène *Emx2* a été inactivé, ne parviennent pas à développer de gonades ni de tractus urogénital (Miyamoto *et al.*, 1997). *Lim1* semble également jouer un rôle dans la formation ou la différenciation très précoce de l'épithélium des CM et des CW. Les souris n'exprimant pas ce gène n'ont pas de CW ni de CM (Kobayashi & Behringer, 2003). Enfin, *Gata4* est un facteur de transcription exprimé par les cellules de soutien des gonades indifférenciées et est requis pour la formation des crêtes gonadiques dans les fœtus XX et XY de souris (Hu *et al.*, 2013). L'expression de *Lhx9* et de *Sf1* dans l'épithélium cœlomique est en partie régulée par *Gata4*. Ainsi, *Gata4* agit en amont de *Lhx9* et de *Sf1* pour soutenir l'initiation du développement des crêtes génitales (Hu *et al.*, 2013).

### C. Etapes du déterminisme sexuel : du sexe génétique au sexe gonadique

Le processus de détermination du sexe chez les mammifères comprend trois grandes étapes. Le déterminisme du sexe génétique débute par la fécondation, fusion entre un gamète mâle et un gamète femelle, soit la mise en commun du matériel génétique de ces deux gamètes pour former un zygote féminin XX ou masculin XY : c'est l'établissement du sexe génétique. Le sexe



génétique s'établit ainsi en fonction du chromosome sexuel apporté par le spermatozoïde lors de la fécondation.

### 1. Le rôle déterminant du chromosome Y et du gène *SRY*

La différenciation sexuelle est réalisée sous le contrôle de divers gènes. L'engagement vers la voie de différenciation gonadique est en adéquation avec le sexe chromosomique. Au cours de l'évolution chez l'homme, le chromosome Y, s'est progressivement spécialisé dans les fonctions de déterminisme du sexe et de reproduction (Ravel & Siffroi, 2009). Un gène présent sur le chromosome Y, *SRY*, est considéré comme étant le facteur testiculaire déterminant (Taketo, 2015). Des études menées chez la souris montrent que le chromosome Y est au centre de la détermination du testicule. Ces études ont montré que les souris monosomiques X, dépourvues de chromosome Y, s'orienteraient vers la voie femelle, tandis que les souris XXY s'orientaient vers la voie mâle (Russell & Chu, 1961, Welshons & Russell, 1959). Les chercheurs ont alors émis l'hypothèse de l'existence d'un gène unique impliqué dans la détermination testiculaire, présent sur le chromosome Y, alors appelé *TDY* pour testis-determining-Y chez la souris et *TDF* pour testicular determination factor chez l'homme (Eicher & Washburn, 1986). Chez l'humain, les sujets 45,X ont un phénotype féminin et les sujets 47,XXY ont un phénotype masculin (Ford *et al.*, 1959, Jacobs *et al.*, 1959).

Des analyses génétiques se sont alors concentrées sur l'identification du locus sur le chromosome Y conduisant à la formation des testicules. De nombreuses études ont démontré qu'il répondait aux caractéristiques attendues du « TDF » et son identification a été possible par l'observation de syndromes dits de « réversion sexuelle ». Au début des années 1990, les équipes de Robin Howard Lovell-Badge et de Peter Goodfellow ont d'identifié le gène *SRY/Sry* (Homme/souris) pour « Sex-determining Region of Y chromosome », situé sur le bras court du chromosome Y, comme déterminant du déterminisme gonadique mâle (Koopman *et al.*, 1990, Gubbay *et al.*, 1990, Sinclair *et al.*, 1990, Berta *et al.*, 1990). Le gène *Sry/SRY* code pour un facteur de transcription possédant un domaine de liaison à l'ADN conservé, le domaine HMG (high-mobility group), caractéristique des facteurs de transcription de la famille SOX (Sekido & Lovell-Badge, 2008). Des expériences de transgénèse chez des embryons de souris XX, par insertion d'un petit fragment d'ADN de 14 kb comprenant le gène *Sry*, ont conduit au développement de souriceaux phénotypiquement mâles confirmant l'hypothèse selon laquelle le gène *Sry* seul initie le développement des testicules chez l'embryon (Koopman *et al.*, 1991). Les chercheurs ont également constaté que le gène *Sry* était fortement conservé dans plusieurs espèces de mammifères. Peter Goodfellow et son équipe ont observé des individus 46,XY à phénotype féminin en raison d'une anomalie du fonctionnement du gène *SRY* par mutation *de novo* (Berta *et al.*, 1990). La cinétique d'expression de ce gène, entre 10,5 à 12 jpc chez la souris et à 7<sup>ème</sup> semaine de grossesse chez l'homme, coïncide avec la période de détermination du sexe (Knower *et al.*, 2007, Sekido & Lovell-Badge, 2008).

Des expériences menées chez des souris transgéniques exprimant EGFP sous le contrôle du promoteur du gène *Sry* ont démontré que cette expression s'initiait au sein des précurseurs

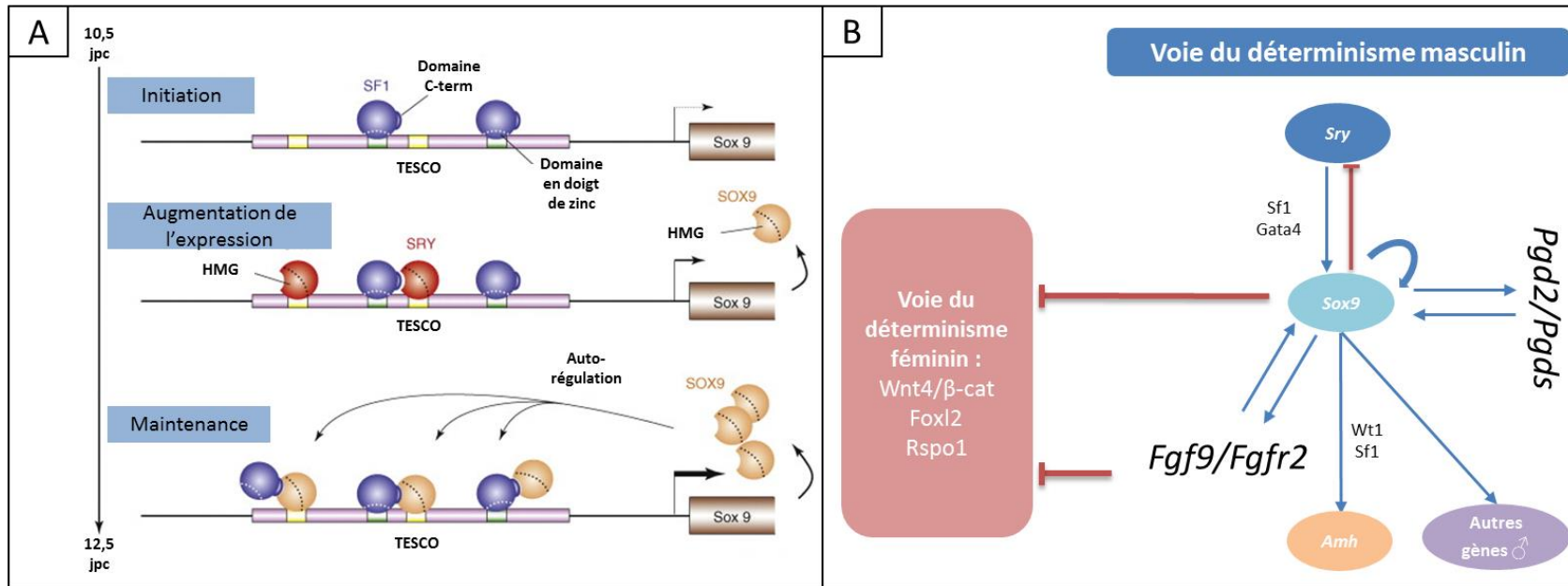


Figure 8 : Modèle de régulation transcriptionnelle du gène SOX9 dans la gonade et son rôle dans le déterminisme sexuel. (A) La régulation transcriptionnelle de SOX9 se décompose en trois phases : initiation, augmentation et maintien de l'expression. (B) Schéma de contrôle de la différenciation sexuelle masculine (adapté de Sekido & Lovell-Badge, 2009).

cellulaires de soutien des cellules germinales, orientant ainsi leur différenciation en cellules de Sertoli. Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans l'activation de l'expression du gène *Sry* tels que CBX2 (chromobox protein homolog 2), WT1, GATA4, ZFP281 (zinc finger protein, multitype 2) et CITED2 (Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2) (Buaas *et al.*, 2009).

## 2. Les voies génétiques du déterminisme sexuel : *SRY* et la cascade des gènes impliqués

Bien que le gène *SRY* apparaisse comme le régulateur majeur du déterminisme sexuel, il est en réalité au sommet d'une réaction en chaîne marquée par des phénomènes d'activation et d'inactivation géniques entre les voies de différenciation mâle et femelle (Figures 8 et 9). Chez les hommes 46,XX avec un phénotype masculin à la naissance, l'analyse moléculaire montre la présence du gène *SRY* pour la majorité d'entre eux (80%) (Li *et al.*, 2014b). Ceci indique qu'il existe dans 20% des cas des hommes génétiquement 46,XX ne possédant pas la séquence du gène *SRY* dans leur génome et qui pourtant développent des caractères masculins. Ainsi, des nombreux individus 46,XX-*SRY*-négatif ont été rapportés associés à une masculinisation complète (Zenteno *et al.*, 1997, Abusheikha *et al.*, 2001, Valetto *et al.*, 2005). En outre, des analyses génétiques réalisées chez des femmes 46,XY présentant des anomalies du développement sexuel ou DSD (disorder of sex development) et porteuse d'une anomalie chromosomique (duplication du chromosome X, délétions des chromosomes 9 et 10, monosomies 9p et translocations impliquant le chromosome 7, 9 ou 17) présentent une différenciation testiculaire anormale (Bennett *et al.*, 1993, Bardoni *et al.*, 1994, Tommerup *et al.*, 1993, Wilkie *et al.*, 1993, Crocker *et al.*, 1988, McDonald *et al.*, 1997, Ogata *et al.*, 1997). Ces études ont permis d'identifier de nombreux autres gènes jouant un rôle crucial dans la détermination du sexe (Flejter *et al.*, 1998).

### 1.1. La voie du déterminisme masculin

L'augmentation de l'expression de *SF1* active l'expression du gène *Sry*, qui à son tour et avec *SF1*, augmente l'expression de *Sox9*. Une fois que les niveaux de *SOX9* ont atteint un seuil critique, plusieurs boucles de régulation positives sont initiées (*FGF9* ou *PGD2*), y compris l'auto-régulation de sa propre expression (Figure 8) (Sekido & Lovell-Badge, 2009). Les gènes pro-ovariens sont initialement exprimés dans les cellules de la gonade bipotentielle, et se retrouvent réprimés dès lors que débute le développement mâle (Jameson *et al.*, 2012). *SOX9* va en partie assurer le développement testiculaire par la répression de la voie *WNT4/β-catenin* et l'activation d'autres gènes tels *Fgf9*, *Pgds*, *Cyp26b1*, *Dhh* et *Amh* (Jameson *et al.*, 2012, Sekido & Lovell-Badge, 2008) (Figure 8). *FGF9* et *PGDS* contribuent ainsi à renforcer la répression des gènes pro-ovariens (Figure 8B). Des études sur les gonades XY invalidées pour le gène *Fgf9*, ont montré une augmentation de l'expression de *Wnt4*, mais aussi une perte d'expression de *Sox9* (Kim *et al.*, 2006) associées à une inversion de sexe. Dans la gonade mâle, l'AMH est exprimée en quantités importante dans le testicule pendant la vie fœtale sous l'action du gène *Sox9* (Figure 8B). Cette expression est maximale lors de la régression des CM chez le mâle, puis l'AMH est encore exprimé mais à des niveaux plus faibles jusqu'à la puberté. *Sox9* est également responsable de l'expression du gène *Cyp26b1*,

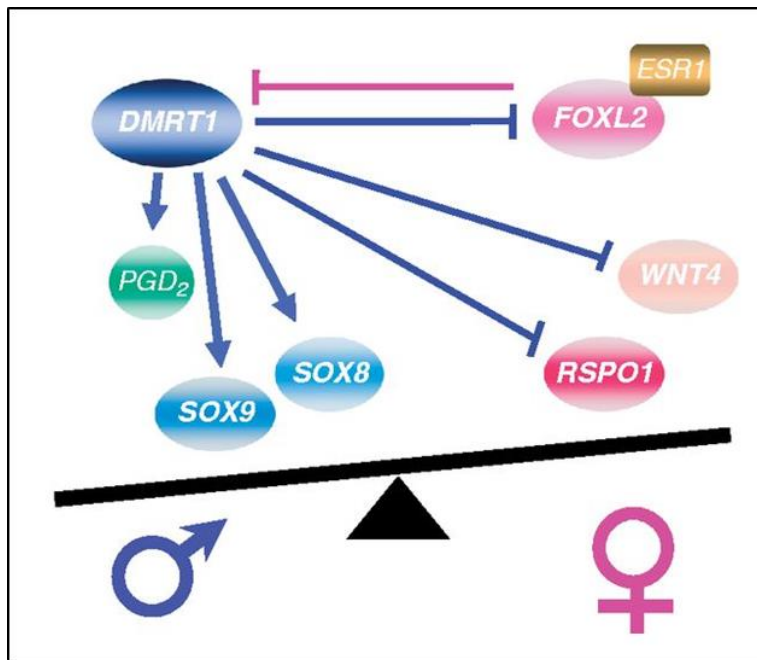


Figure 9 : Modèle proposé pour la régulation du développement sexuel post-natal par *DMRT1* chez les mammifères (She *et al.*, 2014).

membre de la famille des cytochromes P450, et est impliqué dans le processus de dégradation de l'acide rétinoïque (AR) dans le testicule. L'AR induit l'entrée en méiose des cellules germinales en agissant positivement sur l'expression du gène *Stra8* (Figure 8A). *Cyp26b1* s'exprime dans les gonades des deux sexes dès 11,5 jpc chez la souris, mais une expression plus forte est observée dans les gonades mâles. De cette manière, *Cyp26b1* limite l'exposition du tissu testiculaire à l'AR, et l'entrée en méiose des cellules germinales n'a lieu qu'à la puberté.

Le gène *Dmrt1* a été décrit plus récemment comme potentiel gène ancestral du déterminisme sexuel puisque son rôle dans le développement de la gonade mâle semble être conservé chez les vertébrés (Rey *et al.*, 2000). Le gène *Dmrt1* chez les mammifères active plusieurs gènes spécifiques du déterminisme masculin et réduit considérablement l'expression des gènes favorisant le développement féminin (She & Yang, 2014) (Figure 9). La perte du gène *Dmrt1* chez la souris induit l'activation du gène *Foxl2* et la transformation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa. Chez l'homme, des délétions des gènes *DMFT1/2/3* sont associées à des cas de DSD caractérisés par la réversion sexuelle d'individus XY (Rey *et al.*, 2000).

Produite par les cellules de Sertoli, la protéine Dhh intervient dans la différenciation des cellules myéloïdes péritubulaires (CMP) et par conséquent dans la formation des cordons testiculaires (Clark *et al.*, 2000). La perturbation de la signalisation médiée par Dhh et son récepteur *Ptch1* chez des souris *Dhh*<sup>-/-</sup>, entraîne également des défauts de la différenciation des cellules de Leydig fœtales (Yao *et al.*, 2002).

Le facteur de transcription *Gata4* est exprimé dans les cellules de Sertoli et de Leydig et est nécessaire au développement normal du testicule fœtal murin. La délétion du gène *Gata4* chez la souris conduit à un échec du développement testiculaire ainsi qu'à la baisse considérable de l'expression du gène pro-testicule *Dmrt1* (Hu *et al.*, 2013). *Gata4*, avec *Wt1*, est important pour réprimer les gènes pro-ovariens, tels ceux de la voie *Wnt/β-catenin* (*Ctnnb1* ou *β-catenin* et *follistatin*), lors de l'engagement de la gonade vers le développement testiculaire.

Ainsi, de nombreux gènes sont exprimés sélectivement dans les cellules de Sertoli, sous l'influence du gène *SRY*, et permettent la mise en place progressive d'un tractus génital mâle et un développement testiculaire propice à la spermatogenèse.



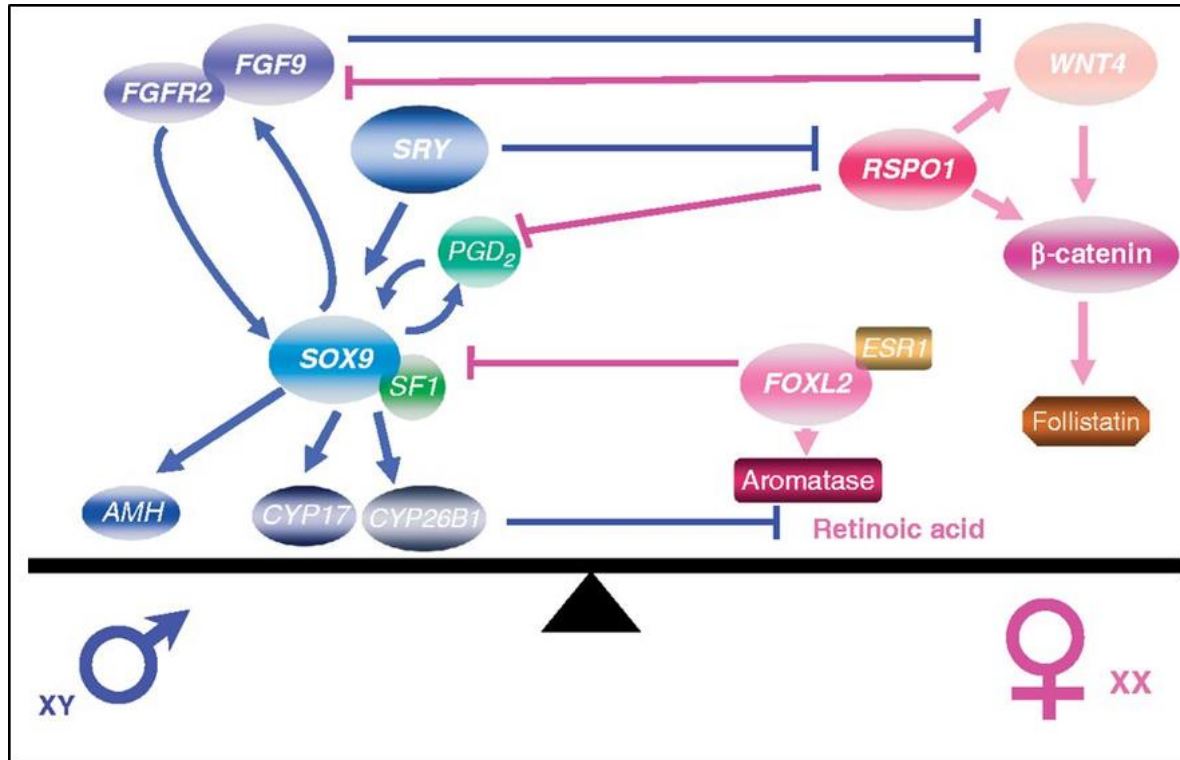


Figure 10 : Le délicat équilibre entre les voies du déterminisme mâle et femelle (She *et al.*, 2014).

## 1.2. La voie du déterminisme féminin

Pendant de nombreuses années, le développement des testicules était considéré comme étant le processus actif du déterminisme sexuel. Pourtant, un certain nombre de gènes ont été identifiés comme jouant un rôle « anti-testicule », des gènes pro-ovariens indispensables au développement de la gonade XX en ovaire (Figure 10). Cette voie pro-ovarienne remplit sa mission en agissant directement sur l'expression du gène *Sox9*. Dans les gonades de souris XX à 11,5 jpc, l'expression du gène *Sox9* est activement réprimée. Cette répression est maintenue dans les cellules de la granulosa tout au long du développement fœtal et dans l'ovaire adulte (Jakob & Lovell-Badge, 2011). La voie Wnt/ $\beta$ -catenin est une voie de signalisation qui joue un rôle majeur dans la différenciation ovarienne.

La voie Wnt/ $\beta$ -catenin contrôle l'expression de la follistatine (FST), une protéine de liaison à l'activine connue pour réguler l'axe hypothalamus-hypophyse-gonadique. Chez les mammifères, la FST joue un rôle important dans la différenciation ovarienne précoce et la survie des cellules germinales dans l'ovaire, agissant en aval de la voie Wnt (Yao *et al.*, 2004). En absence de  $\beta$ -catenin nucléaire, les protéines TCF/LEF agissent comme répresseurs transcriptionnels (Tevosian & Manuylov, 2008). L'inhibition de la voie Wnt durant la différenciation ovarienne de gonades XX, montre une réversion partielle du sexe féminin en sexe masculin, ainsi qu'une expression du gène *Fgf9*. L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin induit donc une inhibition de l'expression de *Sox9* et par conséquent une absence d'expression de l'AMH durant la vie fœtale permettant aux CM de continuer leur différenciation. Le gène *Cyp26b1* n'est pas non plus exprimé permettant à l'AR, présent en plus grande quantité, d'induire l'entrée des cellules germinales en méiose dans les ovaires embryonnaires. Le gène *Rspo1* code pour un facteur de croissance, la protéine R-spondine 1. Celle-ci interagit avec la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin en activant l'expression du gène *Wnt4*, en influençant l'externalisation du récepteur membranaire LRP6, élément du complexe membranaire interagissant avec Wnt, ainsi qu'en stabilisant la  $\beta$ -catenin intracellulaire (Tomaselli *et al.*, 2011). La suppression ciblée de *Rspo1* chez la souris XX entraîne un développement en testicule et une répression du gène *Wnt4*. Egalement chez l'homme, des cas de développement testiculaire chez des patients 46,XX-SRY-négatif présentant un défaut du gène *RSPO1* ont été rapporté, (Tomaselli *et al.*, 2011).

Le facteur de transcription *Foxl2* contribue à réprimer le programme de la différenciation mâle. Il régule directement l'expression de l'aromatase pendant le développement de l'ovaire. La suppression du gène de *Foxl2* (*Foxl2*<sup>-/-</sup>) pendant le développement chez la souris conduit à une dysgénésie ovarienne et à une infertilité. La délétion du gène *Foxl2* au sein de follicules ovariens adultes conduit à l'expression immédiate des gènes spécifiques du testicule, y compris le gène cible *Sox9* (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Chez l'homme, des mutations du gène *FOXL2* conduisent au syndrome de blepharophimosis (BPES) associé à une insuffisance ovarienne prématurée chez les femmes. *FOXL2* coopère avec le récepteur de type 1 des œstrogènes (*ESR1*) pour réprimer activement la transcription du gène *Sox9* et ainsi le « programme » testiculaire. De nombreux autres gènes sont la cible de *FOXL2*, parmi lesquels les gènes *ESR1/2*, permettant la production des œstrogènes dans les cellules de la granulosa (Uhlenhaut *et al.*, 2009, Georges *et al.*, 2014).



Dans le déterminisme du sexe féminin, *Dax1* est un antagoniste du gène *Sox9* en agissant négativement sur SF1. Néanmoins, son implication reste sujet à discussion (She & Yang, 2014, Nachtigal *et al.*, 1998). Les souris XY possédant une copie supplémentaire ou une délétion du gène *Dax1* présentent une perturbation du développement testiculaire (Swain *et al.*, 1998). Les patients porteurs d'une duplication ou « double dose » du gène *Dax1* montrent des caractéristiques de réversion sexuelle XY (Swain *et al.*, 1998). La suppression du gène *Dax1* chez la souris XX n'empêche pas le développement de l'ovaire, rendant alors difficile de considérer *Dax1* comme un gène du déterminisme ovarien (Meeks *et al.*, 2003).

Le gène *Gata4* a une expression sexuelle dimorphique et soutient l'initiation du développement des crêtes génitales (Hu *et al.*, 2013). Malgré son implication dans la répression des gènes pro-ovariens dans le testicule des souris XY, *Gata4* est également indispensable à l'expression de gènes du développement ovarien. Des études d'invalidation du gène *Gata4* chez des souris XX ont en effet révélées une diminution de l'expression de plusieurs gènes pro-ovariens (*Ctnnb1*, *Fst* et *Bmp2*) (Rudigier *et al.*, 2017). Ainsi, le facteur de transcription GATA4 remplit un double rôle, celui de répresseur des gènes de la voie de différenciation ovarienne dans les testicules fœtaux et celui d'activateur des gènes pro-ovariens, *Foxl2*, dans les ovaires fœtaux (Rudigier *et al.*, 2017).

Ainsi, l'ensemble des études menées dans le domaine du déterminisme sexuel démontrent que la maintenance du phénotype ovarien est un processus actif tout au long de la vie. Le gène *SRY* est indispensable mais pas suffisant pour induire une différenciation masculine. De même, l'absence du gène *SRY* est nécessaire mais pas suffisante pour induire la détermination ovarienne.

#### **D. Développement des voies génitales masculines**

La différenciation sexuelle est un processus long et séquentiel qui débute pendant la période fœtale et se poursuit en période néonatale et pubertaire pour aboutir à l'établissement d'un dimorphisme sexuel.

##### **1. Différenciation des voies génitales masculines**

Une fois le destin testiculaire imposé aux GB, les cordons cellulaires vont se différencier en tubes séminifères au sein desquels se trouvent les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Les deux structures embryonnaires à l'origine des voies génitales masculines et féminines co-existent initialement au stade de la gonade indifférenciée : les CW et les CM (Mullen & Behringer, 2014). Dans l'embryon féminin, l'absence de testostérone ne permet pas le développement des CW qui involuent, et en l'absence d'AMH. Les CM quant à eux se développent et se différencient en utérus, en trompes utérines et en vagin (deux tiers supérieurs) (Mullen & Behringer, 2014). Dans le sexe masculin, l'involution des CM s'effectue sous l'influence de l'AMH qui est sécrétée par les

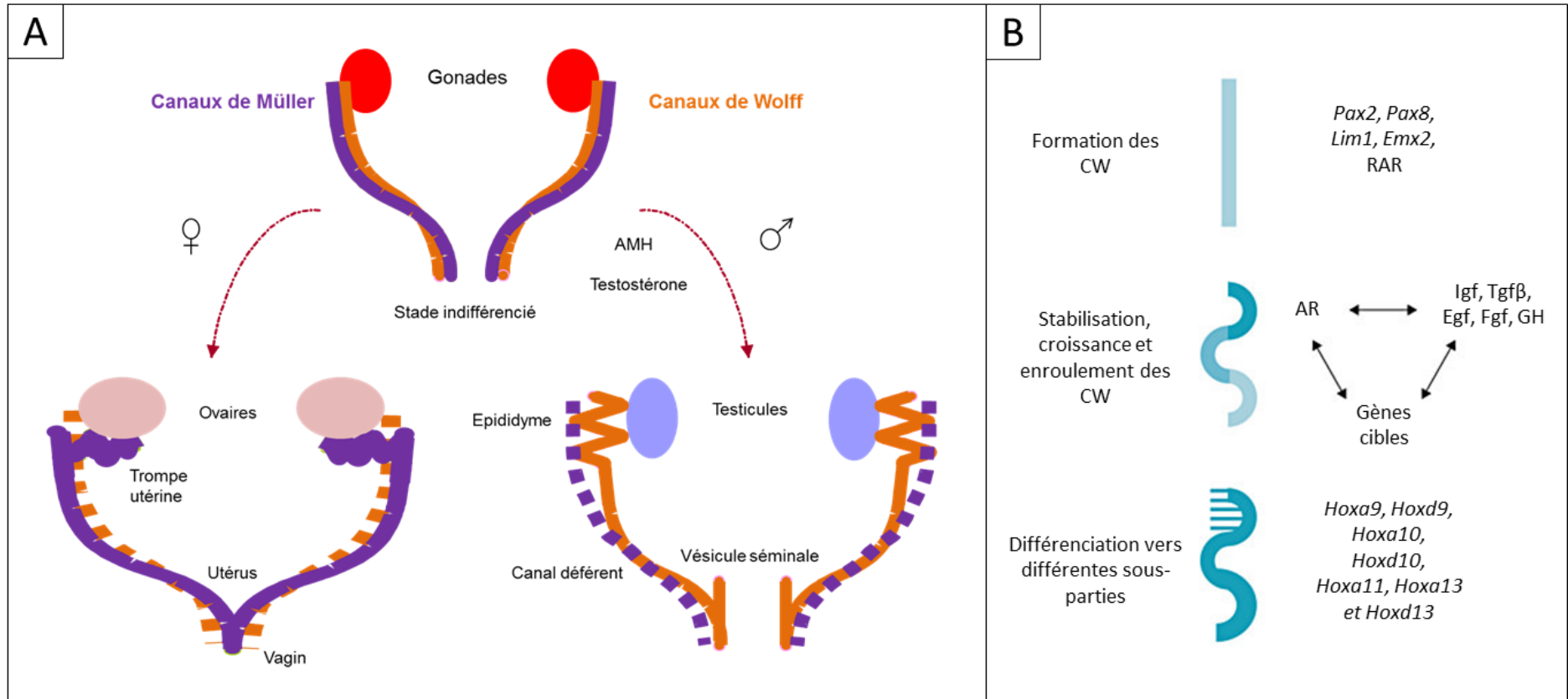


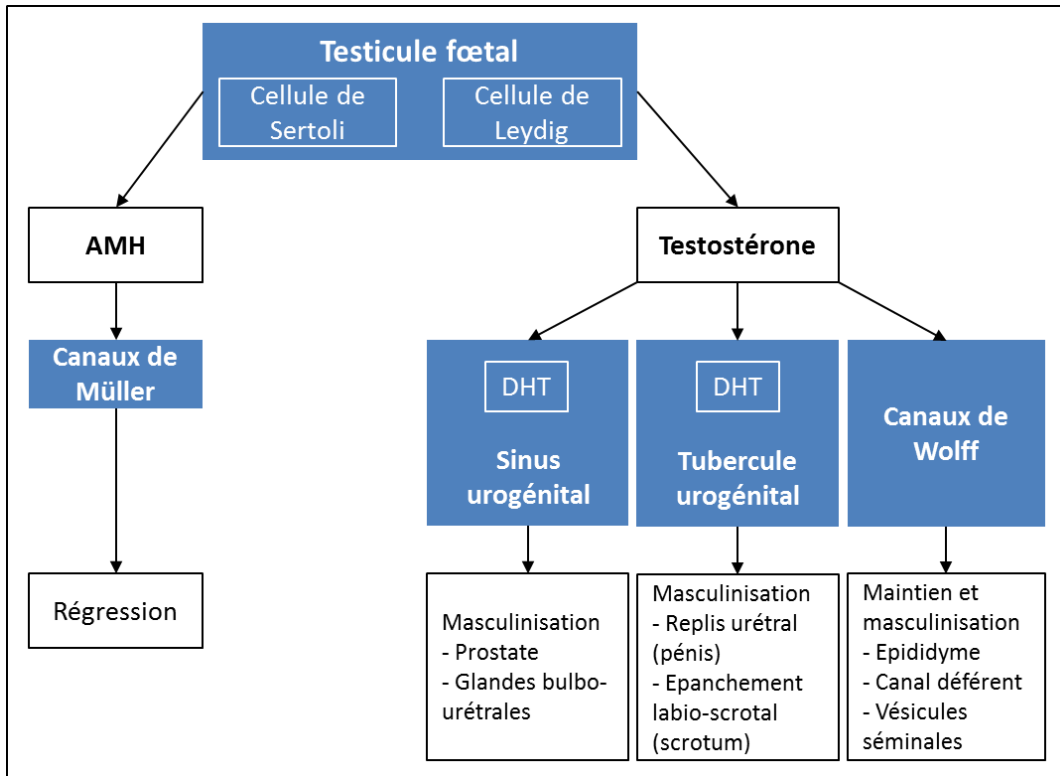
Figure 11 : (A) Evolution des canaux de Müller et de Wolff en fonction du sexe. (B) Gènes impliqués dans les phénomènes de formation, maintien et différenciation des canaux de Wolff. AR : androgen receptor ; CW : Canaux de Wolff (adapté de Tachdjian *et al.*, 2016 et Hannema & Hughes, 2007).

cellules de Sertoli (Figure 11A) (Mullen & Behringer, 2014). L'AMH constitue un des éléments clés de la différenciation du tractus génital masculin. Elle est sécrétée tôt par les cellules de Sertoli et diminue à la puberté. La sensibilité des CM à l'action de l'AMH est bien définie dans le temps, entre la 8<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'homme (Tachdjian *et al.*, 2016). La testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig, contribue au maintien et au développement des CW qui se connectent aux tubes séminifères au niveau du *rete testis* (Mullen & Behringer, 2014). Les CW se différencient en épидидyme, en canaux déférents et en vésicules séminales (Mullen & Behringer, 2014, Tachdjian *et al.*, 2016) (Figure 11A). L'utilisation de modèles de souris *knock-out* a permis d'identifier les gènes impliqués dans le développement des CW. L'expression région-spécifique de plusieurs gènes à homeobox est importante pour la différenciation des CW (Figure 11B). La perturbation de l'expression des gènes *Hoxa10*, *Hoxa11* et *Hoxa13* a été rapportée associée à des malformations et à une anomalie de la différenciation des CW (Benson *et al.*, 1996, Podlasek *et al.*, 1999, Hsieh-Li *et al.*, 1995). Des résultats suggèrent que les protéines Pax2 et Pax8 sont requises pour la conversion épithélio-mésenchymateuse, un processus essentiel pour la formation des CW et des tubules mésonéphriques (Figure 11B). Chez les souris n'exprimant pas *Pax2* et *Pax8*, les CW ne se développent pas (Bouchard *et al.*, 2002).

La testostérone diffuse vers les CW et stimule leur développement et leur différenciation. Les cellules de Leydig sécrètent de la testostérone dès la 8<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'homme. Chez la souris, la castration d'un embryon mâle avant la différenciation de son appareil génital résulte en la régression des CW. L'implantation d'un cristal de testostérone dans la cavité abdominale de fœtus castrés, mâles comme femelles, empêche la régression des CW. Il a également été rapporté que des souris dépourvues de AR (androgen receptor) montrent une agénésie de l'épididyme, des canaux déférents et des vésicules séminales (Yeh *et al.*, 2002). Ainsi, la testostérone assure le maintien des CW par sa fixation à son récepteur AR. AR régule l'expression de facteurs de croissance, tels EGF, GH, IGF-1, FGF3-7-10 et TGFβ2, qui interviennent dans les interactions épithélio-mésenchymateuses et par conséquent dans le développement des CW (Hannema & Hughes, 2007) (Figure 11B). Leur rôle précis, le mécanisme de leurs interactions et de leur régulation par les androgènes restent inconnus.

## 2. Contrôle hormonal du sexe phénotypique

Le sexe phénotypique dépend initialement du génotype. Le sexe génétique influence en effet le sexe gonadique qui lui-même influence le développement du tractus génital et des organes génitaux externes. L'établissement du sexe phénotypique se réalise en plusieurs étapes successives, depuis la vie fœtale (développement du tractus génital) jusqu'à la puberté (mise en place des caractères sexuels secondaires) à l'âge adulte. Suite à l'orientation de la gonade indifférenciée, la différenciation sexuelle est sous la dépendance de la production et de l'action des hormones d'origine gonadique (testostérone, DHT et AMH) qui contrôlent ainsi le développement du tractus génital puis son fonctionnement après la puberté.



**Figure 12** : Effet indépendant de l'AMH, de la testostérone et de la DHT sur la différenciation sexuelle des voies génitales et des organes génitaux externes du système reproducteur masculin. AMH: hormone anti-müllérienne ; DHT: dihydrotestostérone.

## 2.1. DHT et différenciation des organes génitaux externes

Le développement des organes génitaux externes masculins et féminins commence par la formation de structures constituant le stade ambisexual. Chez l'homme, le développement des organes génitaux externes nécessite la conversion, par la 5 $\alpha$ -réductase, de la testostérone en un dérivé hormonal, la dihydrotestostérone ou DHT. Sous l'effet de la DHT, le sinus urogénital va évoluer chez l'homme en prostate et en glandes bulbo-urétrales, alors que chez la femme, en absence de testostérone, il évoluera pour donner le tiers inférieur du vagin. En ce qui concerne les organes génitaux externes masculins, le tubercule génital se développe sous l'influence de la DHT en glande du pénis. Les replis urétraux sont à l'origine du pénis et des renflements labio-scrotaux du scrotum (Figure 12). Chez la femelle, le tubercule génital donne le clitoris, les replis urétraux se développent en petites lèvres et l'épaississement labio-scrotaux en grandes lèvres (Tachdjian *et al.*, 2016). Chronologiquement, le début de la régression des CM chez le fœtus de sexe masculin a lieu aux alentours des 8<sup>ème</sup>-9<sup>ème</sup> semaines de développement. Il y a alors une masculinisation des organes génitaux externes. Aux alentours des 7<sup>ème</sup>-8<sup>ème</sup> semaines de développement, la migration testiculaire intra-abdominale débute sous l'effet d'INSL3 (insuline-like 3) qui est sécrété par les cellules de Leydig. La phase inguino-scrotale de la descente testiculaire débute à la 25<sup>ème</sup> semaine de développement pour se terminer dans le scrotum autour de la 35<sup>ème</sup> semaine de développement (Jegou, 2015).

## 2.2. Développement des caractères sexuels secondaires

La puberté correspond chez l'homme à l'acquisition de la maturité sexuelle qui se caractérise en partie par l'apparition des caractères sexuels secondaires. C'est une période de transition qui implique des modifications sur de nombreux aspects du développement physique, émotionnel, cognitif et social. La puberté débute par la réactivation de l'axe gonadotrope afin de permettre la sécrétion des androgènes et la production de gamètes matures par les gonades.

La puberté s'opère suite à des changements complexes se produisant à différents niveaux : hypothalamus, hypophyse, gonades et glandes surrénales. Chez le garçon, elle a lieu habituellement entre 9 et 15 ans (moyenne de 12 ans) et s'accompagne de signes physiques du développement : augmentation du volume testiculaire, apparition de la pilosité dont la pilosité pubienne (origine surrénalienne), mue de la voix, et pic de croissance (échelle de Tanner) (Blakemore *et al.*, 2010). Avant la puberté, la libération des gonadotrophines LH et FSH est faible et se produit rarement. Le processus de puberté commence dans l'hypothalamus par la sécrétion de la GnRH, donnant ainsi un signal à l'hypophyse pour qu'elle stimule à son tour les gonades. Pendant la phase de sommeil, des épisodes de sécrétion de LH de courte durée apparaissent. Les pics de LH augmentent progressivement en termes d'amplitude puis de fréquence tout au long de la mise en place de la puberté. L'augmentation de la stimulation testiculaire par la LH a pour effet l'augmentation des taux circulants des stéroïdes sexuels (Richmond & Rogol, 2007). Les androgènes sont principalement produits par les testicules, mais une petite contribution est due à une sécrétion par les surrénales. La testostérone est aromatisée en œstrogènes pendant la puberté. Chez l'homme, la majorité de



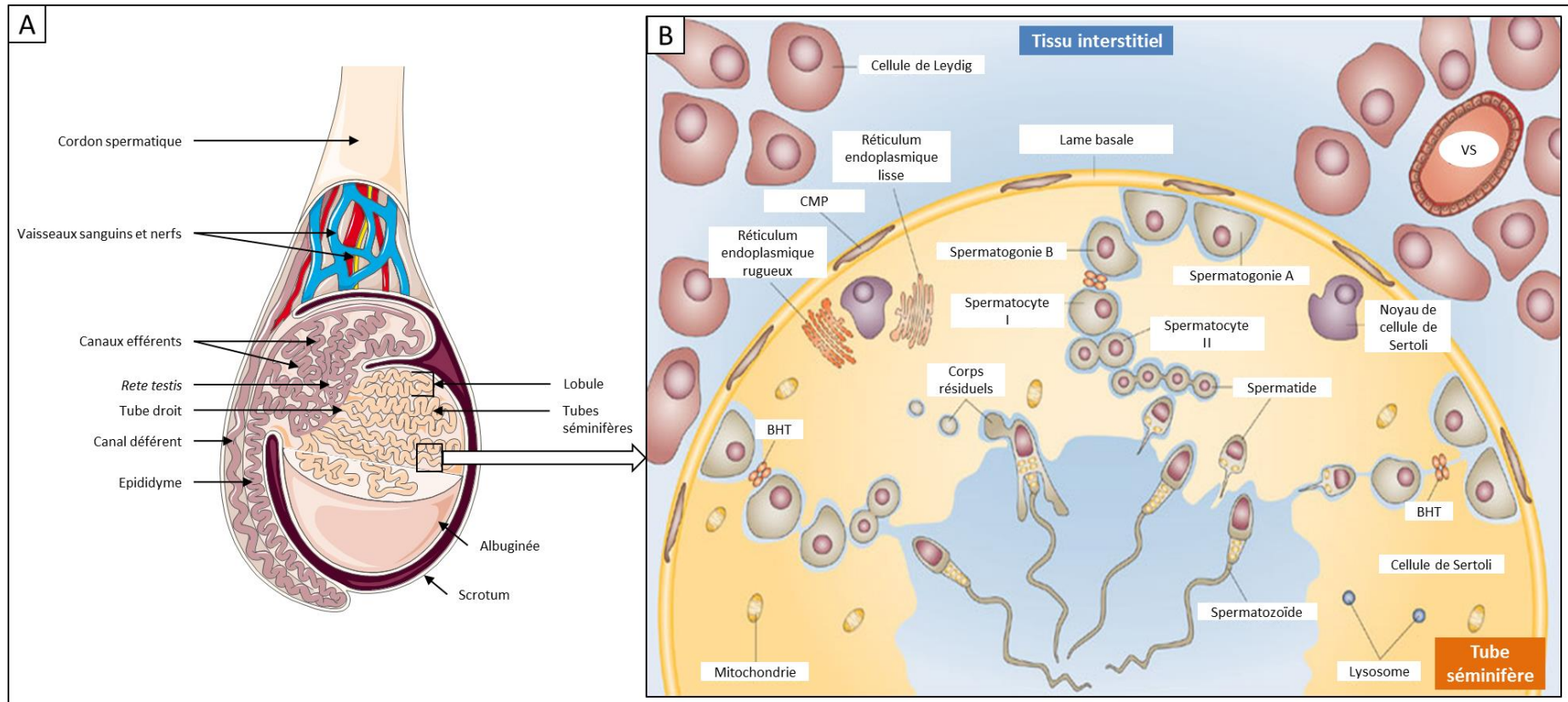


Figure 13 : Structure anatomique du testicule (A). Organisation du tube séminifère et du tissu interstitiel (B). BHT : barrière hémato-testiculaire; CMP : cellule myéloïde périvitubulaire; VS : vaisseau sanguin (adapté de [www.servier.fr](http://www.servier.fr) et Rato *et al.*, 2012).

l'œstradiol produite dérive de l'aromatisation extra-glandulaire de la testostérone ou de l'androstenedione. De nombreux effets de la testostérone sur la croissance, le squelette, la maturation et l'accrétion osseuse (dépôt de calcium) résultent de son aromatisation en œstrogènes (Richmond & Rogol, 2007).

La puberté est donc un indicateur de la maturation normale de l'axe gonadotrope et du système de reproduction. Plusieurs facteurs influencent la puberté, tels que l'alimentation, le stress et l'exercice physique. L'initiation de la puberté s'opère au niveau central et est génétiquement déterminée. En effet, de nombreux travaux sur la génétique du retard pubertaire rapportent l'implication des gènes *GnRHR*, *LH* et *FSH* mais aussi de nouveaux gènes associés à un défaut de la régulation de l'axe gonadotrope tels que *KAL1*, *FGFR1*, *DAX1*, *SF1*, *PROP1* ou encore *Kiss-1*.

### III. La spermatogenèse et son contrôle

Après avoir atteint les gonades, les CGP se différencient en gonocytes puis en spermatogonies. A la périphérie des tubes séminifères (TS), les spermatogonies subissent des divisions mitotiques successives pour former des spermatogonies et des spermatocytes primaires. Par la suite, deux divisions méiotiques se succèdent pour aboutir à la production de spermatides haploïdes, à partir desquelles les spermatozoïdes sont finalement formés par le processus de la spermiogenèse. A partir de la puberté, les spermatozoïdes sont produits continuellement jusqu'à la fin de la vie. La spermatogenèse dure environ 74 jours. Cette production n'étant pas synchrone dans l'ensemble des tubes séminifères, l'homme produit ainsi quotidiennement des spermatozoïdes.

#### A. Le testicule : lieu de la spermatogenèse

Le testicule, organe pair, est la gonade mâle qui assure deux fonctions principales : une fonction exocrine de production des gamètes et une fonction endocrine de sécrétion des androgènes. Le testicule est situé dans le scrotum, en dehors de la cavité abdominale, ce qui le maintient à une température inférieure à 2°C par rapport à celle du corps. Le testicule est entouré d'une capsule conjonctive fibreuse et résistante, l'albuginée, qui envoie des travées cloisonnant le testicule en plusieurs lobules dans lesquels s'organisent les tubes séminifères, eux-mêmes entourés de tissu interstitiel (Figure 13) (Tachdjian *et al.*, 2016). Les tubes séminifères se joignent deux à deux et confluent dans un tube droit qui débouche alors dans un réseau de canaux nommé *rete testis*. Celui-ci se poursuit par les canaux efférents puis par l'épididyme (coiffe le testicule) et enfin par le cordon spermatique (contenant le canal déférent) et s'achève par le canal éjaculateur (Tachdjian *et al.*, 2016). La spermatogenèse est communément associée au processus de maturation des cellules germinales. Cependant, d'autres cellules, les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les cellules myéloïdes périvitubulaires, jouent un rôle important. Ainsi, des altérations touchant la fonction de ces cellules peuvent conduire à une infertilité.

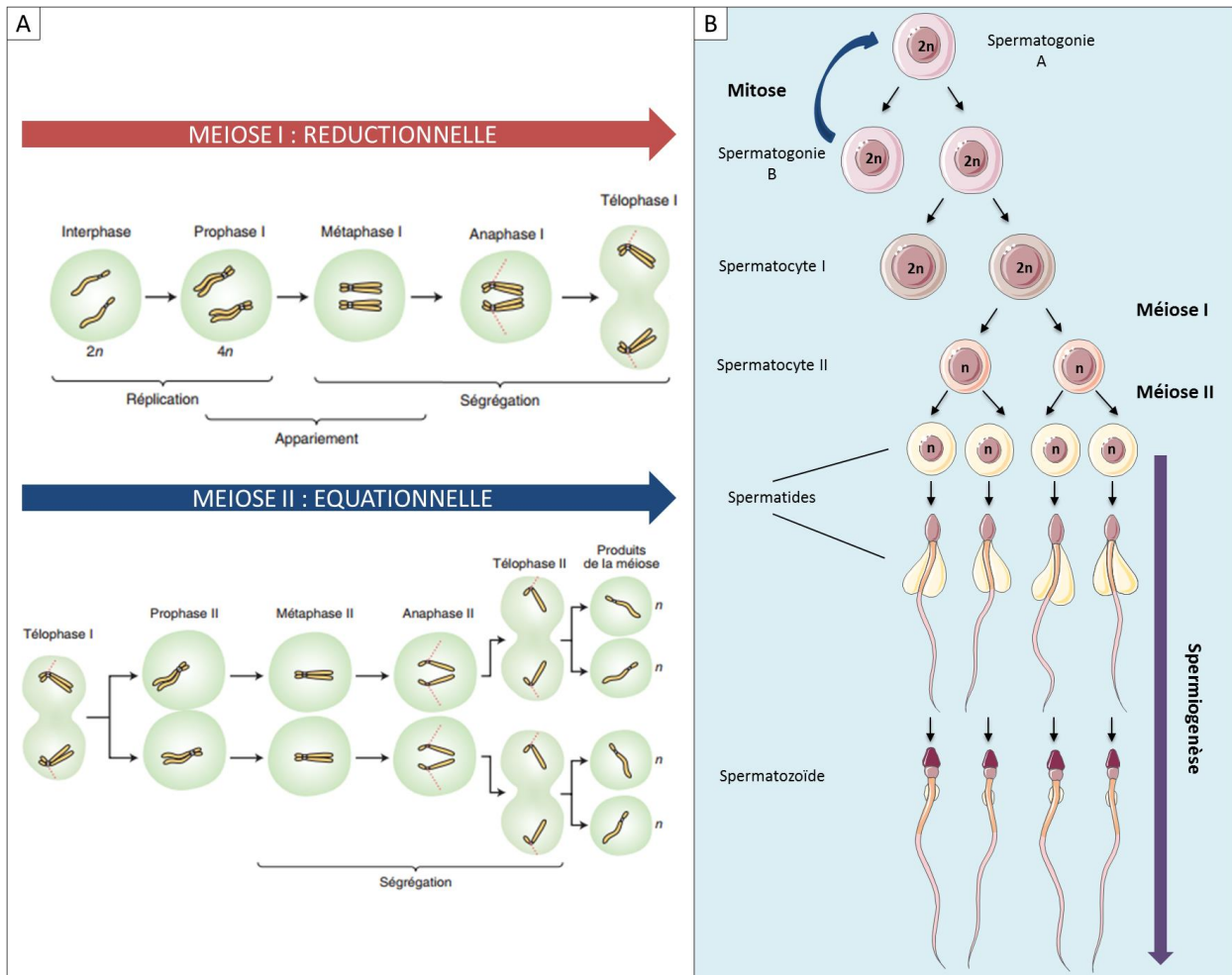


Les tubes séminifères sont le siège de la spermatogenèse. Ils contiennent des cellules germinales aux différents stades ainsi que les cellules de Sertoli, cellules somatiques. Au sein des tubes séminifères, les cellules germinales progressent suivant une différenciation centripète à partir des spermatogonies qui se situent contre la membrane basale en périphérie. Les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière du tube séminifère (Figure 13). Les cellules germinales se retrouvent séquestrées par les cellules de Sertoli, qui occupent toute la hauteur du tube séminifère. Les cellules de Sertoli sont reliées entre elles par des complexes de jonctions spécialisées. Des jonctions serrées relient en effet entre elles les cellules de Sertoli adjacentes et représentent une véritable barrière anatomique isolant les cellules du tube séminifère du sérum ou de la lymphe. Des jonctions communicantes et des jonctions adhérentes co-existent également le long de la membrane plasmique. De cette manière, les cellules de Sertoli forment avec les cellules myéloïdes périvitubulaires et la lame basale la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière contribue directement à l'organisation structurelle complexe du testicule en créant un environnement spécialisé, le tube séminifère. Durant chaque phase de la spermatogenèse, les cellules germinales d'un même stade sont connectées par des ponts intercellulaires rendant alors possible des échanges de signaux et un équilibre dans l'expression des gènes, post-méiotiques en particulier. La figure 13 montre une coupe transversale d'un tube séminifère et une représentation schématique de son organisation. Le tissu interstitiel, tissu endocrine du testicule, se situe entre les tubes séminifères. C'est un tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en nerfs. Au sein de ce tissu conjonctif sont répartis des petits amas de cellules de Leydig, étroitement associées aux vaisseaux sanguins, ce qui facilite la sécrétion endocrine des stéroïdes qu'elles synthétisent (Figure 13). Le tissu interstitiel contient aussi d'autres types cellulaires tels que des mastocytes, des macrophages, des lymphocytes et des fibroblastes.

## **B. Haploïdisation des cellules germinales**

### **1. La méiose**

Initialement, les spermatogonies présentent dans le noyau deux exemplaires de chaque autosome et deux chromosomes sexuels X et Y, l'un hérité de la mère et l'autre du père. Il s'agit de deux versions similaires appelées chromosomes homologues mais non identiques d'un point de vue de la séquence ADN. Avant d'entrer en méiose, chaque chromosome se réplique au cours de l'interphase, et est composé alors de deux chromatides sœurs génétiquement identiques. Les spermatogonies sont premièrement de type A et constituent les cellules souches de la lignée germinale. Ces spermatogonies A maintiennent constant le stock primitif de cellules souches, puis vont progressivement se transformer en spermatogonies B, puis en spermatocytes I : c'est le début de la maturation des cellules germinales. La spermatogenèse représente l'ensemble des étapes qui transforment une cellule germinale diploïde ( $2n= 46$  chromosomes à deux chromatides), la spermatogonie, en quatre gamètes haploïdes spécialisés ou spermatozoïdes ( $n= 23$  chromosomes à une chromatide) (Egozcue *et al.*, 2000).



**Figure 14 :** (A) Les différents stades de la méiose I et II. (B) Les grandes étapes de la spermatogénèse. Les spermatogonies A régénèrent le pool de cellules souches au cours de divisions successives et sont à l'origine de la production d'un nouveau type de cellule, la spermatogonie B, qui donne à son tour deux spermatocytes I. Les spermatocytes I subissent une première division méiotique, appelée division réductionnelle, pour produire deux spermatocytes II. Ces spermatocytes II entre alors en deuxième division de méiose ou division équationnelle aboutissant à la production de cellules haploïdes, les spermatides. Les spermatides, rondes puis allongées, se différencient progressivement en spermatozoïdes par le processus de la spermiogenèse (adapté de et [www.servier.fr](http://www.servier.fr)).

La première division méiotique transforme chaque spermatocyte I diploïde à deux chromatides en deux spermatocytes II haploïdes à deux chromatides (Figure 14). Cette division est marquée par le phénomène d'appariement des chromosomes homologues qui débute au cours du zygotène et s'achève au pachytène lors de la prophase. Les chromosomes forment un lot de quatre chromatides appelé tétrade. Au niveau de ces tétrades, se produisent des phénomènes cruciaux d'échanges entre chromatides de chromosomes homologues, c'est le brassage intra-chromosomique. Au cours de la métaphase I, les tétrades s'alignent aléatoirement à l'équateur du fuseau de division. A l'anaphase, les chromosomes homologues se séparent, les chromatides sœurs de chaque chromosome homologue restant réunies par leurs centromères. Puis, chaque chromosome migre aléatoirement vers un des pôles de la cellule, c'est le brassage inter-chromosomique. Au terme de la télophase, les cellules sont haploïdes et contiennent un jeu unique et complet de chromosomes (à deux chromatides) d'origine paternelle ou maternelle. Les deux brassages génétiques, indépendants l'un de l'autre, assurent ainsi une diversité génétique des gamètes formés (Egozcue *et al.*, 2000). Comme il y a eu une réduction de la moitié du nombre des chromosomes par cellule, cette première division méiotique est ainsi appelée division réductionnelle. La deuxième division méiotique consiste en une mitose classique. Cette étape est marquée, en fin de métaphase, par la séparation des chromatides sœurs : les deux chromatides de chaque chromosome migrent vers les pôles opposés de la cellule. La deuxième division méiotique est dite équationnelle et aboutit donc à partir de deux spermatocytes II, à quatre spermatides à  $n$  chromosome et une chromatide (Egozcue *et al.*, 2000, Gilbert, 2000). Les grandes étapes de la méiose sont résumées dans la figure 14. Elles sont essentielles à la formation des gamètes et à la ségrégation correcte des chromosomes.

### 1.1. Les étapes importantes

La prophase de première division de méiose est l'étape la plus complexe. Les deux événements majeurs de la méiose d'un point de vue génétique ont lieu durant cette phase. Les paires de chromosomes homologues (maternels et paternels) s'apparient et se connectent physiquement (processus de synapsie) ce qui favorise la réalisation d'échanges génétiques (recombinaisons) (Alberts *et al.*, 2002). La synapsie et la recombinaison des chromosomes jouent un rôle essentiel pour une ségrégation chromosomique correcte car c'est alors l'assurance que les chromosomes homologues restent attachés jusqu'au moment de leur séparation en anaphase (Alberts *et al.*, 2002). Les erreurs dans l'exécution du processus méiotique, en particulier au cours de la recombinaison homologue ou de la ségrégation des chromosomes, peuvent entraîner la génération de gamètes aneuploïdes, associés à des fausses couches à répétition, des anomalies congénitales ou une infertilité. La première division méiotique est soumise à différents points de contrôle. Deux principaux points de contrôle ont été décrits pour la première division méiotique : un premier au stade pachytène de prophase I, responsable du déroulement correct de la recombinaison et de la synapsie, et un deuxième en métaphase I, qui régule la ségrégation précise des chromosomes homologues (Alberts *et al.*, 2002).

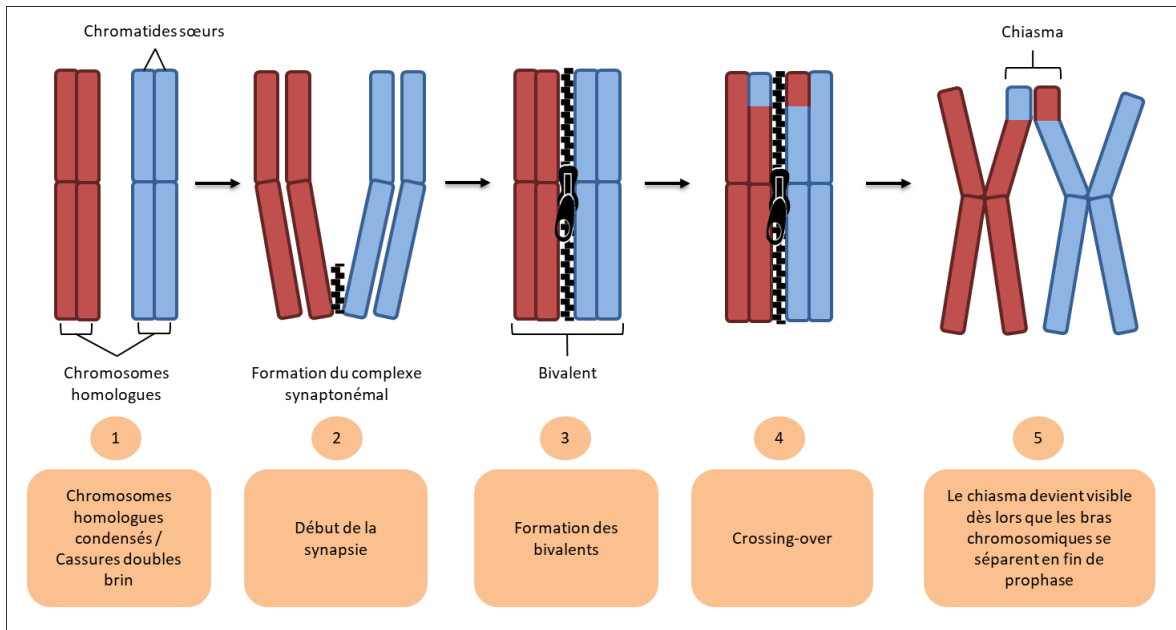


Figure 15 : Les évènements de cassures double-brin, d'appariement des homologues, de synapsie, de recombinaison par *crossing-over* et de fin de synapsie se produisent tout au long du stade pachytène de prophase de première division de méiose. Les processus d'appariement des chromosomes homologues et de synapsie favorisent l'utilisation de l'homologue comme modèle de réparation.

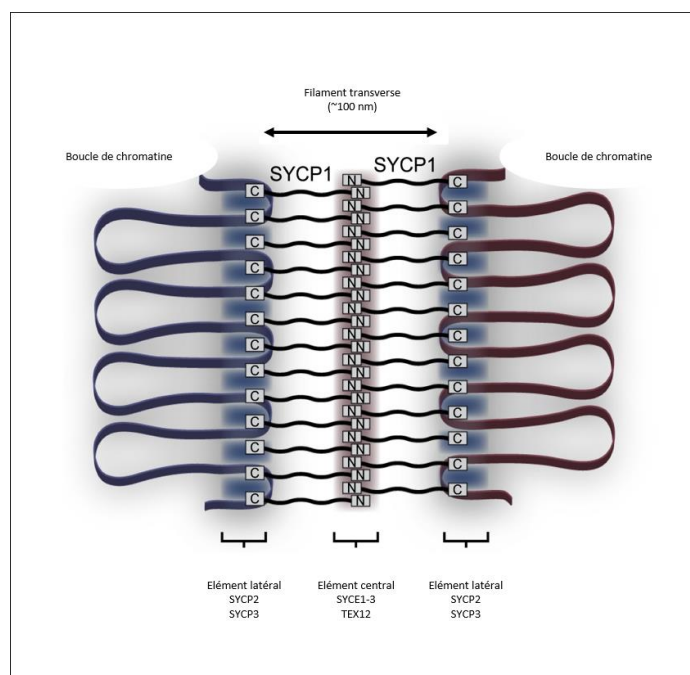


Figure 16 : Modèle de l'assemblage du complexe synaptonémal chez les mammifères à partir des constituants clés. SYCP1 forme les filaments transversaux, avec ses régions N- et C-terminales situées respectivement dans les éléments centraux et latéraux. L'élément central contient également SYCE1, SYCE2, SYCE3 et TEX12, tandis que les éléments latéraux contiennent SYCP2 et SYCP3 (adapté de Syrjänen, *et al.*, 2014).

## 1.2. Prophase I : synapsie des chromosomes

L'étape de prophase est divisée en 5 sous-étapes sur la base de la morphologie des chromosomes (leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse). Au cours du leptotène, la recombinaison méiotique s'initie par la génération de cassures double-brin par l'endonucléase Spo11. Ces recombinaisons réciproques entre chromatides non-sœurs créent une connexion physique ou chiasma qui maintient les homologues entre eux (Figure 15). Chaque chiasma correspond à un *crossing-over* entre deux chromatides non-sœurs et jouent un rôle crucial dans le maintien des homologues maternels et paternels ensemble jusqu'à ce que le fuseau les sépare en anaphase I (Figure 15). La synapsie des chromosomes homologues se réalise grâce à la mise en place d'un complexe protéique appelé complexe synaptonémal (CS) (Figures 15 et 16). Le CS se compose de deux éléments axiaux (protéines SYCP2 et SYCP3), qui se forment pendant le leptotène entre les chromatides sœurs, et d'un élément central (protéines SYCE1-3 et TEX12) (Figure 16) (de Boer & Heyting, 2006, Syrjanen *et al.*, 2014). L'ADN s'organise en boucles régulières fixées aux éléments axiaux du CS (Figure 16) (de Boer & Heyting, 2006). Chez la souris, des mutations à l'état homozygote dans des gènes codant certains constituants du CS présentent un arrêt de la méiose au stade pachytène avec des processus de recombinaison non résolus (de Vries *et al.*, 2005, Yuan *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2006, Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Le phénomène de synapsie des chromosomes homologues est dépendant de la formation préalable de cassures double-brin et de leur réparation par recombinaison homologue. Ainsi, les autosomes qui échouent à la synapsie conservent de nombreuses cassures double brin non réparées. Ces erreurs de réparation des cassures double-brin, et d'asynapsie des chromosomes empêchent alors l'entrée de la cellule en métaphase I. Par ailleurs, un processus d'inactivation de la transcription, appelé meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC), semble aussi contribuer à l'arrêt de la méiose dès lors que des erreurs de synapsie se produisent. En effet, l'inactivation par MSUC interférerait avec l'expression des gènes nécessaires à l'achèvement de la méiose et induirait par conséquent un arrêt de la progression méiotique des spermatocytes présentant des défauts de synapsie en pachytène (Turner, 2007).

## 1.3. Métaphase

La transition métaphase-anaphase de première division de méiose est une étape également contrôlée. Le kinétochore constitue le site d'attachement du microtubule au chromosome et est l'élément qui communique si les chromosomes sont attachés ou non au microtubule. Le passage en anaphase nécessite le clivage de la cohésine, complexe multi-protéique, par la séparase. Cela induit une perte de cohésion et les chromosomes peuvent être séparés de part et d'autre du fuseau. Pendant la méiose, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau empêche toute division cellulaire si les chromosomes ne sont pas correctement reliés de façon bipolaire aux microtubules par leurs kinétochores. Ce contrôle est réalisé par le point de contrôle SAC (spindle assembly checkpoint), un mécanisme de « contrôle qualité » qui retarde la ségrégation chromosomique, et de ce fait empêche l'entrée en anaphase, en réponse à des kinétochores non attachés de façon stable au fuseau de microtubules (Foley & Kapoor, 2013).





## 2. La spermiogenèse : étape de maturation terminale

La spermiogenèse, étape finale de la spermatogenèse, est le processus de différenciation progressive par lequel les spermatides complètent une série d'événements pour devenir des spermatozoïdes capables de motilité. Lors de cette étape, les spermatides, qui initialement présentent un noyau sphérique central avec une chromatine granuleuse, vont subir des transformations morphologiques importantes en passant par le stade de spermatides allongées. L'acrosome va se mettre en place à partir de la confluence de petites vésicules golgiennes. La vacuole pro-acrosomale s'accole au pôle antérieur du noyau et forme l'acrosome. L'acrosome est un organite riche en enzymes nécessaires à l'interaction et au passage de la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation. Ces changements importants impliquent également la diminution significative du volume nucléaire, qui s'allonge, marqué par la condensation de l'ADN. Pour cela, un important remodelage de la chromatine est nécessaire. Les histones vont être remplacées progressivement par des protamines transformant ainsi la chromatine en fibre compactée. La formation du flagelle débute par la migration des deux centrioles à l'autre pôle du noyau. C'est le centriole distal qui sera à l'origine de la partie axiale et motrice du flagelle du spermatozoïde, l'axonème. L'axonème, composé de plusieurs microtubules, s'allonge rapidement. Au cours de l'allongement de l'axe microtubulaire, les mitochondries se rapprochent de celui-ci pour s'organiser finalement autour d'une partie du flagelle au plus proche du noyau formant la pièce intermédiaire. La pièce intermédiaire constitue la principale source d'énergie pour la motilité du futur spermatozoïde. La membrane plasmique s'accole au noyau ne laissant qu'une mince couche de cytoplasme. Le cytoplasme se place en arrière du noyau et forme un corps résiduel qui sera ensuite éliminé. La spermiation, stade final de la spermiogenèse, est le processus par lequel les spermatides allongées subissent un dernier remodelage. Les spermatozoïdes sont alors libérés de l'épithélium séminifère dans la lumière des tubes séminifères (O'Donnell, 2014).

## IV. Contrôle hormonal de la fonction testiculaire

Au sein du tube séminifère, les interactions et les communications cellulaires sont maintenues tout au long de la spermatogenèse par le biais de facteurs paracrines et de molécules de signalisation sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ceci détermine la composition de l'environnement local influençant la progression de la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli, cellules de soutien des cellules germinales, mais aussi les cellules de Leydig synthétisent et sécrètent efficacement des produits essentiels à la croissance et à la différenciation des cellules germinales en développement.

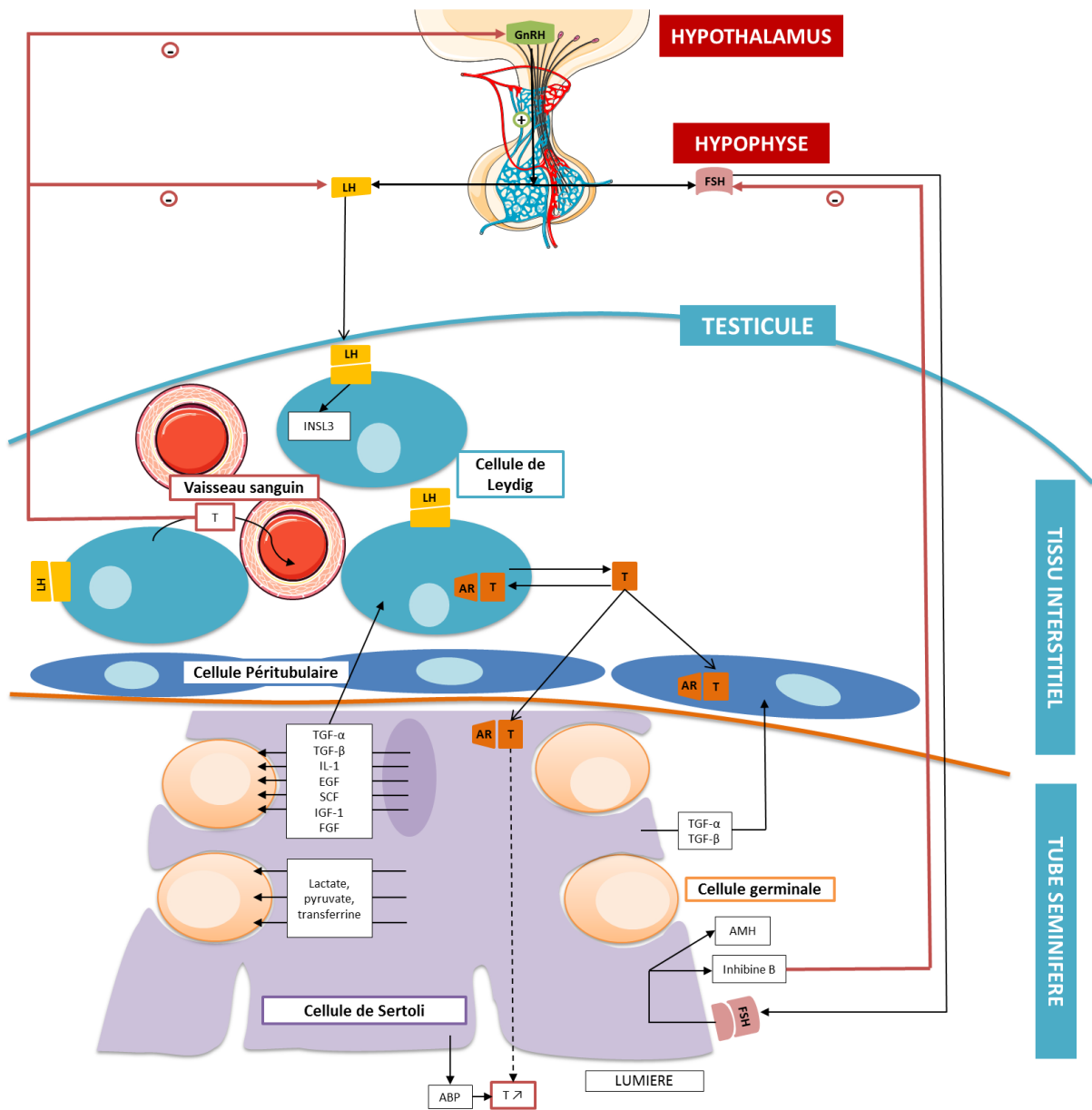


Figure 17 : Représentation schématique des régulations paracrines et autocrines du testicule. ABP : androgen binding protein; AR : androgen receptor; EGF : epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; FSH : follicle stimulating hormone ; IGF-1: insulin-like growth factor-1; IL-1 : interleukin-1; INSL3 : insulin-like 3 ; LH : luteinizing hormone; SCF : stem cell factor; T : testostérone; TGF : transforming growth factor (adapté d'images du site servier.fr).

## A. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

La spermatogenèse dépend de signaux émanant d'un axe formé par l'hypothalamus, l'hypophyse et la gonade. Cette signalisation débute par une sécrétion pulsatile de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) par les cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus situées sur la face ventrale de l'encéphale dans la selle turcique de l'os sphénoïde. Il comprend deux parties, une partie antérieure, l'adénohypophyse et une partie postérieure la neurohypophyse (Tachdjian *et al.*, 2016). La tige hypophysaire relie anatomiquement l'hypothalamus et l'hypophyse et assure le transport de la GnRH par le sang (système porte) jusqu'aux cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'adénohypophyse (Tachdjian *et al.*, 2016). La GnRH se fixe alors aux récepteurs des cellules gonadotropes qui libèrent à leur tour deux glycoprotéines, la LH et la FSH. Ces deux gonadotrophines sont sécrétées de manière pulsatile dans la circulation générale et sont transportées jusqu'aux testicules, où elles stimuleront les fonctions exocrines et endocrines de la gonade (Tachdjian *et al.*, 2016). La testostérone et la FSH sont nécessaires au bon fonctionnement de la spermatogenèse. Dans les tubules séminifères, les cellules de Sertoli sont les seules à posséder des récepteurs pour la testostérone et la FSH. Par conséquent, ces cellules sont les cibles principales des signaux hormonaux qui régulent la spermatogenèse (Skinner, 2005). Les cellules de Sertoli transduisent les signaux de la testostérone et de la FSH et produisent ainsi des facteurs cruciaux pour les cellules germinales à mesure que celles-ci mûrissent vers le stade de spermatozoïde (Walker & Cheng, 2005).

## B. Spermatogenèse et messages hormonaux

### 1. Régulation de la spermatogenèse par les androgènes

La LH est une glycoprotéine composée de deux sous-unités, LH $\alpha$  et LH $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est similaire à celle de la FSH. C'est la sous-unité  $\beta$  qui donne les propriétés spécifiques à l'hormone. La LH se lie au récepteur LHR, présent à la surface des cellules de Leydig, et stimule la production des androgènes dont la testostérone (Figure 17). L'action des androgènes est médiée par le récepteur aux androgènes, AR, un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs aux stéroïdes qui est exprimé par les cellules de Leydig, les cellules peritubulaires, les cellules de Sertoli mais aussi les cellules endothéliales (Smith & Walker, 2014). Ainsi, la signalisation médiée par la testostérone est constitutivement active dans ces cellules. L'expression de AR dans les cellules de Sertoli est quant à elle cyclique car fonction du stade de l'épithélium séminifère. Chez l'homme, AR ne s'exprime pas dans les cellules de Sertoli fœtales. Il n'est exprimé au sein de ces cellules qu'à l'âge de 5 mois après la naissance (3-5 jours après la naissance chez les souris) (Smith & Walker, 2014). La testostérone agit comme un facteur paracrine et diffuse vers les tubes séminifères où elle se fixe aux AR des cellules de Sertoli, dès lors qu'ils sont exprimés, et induit les réponses nécessaires pour favoriser la spermatogenèse (Figure 17).

Des études ont montré que l'absence de testostérone ou de AR engendre un arrêt précoce de la spermatogenèse, au stade spermatide (Yeh *et al.*, 2002, Chang *et al.*, 2004). L'absence de la



signalisation médiée par la testostérone et AR a montré un défaut de l'expression de gènes importants pour la spermatogenèse (AMH, androgen-binding protein (ABP), cyclin A1 et Sperm-1) (Chang *et al.*, 2004) et la perturbation de l'expression de 25 protéines, impliquées dans le métabolisme de l'oxydation, l'épissage, l'apoptose et la division méiotique (Smith & Walker, 2014). La testostérone est en effet requise pour des processus cruciaux de la spermatogenèse : maintien de la structure et du dynamisme de la barrière hémato-testiculaire, différenciation terminale des cellules haploïdes, adhésion des spermatides allongées aux cellules de Sertoli et libération des spermatozoïdes testiculaires (Meng *et al.*, 2005, Yan *et al.*, 2008). L'absence de testostérone ou la perte fonction de AR à l'état hypomorphe ont tous deux été rapportés associés au détachement prématuré des spermatides rondes et allongées des cellules de Sertoli (O'Donnell *et al.*, 1996, Holdcraft & Braun, 2004). En absence de AR, l'expression des composants des jonctions serrées (occludine, claudine 11 et 3) est fortement diminuée (Meng *et al.*, 2005).

La transmission du signal de la testostérone par le AR se fait selon deux voies : classique et non classique. La voie classique est caractérisée par l'interaction de la testostérone avec le AR et leur séquestration dans le cytoplasme par les protéines HSP (heat shock proteins). Ceci induit le changement conformationnel du récepteur et son détachement des protéines HSP. Le AR associé à la testostérone est alors transféré dans le noyau où il pourra agir sur différentes séquences régulatrices de l'ADN appelées ARE (androgen response elements) et réguler l'expression de gènes par le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs. La signalisation dite non classique est régulée par l'interaction du complexe testostérone/AR avec la tyrosine kinase Src (proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) qui phosphoryle alors EGFR (epidermal growth factor). Il s'en suit l'activation de la cascade MAP kinase (RAF, MEK et ERK), de la kinase p90Rsk et enfin la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB. La libération de spermatozoïdes matures à partir de cellules de Sertoli est régulée par les membres de la famille Src kinase.

Ces résultats démontrent que la testostérone régule la spermatogenèse en modulant en partie l'environnement des tubes séminifères (Smith & Walker, 2014). Chez la souris, les études d'inactivation des gènes codant pour la testostérone et/ou le AR ont permis d'établir une liste des gènes cibles de la testostérone. Néanmoins, de nombreux événements moléculaires et cellulaires régulés par la testostérone restent à caractériser (Smith & Walker, 2014). La testostérone va moduler sa propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire (Figure 17).

## 2. FSH et spermatogenèse

L'hormone FSH se compose de deux chaînes FSH $\alpha$  et FSH $\beta$ . Le récepteur de la FSH (FSHR) est un récepteur à 7 segments transmembranaires couplé aux protéines G, qui agit principalement par stimulation de l'adénylyl cyclase (AC) cellulaire. Le récepteur FSHR interagit avec les segments C-terminaux et d'autres boucles des sous-unités FSH $\alpha$  et FSH $\beta$ , et change alors de conformation, adoptant une conformation rigide requise à sa signalisation. Le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule adulte détermine à la fois la taille des testicules et la production quotidienne



de spermatozoïdes. Les cellules de Sertoli prolifèrent durant la vie fœtale, néonatale ou durant la période péri-puberaire selon les espèces (Sharpe *et al.*, 2003). En parallèle à cette prolifération des cellules de Sertoli, une augmentation des récepteurs à la FSH est observée. Le lien de cause à effet entre ces deux évènements n'a pas été clairement établi.

La FSH et l'AMPc intracellulaire sont des régulateurs importants des niveaux d'expression du récepteur de la FSH dans des cellules de Sertoli cultivées et *in vivo* (Maguire *et al.*, 1997). Chez le rat adulte et l'homme, les taux sériques de FSH restent relativement constants. Cependant, l'expression des récepteurs de la FSH dans les cellules de Sertoli varie de manière cyclique au stade de la spermatogenèse (Walker & Cheng, 2005).

Les cellules de Sertoli secrètent de nombreux facteurs de croissance ainsi que des hormones comme l'inhibine B et l'AMH. L'inhibine B inhibe la synthèse et la sécrétion de la FSH par l'adénohypophyse par actions paracrine et autocrine. L'inhibine B constitue également un bon marqueur de l'état de fonctionnement des tubes séminifères.

La liaison de la FSH à son récepteur active de nombreuses voies de signalisation dans les cellules de Sertoli. La signalisation de la FSH induit tout d'abord l'activation de l'AC et augmente les niveaux intracellulaires en AMPc. Les effets de la FSH sont ainsi transmis par l'AMPc. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc stimule la PKA ainsi que l'augmentation de l'afflux de calcium dans les cellules de Sertoli, conduisant à la phosphorylation et donc à l'activation de nombreuses protéines et différents facteurs de transcription, tels que CREB. Une fois phosphorylé, CREB stimule la transcription de gènes clés liés à la fonction des cellules de Sertoli. Au cours de la puberté, la FSH active, par la voie AMPc/PKA, la cascade des kinases MAP et ERK dans les cellules de Sertoli. Cela induit l'activation de facteurs de transcription tels que SRF, c-jun et CREB. L'activation de la kinase ERK est également nécessaire pour l'action mitogène des cellules de Sertoli immatures. Il a été récemment prouvé que la FSH pouvait stimuler la voie phosphatidyl-inositol 3-kinase dans les cellules Sertoli, voie impliquée dans la production de lactate (Lecureuil *et al.*, 2007, Walker & Cheng, 2005). Les cellules de Sertoli synthétisent l'ABP (Androgen Binding Protein), une protéine liant la testostérone et assurant son transport et sa concentration intra-testiculaire sous l'influence de la FSH et de la testostérone (Hansson *et al.*, 1976). L'expression de AR est également induite par la FSH pour permettre à la FSH de réguler la sensibilité des cellules de Sertoli aux androgènes (Sanborn *et al.*, 1991).

Les cellules de Sertoli fournissent au travers de diverses voies de signalisation les facteurs nécessaires pour alimenter le métabolisme des cellules germinales (lactate, transferrine, ABP, pyruvate), des facteurs de croissance (SCF, TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ , IGF-I, FGF, EGF) mais aussi des protéases (cathepsine-L, metalloprotéases), nécessaires à la migration des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère et à la spermiation (Walker & Cheng, 2005, Skinner, 2005) (Figure 15).





## V. Génétique de l'infertilité masculine

### A. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine

La fonction de reproduction est contrôlée par de nombreux processus et gènes faisant d'elle une fonction génétiquement contrôlée. Il n'est donc pas surprenant de constater que les anomalies génétiques causent jusqu'à 30% des cas d'infertilité (Hotaling, 2014). Les hommes présentant une azoospermie, une oligozoospermie et/ou des anomalies de la morphologie ou de la motilité des spermatozoïdes peuvent présenter une (des) anomalie(s) chromosomique(s). L'étude du caryotype a montré que la fréquence des anomalies génétiques est environ dix fois plus élevée chez les hommes infertiles que chez les hommes fertiles (Van Assche *et al.*, 1996).

Les anomalies chromosomiques peuvent survenir *de novo* ou être la conséquence d'un remaniement parental équilibré ou déséquilibré. Elles perturbent le processus d'appariement des chromosomes homologues entraînant un déficit quantitatif et/ou qualitatif de la production de gamètes haploïdes, et la formation de gamètes déséquilibrés. Ces gamètes déséquilibrés se traduisent le plus souvent par la survenue de fausses-couches spontanées ou par la naissance d'enfants porteurs d'anomalies congénitales de sévérité variable.

On distingue les anomalies de nombre des chromosomes, appelées aneuploïdies, caractérisées par une perte (monosomie) ou un gain (trisomie) d'un ou plusieurs chromosome(s); des anomalies de structure des chromosomes (translocation, inversion, insertion, délétion, duplication, chromosome marqueur et en anneau) qui surviennent après cassure(s) suivie(s) d'un ou plusieurs recollements anormaux. Ces anomalies surviennent le plus souvent avant la fécondation au cours de la méiose (paternelle ou maternelle) : toutes les cellules de l'individu sont alors porteuses, l'anomalie est dite homogène. Lorsque l'anomalie survient après la fécondation, lors des divisions mitotiques précoces des blastomères, elle est présente au sein d'une partie des cellules de l'organisme, l'anomalie est dite en mosaïque. Une même anomalie à l'état homogène ou en mosaïque n'aura pas la même incidence sur le phénotype, ce qui correspond à une variabilité clinique. La corrélation génotype-phénotype peut être parfois délicate.

#### 1. Anomalies de nombre des chromosomes

Les anomalies de nombre des chromosomes sexuels chez les hommes sont relativement fréquentes comme par exemple les caryotypes 47,XXY et 47,XYY dont l'incidence est d'environ 1 à 2 naissances vivantes sur 1000 (Morris *et al.*, 2008).

##### 1.1. Patient 47,XXY

Le syndrome de Klinefelter se définit par la présence, chez un individu de phénotype masculin, d'un chromosome X surnuméraire, donnant un caryotype à 47 chromosomes de formule 47,XXY (90% des cas) ou 47,XXY/46,XY dans le cas d'une mosaïque cellulaire

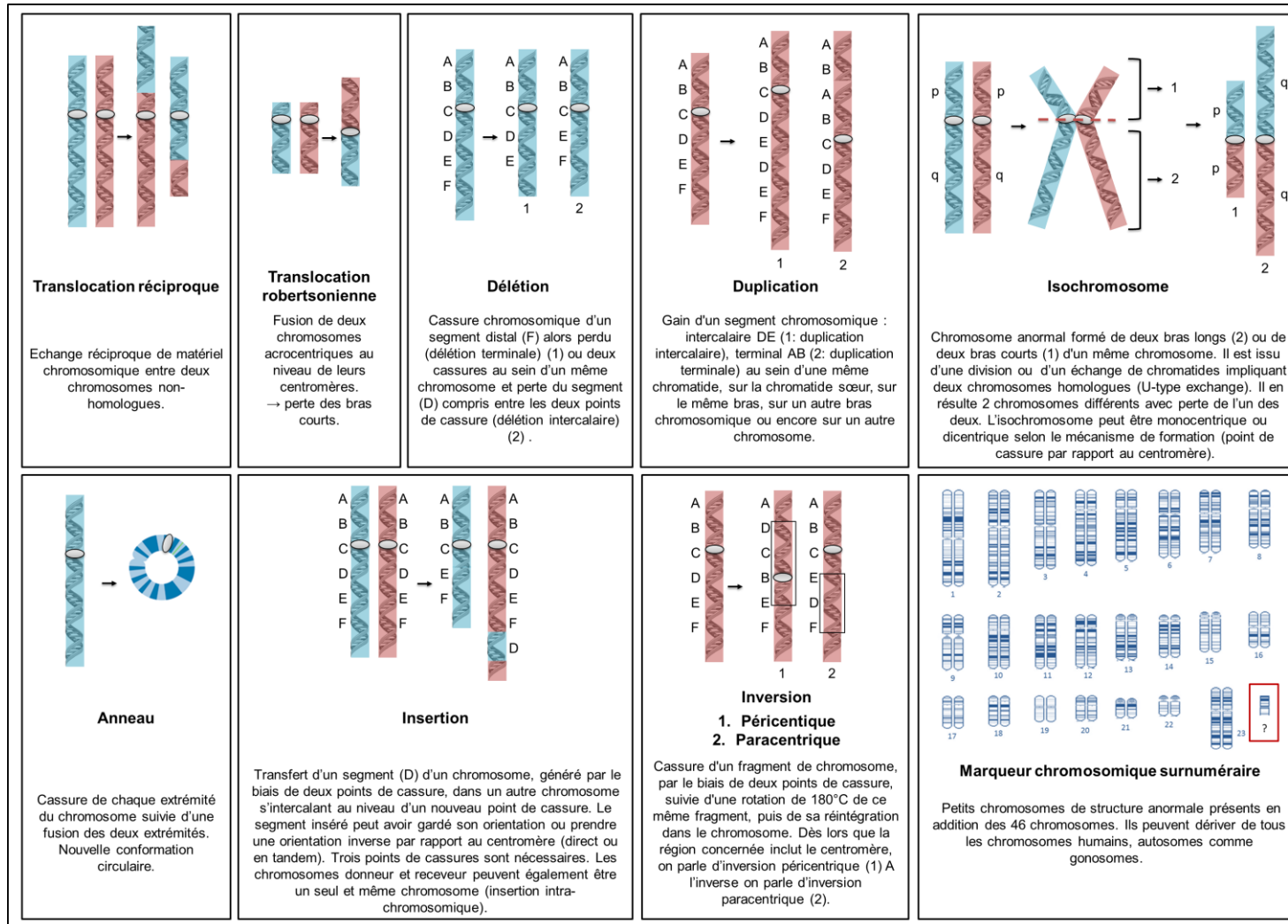


Figure 18 : Principales anomalies chromosomiques de structure résultant de cassure(s) chromosomique(s) suivies d'une reconstitution dans une configuration anormale.

(Barazani & Sabanegh, 2015). Ce syndrome est retrouvé chez 5% des hommes atteints d'oligozoospermie sévère et chez 10% des hommes azoospermes (Visoosak & Graham, 2006). Sur le plan clinique, les hommes atteints présentent une variabilité phénotypique : grande taille et individu longiligne, gynécomastie, faible taux en testostérone, faible pilosité, petits testicules, micropénis, troubles cognitifs mais pas de déficit intellectuel et hypofertilité, voir stérilité (Cocuzza *et al.*, 2013).

Le chromosome X surnuméraire résulte d'une non-disjonction lors de la méiose I paternelle, ou d'une non-disjonction lors de la méiose I ou II maternelle (Oates, 2012). La présence de ce chromosome X surnuméraire dans la lignée germinale provoque une interruption précoce du développement des cellules germinales. Les cas de syndrome de Klinefelter ne sont néanmoins pas tous associés à une infertilité. Le syndrome de Klinefelter en mosaïque est moins sévère et les hommes atteints peuvent avoir une fertilité normale (Cocuzza *et al.*, 2013). En cas d'azoospermie, l'extraction de spermatozoïdes à partir d'une biopsie testiculaire peut s'avérer possible pour la réalisation d'une ICSI (Vloeberghs *et al.*, 2015).

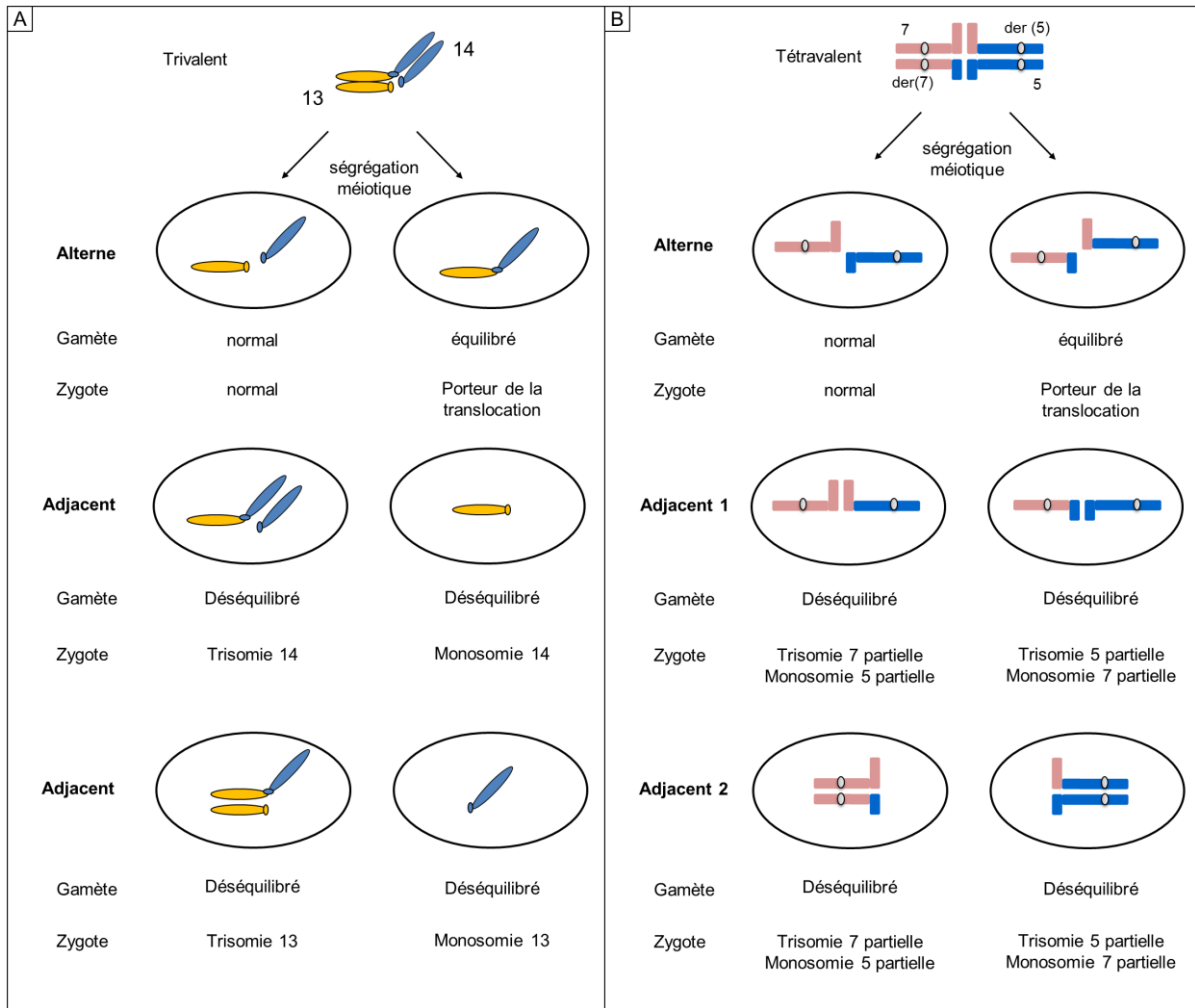
## 1.2. Patients 47,XYY

L'anomalie gonosomique 47,XYY est la plus fréquente après le syndrome de Klinefelter. Quelques études ont rapporté que le phénotype des patients porteurs de cette anomalie gonosomique comprend des anomalies physiques telles qu'une grande taille, mais également un retard d'acquisition du langage et de la lecture ainsi qu'une intolérance à la frustration (Kim *et al.*, 2013b, Margari *et al.*, 2014). Ce syndrome est causé par une non-disjonction chromosomique lors de la méiose II chez l'homme, résultant en un chromosome Y supplémentaire conduisant au caryotype 47,XYY à l'issue de la fécondation. Des événements de non-disjonction mitotique au début du développement embryonnaire chez l'embryon en division peuvent aussi conduire à un mosaïsisme avec un caryotype 47,XYY/46,XY. La biopsie testiculaire montre des anomalies allant du « sertoli cell-only syndrome » ou SCOS à des arrêts précoces de la spermatogenèse (Cocuzza *et al.*, 2013, El-Dahtory & Elsheikha, 2009).

## 2. Formation et appariement des remaniements chromosomiques lors de la méiose

### 2.1. Anomalie de structure des chromosomes

Les anomalies de structure des chromosomes ont également un impact sur la spermatogenèse. Les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies d'un ou plusieurs recollements anormaux. La réalisation du caryotype permet d'identifier ces aberrations chromosomiques. Parmi elles, on dénombre les translocations (robertsoniennes ou réciproques), les inversions, les insertions, les duplications, les délétions, les chromosomes en anneaux chromosomiques ou encore les marqueurs chromosomiques. Ces différentes anomalies de structure sont illustrées dans la Figure 18. Ces réarrangements chromosomiques se produisent approximativement chez 1 naissance vivante sur 200 (Hamerton *et al.*, 1975). Il existe deux types de



**Figure 19** : Illustration des différents modes de ségrégation d'une translocation robertsonienne et d'une translocation réciproque au cours de la méiose. La formation des bivalents ne peut pas s'effectuer normalement et il y a formation de trivalents ou de tétravalents. **(A)** Translocation robertsonienne impliquant la fusion des deux bras long des chromosomes 13 et 14 et modes de ségrégation méiotique possibles. Les ségrégations de type adjacentes conduisent à la génération de gamètes déséquilibrés soit à un risque de trisomie ou de monosomie pour la descendance. **(B)** Translocation réciproque entre les chromosomes 5 et 7 et modes de ségrégation possibles. Les différents modes de ségrégation (2 :2) possibles (alterne, adjacent 1 et adjacent 2) sont représentés.

réarrangements. Les anomalies de structure sont dites équilibrées lorsqu'il n'y a ni perte ni gain de matériel génétique associé. Dans le cas contraire, l'anomalie est dite déséquilibrée. Les anomalies chromosomiques déséquilibrées modifient la dose en gène(s) spécifique(s) d'une région chromosomique donnée et s'accompagnent généralement de signes cliniques selon la localisation et la cartographie en gènes de la région concernée. La présence de telles anomalies chromosomiques de structure peut perturber au cours de la méiose l'appariement des chromosomes homologues ainsi que les recombinaisons homologues indispensables à la progression des cellules germinales vers leur différenciation terminale en gamète. Elles s'accompagnent ainsi le plus souvent d'un trouble de la spermatogenèse.

### 2.1.1. Les translocations

Les anomalies de structure les plus fréquentes sont les translocations robertsoniennes, qui résultent de la fusion des chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) au niveau de leur centromère ou de leur bras court (Figure 18) (Zhao *et al.*, 2015b). Chez l'homme, ces cinq chromosomes ont un très petit bras court constitué d'hétérochromatine et de régions organisatrices du nucléole ou NOR. Les gènes présents sur les bras court des chromosomes acrocentriques sont hautement redondants et codent pour des ARN ribosomiaux (Birch & Zomerdijk, 2008). Ces gènes étant présents en plusieurs exemplaires dans le génome, la perte du bras court d'un chromosome acrocentrique ne présente donc pas de conséquence clinique. Les individus porteurs d'une translocation robertsonienne ont ainsi non pas 46 mais 45 chromosomes avec un chromosome alors constitué de la fusion des bras longs de deux chromosomes acrocentriques d'une même paire ou de paires différentes. Au terme de la méiose, les gamètes produits peuvent être porteurs d'une trisomie ou d'une monosomie (Figure 19A) (Zhao *et al.*, 2015b). La translocation robertsonienne impliquant le chromosome 21 augmente la probabilité d'avoir un enfant atteint de trisomie 21 qui possédera trois exemplaires du chromosome 21 dont l'un est attaché à un autre chromosome acrocentrique hérité du parent porteur. Seule la configuration alterne peut contribuer à la génération de gamètes équilibrés. Les produits de fécondation qui héritent d'un dérivé déséquilibré du chromosome 13 (trisomie 13) peuvent être viables alors qu'aucune des autres possibilités de déséquilibres (trisomies 14, 15 et 22 et toutes les monosomies) n'est viable (Zhao *et al.*, 2015b).

La translocation réciproque survient lorsque deux fragments de deux chromosomes différents s'échangent. Il s'agit d'une anomalie relativement fréquente qui touche 1 nouveau-né sur 500 (Mackie Ogilvie & Scriven, 2002). La nécessité d'apparier des régions homologues lors de la méiose impose la formation d'une figure d'appariement particulière en forme de croix appelée tétravalent, comprenant les 4 chromosomes des deux paires concernées (Figure 19B). Parmi les produits méiotiques résultant, deux seulement sont normaux ou équilibrés (Figure 19B). La ségrégation sera équilibrée si les deux chromosomes non-remaniés migrent ensemble vers le même pôle et les deux remaniés vers l'autre. On obtient un gamète normal et un gamète porteur de la translocation équilibrée. On parle alors de ségrégation alterne. Les ségrégations de type adjacentes sont responsables de la formation de gamètes non équilibrés (Figure 19). En fonction du déséquilibre



généralisé, le fœtus est viable ou non et la grossesse peut aboutir à une fausse couche. Dans le cas de déséquilibre viable, la grossesse peut se poursuivre jusqu'à son terme mais le risque de retard mental ou d'anomalies malformatives est important. Des ségrégations plus complexes peuvent également avoir lieu. Trois chromosomes peuvent en effet, du fait de l'homologie partagée, migrer ensemble vers le même pôle de la cellule, laissant le dernier chromosome migrer seule vers l'autre pôle. Ces remaniements conduisent en un déséquilibre génomique tel qu'il n'est généralement pas compatible à la vie et donne lieu à un avortement spontané.

### 2.1.2. Les inversions

Les inversions sont des réarrangements plus complexes, le plus souvent équilibrées et qui peuvent ne pas avoir d'incidence sur le phénotype (Figure 18). Néanmoins, il est possible que lors des cassures doubles-brin de l'ADN celles-ci interrompent un gène dont la fonction est essentielle. L'inversion peut alors être létale pour le fœtus ou être associée à des défauts importants chez l'individu porteur. En revanche, les chromosomes d'une inversion s'apparient de manière complexe au cours de la méiose. Ils s'organisent de manière à former une boucle d'inversion (Griffiths *et al.*, 1999). Au cours de la méiose, une anomalie d'appariement des chromosomes dont l'un est inversé peut être à l'origine d'une altération de la méiose.

Il existe deux types d'inversion : paracentrique et péricentrique (Figure 18). Dans le cas d'une inversion paracentrique, il a été rapporté que, lors de leur appariement, les chromosomes homologues ont tendance à former un pont dicentrique par *crossing-over*, reliant deux chromatides de chaque paire chromosomique entre elles. Ceci induit en parallèle la production d'un fragment acentrique qui sera perdu. En anaphase I, la tension qui s'exerce sur les chromosomes conduit à la cassure de ce pont dicentrique et à la génération de deux chromosomes délétés dans leur région terminale pour l'une des chromatides qui le compose. La formation des gamètes haploïdes à l'issue de ces deux chromosomes remaniés conduira, dans la moitié des cas, à la formation de gamètes déséquilibrés non viables (Griffiths *et al.*, 1999).

La présence d'une inversion péricentrique affecte le phénomène d'appariement des chromosomes, en particulier au niveau de la région concernée par l'inversion. En perturbant l'appariement des chromosomes homologues, le processus de *crossing-over* est lui aussi impacté. Le centromère étant cette fois-ci compris dans le fragment inversé, les chromosomes s'apparient et des *crossing-over* s'effectuent de manière conventionnelle. Néanmoins, l'ordre de la séquence en ADN du chromosome concerné par l'inversion péricentrique étant perturbé, les échanges chromatidiens conduisent à des chromosomes porteurs de duplication ou de délétion de différentes régions du chromosome. Les gamètes pourront donc être porteurs de déséquilibres majeurs incompatibles avec la vie. Ainsi, les inversions conduisent le plus souvent à la formation de boucles d'inversion, à la réduction du nombre de recombinaisons homologues, à la production à l'issue de la méiose de gamètes déséquilibrés ou éliminés et de ce fait à une réduction de la fertilité chez l'homme (Griffiths *et al.*, 1999).





### 2.1.3. Les insertions

Les insertions se caractérisent par le transfert d'un segment d'un chromosome donneur, généré par deux points de cassure, dans un chromosome accepteur s'intercalant au niveau d'un nouveau point de cassure (Figure 18). Le segment inséré peut avoir gardé son orientation ou prendre une orientation inversée par rapport au centromère. Ainsi, trois cassures sont nécessaires pour qu'une insertion se produise. Le chromosome donneur et le chromosome receveur peuvent être un seul et même chromosome (insertion intra-chromosomique).

### 2.1.4. Les délétions et les duplications

Les délétions se caractérisent par la perte de matériel chromosomique résultant de la cassure chromosomique d'un segment distal (délétion terminale) ou de deux cassures au sein d'un même chromosome avec perte du segment intermédiaire (délétion intercalaire) (Figure 18). Les délétions peuvent résulter de la mauvaise ségrégation d'une translocation parentale équilibrée, dans le cas d'une délétion terminale ou survenir lors d'erreur de *crossing-over* au cours de la méiose. Elles peuvent aboutir à des anomalies morphologiques ou développementales de sévérité variable. Le tableau clinique des délétions dépend principalement de la quantité de matériel chromosomique perdue, du contenu de la délétion et de la localisation du ou des points de cassure.

Les duplications et les triplications, présence en double et en triple exemplaire d'une région chromosomique, surviennent au sein d'une même chromatide, sur la chromatide sœur, sur le même bras ou un autre bras chromosomique ou encore sur un autre chromosome. Comme pour les délétions, les gains de matériel génétique de certaines régions génétiques peuvent être terminaux ou intercalaires et conduit à des phénotypes spécifiques de sévérité variable (Figure 18).

### 2.1.5. Les marqueurs chromosomiques surnuméraires

Les marqueurs chromosomiques surnuméraires (MCS) sont des petits chromosomes structurellement anormaux qui ne peuvent pas être identifiés facilement par la cytogénétique conventionnelle (Armanet *et al.*, 2015) (Figure 18). Les MCS sont détectés dans 0,043% de la population générale et peuvent être caractérisés pour leur origine chromosomique, leur contenu génétique et leur forme, par des approches de cytogénétique moléculaire (Klein *et al.*, 2012). Ils ont une taille égale ou inférieure à un chromosome 20 d'une même métaphase. La présence de marqueurs chromosomiques peut engendrer une trisomie ou une tétrasomie partielle de certains gènes avec une conséquence phénotypique dépendante des gènes concernés, mais aussi perturber les mécanismes contrôlant la méiose. En effet, il a été rapporté que la présence de marqueurs chromosomiques surnuméraires peut conduire à une sub-fertilité chez les hommes, sans autre symptôme clinique particulier (Manvelyan *et al.*, 2008, Chandley *et al.*, 1975).



### 2.1.6. Les isochromosomes

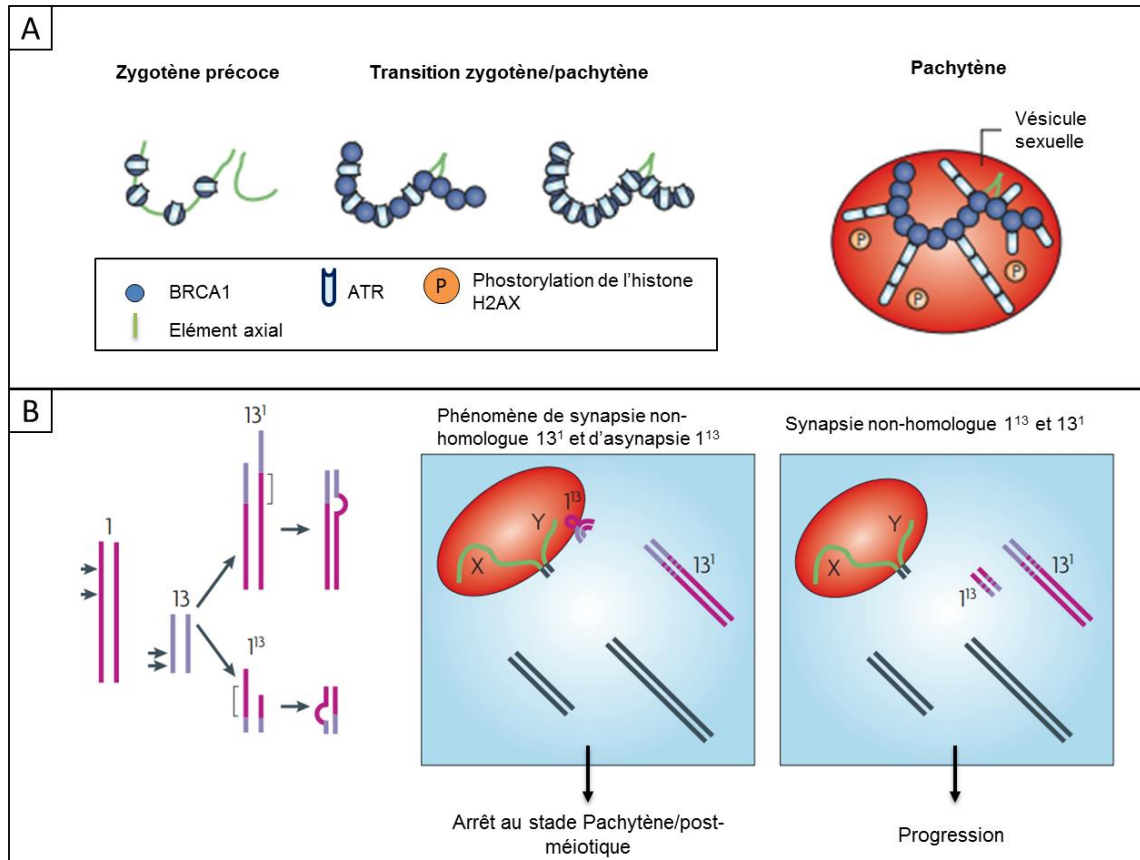
Les isochromosomes correspondent à des chromosomes possédant deux bras de longueur égale soit deux bras homologues fusionnés (Plaiasu *et al.*, 2011). Chaque bras est composé de gènes identiques disposés dans le même ordre en partant du centromère. Ainsi, chez un individu à 46 chromosomes, la présence d'un isochromosome conduit à une trisomie du bras impliqué et à une monosomie du bras perdu (Plaiasu *et al.*, 2011). Les bras chromosomiques les plus fréquemment concernés sont les bras 5p, 8p, 9p, 12p, 18p et 18q (Gersen & Keagle, 2008). Des bras de plus grande taille peuvent aussi être impliqués comme le bras long du chromosome X, isochromosome le plus fréquent qui constitue une variante cytogénétique du syndrome de Turner (Gersen & Keagle, 2008). Il existe deux hypothèses pour expliquer la survenue des isochromosomes : soit une division transversale et non longitudinale lors de la mitose ou de la méiose, soit un échange de chromatides impliquant deux chromosomes homologues (U-type exchange) (Figure 18). Un isochromosome peut être monocentrique ou dicentrique selon le mécanisme de formation.

### 2.1.7. Les chromosomes en anneau

Les anneaux sont des chromosomes anormalement circulaires (Figure 18). Ils résultent d'une cassure télomérique de chaque extrémité du chromosome suivie par une fusion. Ce remaniement implique généralement la perte des segments terminaux. Le phénotype associé est variable, dépend du chromosome impliqué, de la taille et de la localisation de la (des) délétion(s) (Yip, 2015). Par ailleurs, en plus de la délétion initiale associée à la formation de l'anneau, une perte secondaire ou un gain de matériel génétique peut se produire, en raison de l'instabilité du chromosome en anneau (Tumer *et al.*, 2004, Glass *et al.*, 2006). La transmission d'un chromosome en anneau est rare car ces chromosomes sont très instables (Mantzouratou *et al.*, 2009). Seuls quelques cas de transmission de parent à enfant ont été documentés (Kosztolanyi *et al.*, 1991). Des chromosomes en anneau dans lesquels aucune perte significative de matériel génétique n'est apparente, ont été décrits chez des sujets asymptomatiques (Vermeesch *et al.*, 2002). Dans ce cas, au cours de la gamétogenèse, l'absence d'échange entre les chromatides sœurs permet une séparation normale des chromatides de l'anneau pendant l'anaphase (Yip, 2015).

### 2.2. Les remaniements chromosomiques complexes

Les remaniements chromosomiques complexes (RCC) comportent au moins trois points de cassure de deux chromosomes ou plus. Les porteurs de RCC équilibrés peuvent avoir un phénotype normal mais ils présentent un risque d'infertilité et un risque pour la descendance avec une incidence de fausses couches spontanées plus élevée. Leur découverte se fait le plus souvent lors de l'exploration de troubles de la reproduction. Les porteurs de RCC équilibrés sont également prédisposés à avoir un enfant porteur d'un réarrangement déséquilibré par mal ségrégation d'un (des) chromosome(s) dérivé(s), ou par la formation d'un chromosome recombinant (Kim *et al.*, 2011). Dans 70% des cas, ces RCC surviennent *de novo* avec une origine généralement paternelle. Ces



**Figure 20** : Mécanisme d'inactivation des chromosomes sexuels (MSCI) et perturbation de ce processus au cours de la méiose. **(A)** Recrutement des protéines BRCA1, ATR et H2AX et formation de la vésicule sexuelle. **(B)** Remaniement chromosomique et interaction avec la vésicule sexuelle. L'exemple d'une double translocation hétérozygote (points de cassure indiqués par des flèches) impliquant les chromosomes 1 et 13. Une synapsie partielle des chromosomes remaniés ( $1^{13}$ ) conduit à la formation d'une boucle de matériel chromosomique non-apparié qui interfère avec la vésicule sexuelle et perturbe le bon déroulement de la méiose (d'après Burgoyne *et al.*, 2009).

RCC ont une origine familiale dans 30% des cas, avec une transmission de l'anomalie qui est majoritairement d'origine maternelle. Néanmoins, quelques rares cas de transmission de RCC paternel ont été observés (Grasshoff *et al.*, 2003).

### 3. Anomalie chromosomique et défaut de formation de la vésicule sexuelle

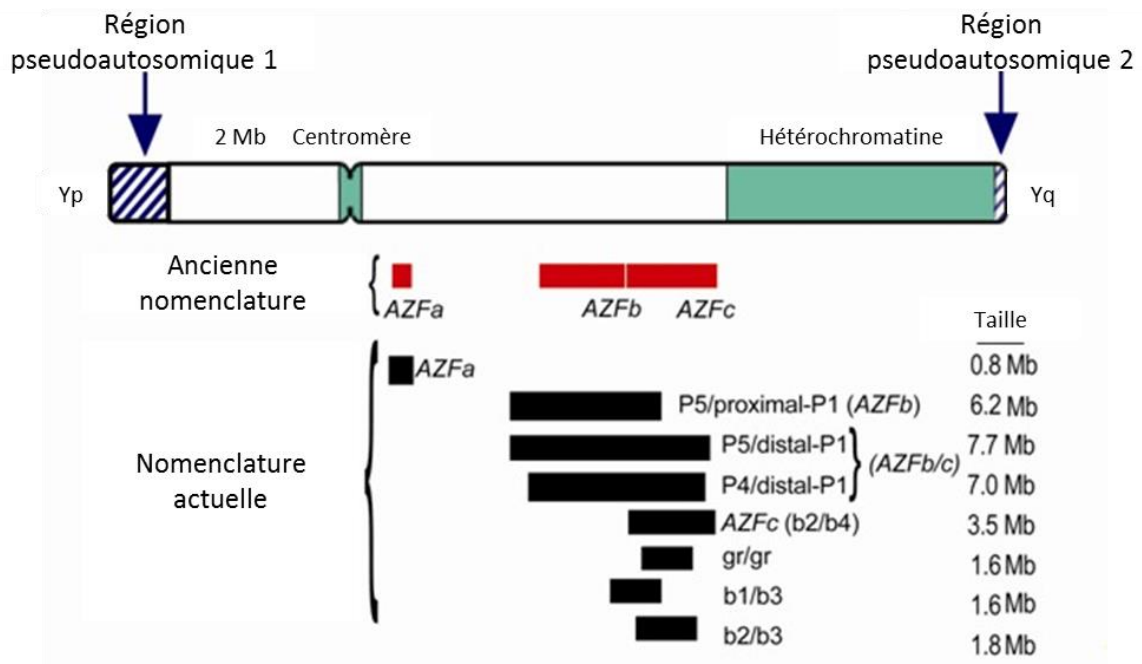
Au cours de la spermatogenèse, et plus précisément au stade pachytène du spermatocyte primaire, les régions chromosomiques non-appariées ou présentant une asynapsie subissent un processus d'inactivation de la transcription appelé « meiotic silencing of unsynapsed chromatin » ou MSUC faisant intervenir des protéines spécifiques telles que BRCA1 (DNA repair associated; impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN), la kinase ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related; recrutée au niveau des régions non-appariées par BRCA1) et  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X; impliquée dans à la fois dans la réparation des DSB et dans le « silencing » des régions non-appariées) (Burgoyne *et al.*, 2009, Homolka *et al.*, 2012) (Figure 20A). Lors de la méiose, les chromosomes X et Y s'apparient uniquement grâce à leurs régions pseudo-autosomiques, restant ainsi majoritairement non-appariées (Burgoyne *et al.*, 2009, Homolka *et al.*, 2012). Ce phénomène se manifeste par la formation de la vésicule sexuelle, un compartiment nucléaire à part comprenant les chromosomes X et Y à l'état condensé (Burgoyne *et al.*, 2009, Homolka *et al.*, 2012, Solari, 1974) (Figure 20A). Les chromosomes sexuels, subissent ainsi un cas particulier de MSUC appelé inactivation méiotique des chromosomes sexuels (MSCI : meiotic inactivation of sex chromosomes). Les protéines BRCA1, ATR et  $\gamma$ H2AX sont également impliquées dans ce processus.

La présence d'un remaniement chromosomique perturbe le processus de synapsie des chromosomes homologues impliqués. Ces régions non-appariées semblent être attirées vers les chromosomes X et Y dans la vésicule sexuelle avec lesquels elles ont un contact étroit, par un mécanisme encore inconnu (Figure 20B). Ces régions autosomiques partiellement inactivées interfèrent ainsi avec le processus MSCI, perturbe l'inactivation de la transcription des chromosomes sexuels et il en résulte l'arrêt précoce de la méiose (Homolka *et al.*, 2012).

### 4. Mécanisme de formation des remaniements chromosomiques

Plusieurs mécanismes majeurs ont été proposés pour expliquer l'apparition de réarrangements chromosomiques dans le génome humain. Le mécanisme NAHR (Non-allelic homologous recombination) et les mécanismes de réplication sont principalement responsables des réarrangements chromosomiques (Liu *et al.*, 2012).

Le mécanisme NAHR repose sur l'existence de nombreuses séquences d'ADN répétées dans le génome, de quelques milliers de paires de bases, suffisamment similaires (paralogues) et capables de s'aligner. Ces séquences sont appelées low-copy repeats (LCR), ou duplications segmentaires et induisent une récurrence d'apparition des réarrangements chromosomiques (Liu *et al.*, 2012). Ces LCR doivent être d'une longueur d'homologie suffisante pour agir comme substrats de recombinaison. Un grand nombre de réarrangements récurrents et de même taille ont ainsi été



**Figure 21** : Représentation schématique du chromosome Y illustrant la position approximative des régions AZFa, AZFb et AZFc initialement définies et la position précise des microdélétions récurrentes actuellement définies sur la base des séquences palindromiques flanquantes (adapté de Silber, 2012).

observés. Ainsi, lors de la méiose, des LCR peuvent s'aligner (mésapariement) et deviennent alors le lieu de recombinaison homologue non-allélique. Si des *crossing-overs* surviennent entre des LCR, cela génère des réarrangements génomiques dans les cellules en cours de méiose. Lorsque les deux LCR sont situés sur le même chromosome et en orientation directe, les chromosomes résultant de cette recombinaison seront tous deux déséquilibrés, l'un présentant une duplication, et l'autre une délétion. Quand les LCR sont sur le même chromosome mais dans une orientation opposée, la NAHR entraîne alors une inversion du fragment flanqué par les LCR. La NAHR situé entre des séquences répétées de différents chromosomes peut entraîner une translocation chromosomique (Liu *et al.*, 2012). Une NAHR peut également se produire au niveau de LCR paralogues situés sur des chromatides sœurs conduisant à la formation d'un isochromosome. Certaines NAHR rares peuvent aussi être médiées par des séquences répétitives hautement homologues (LINE) associées cette fois-ci à des réarrangements non récurrents. Des structures capables d'induire des ruptures double-brin de l'ADN (palindromes, minisatellites et transposons d'ADN) ont souvent été localisés près des « points chauds » de NAHR, indiquant un lien potentiel entre NAHR et cassures double-brin de l'ADN (Liu *et al.*, 2012). Une NAHR peut également se produire au cours de la mitose, ce qui entraîne une mosaïque cellulaire dans les tissus. Les mécanismes de réplication sont quant à eux associés à des remaniements chromosomiques non récurrents (Liu *et al.*, 2012).

## B. Microdélétions des régions AZF du chromosome Y

Le chromosome Y joue un rôle majeur dans la fertilité masculine, comme évoqué dans la partie I.B du présent chapitre. Les microdélétions des régions AZF (Azoospermia Factor) portées par le bras long du chromosome Y (Yq11) représentent une des causes génétiques les plus fréquentes d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère (Coutton *et al.*, 2012). L'atteinte est variable et dépend de la taille et de la région concernée (microdélétion complète ou partielle) (Coutton *et al.*, 2012, McElreavey *et al.*, 2006). Leur recherche fait partie du bilan d'infertilité des atteintes sévères de la spermatogenèse. Chaque région AZF contient plusieurs gènes intervenant à différents stades de la spermatogenèse (Ravel *et al.*, 2006). Ces régions, nommées AZFa, AZFb et AZFc, comportent de nombreuses séquences répétées favorisant ainsi la survenue de microdélétions récurrentes (Figure 21). Ces séquences répétées peuvent être de plusieurs types : éléments rétroviraux, larges séquences palindromiques de répétitions en tandem ou bien plusieurs gènes en copies multiples (Ravel *et al.*, 2006). La plupart de ces délétions surviennent *de novo* et concernent une ou plusieurs de ces régions, AZFc étant la région la plus souvent délétée. Une quatrième région dénommée AZFd a également été identifiée, et est localisée entre les régions AZFb et c (Kent-First *et al.*, 1999). Étant donné que les microdélétions ont tendance à se produire entre de grandes répétitions palindromiques, une nomenclature plus appropriée a été proposée, basée sur le nom de ces répétitions flanquantes (Yen, 2001, Repping *et al.*, 2002) (Figure 21).

La région AZFa comprend les gènes *DFFRY*, *USP9Y*, *DBY*, *UTY* et *TB4Y* (Krausz & Fellous, 2003). Des délétions intercalaires ou terminales de la région AZFa, sont plutôt rares, et généralement associées au diagnostic sévère de Sertoli-cell-only syndrome (SCOS) caractérisé par



Chromosome sexuel DSD	46,XY DSD		46,XX DSD					
45,X (Syndrome de Turner et variants)	<b>Désordre du développement testiculaire :</b>	<b>Défaut de synthèse ou d'action des androgènes :</b>	<b>Désordre du développement ovarien :</b>	<b>Excès en androgènes :</b>				
47,XXY (syndrome de Klinefelter et variants)					Dysgénésie gonadique complète (syndrome de Swyer)	Défaut dans la biosynthèse des androgènes (e.g. déficience 17-hydroxystéroïde déshydrogénase, déficience 5 $\alpha$ réductase, mutation du gène <i>STAR</i> )	DSD Ovotestis	Fœtal (déficience en 21 hydroxylase, déficience en 11 hydroxylase)
45,X/46,XY (dysgénésie gonadique mixte, DSD ovotestis)					Dysgénésie gonadique partielle	Défaut dans l'action des androgènes (CAIS, PAIS)	DSD testiculaire ( <i>SRY</i> <sup>+</sup> , dup <i>SOX9</i> )	Fœto-placentaire (déficience en aromatase, POR)
46,XX/46,XY (chimérique, DSD ovotestis)					Régression gonadique	Défauts du récepteur de la LH (hypoplasie des cellules de Leydig, aplasie)	Dysgénésie gonadique	Maternel (lutéome, exogène)
	DSD Ovotestis	Défauts de l'AMH ou du récepteur de l'AMH (syndrome de persistance des canaux de Müller)		Autres (extrophie cloacale, atrésie vaginale, MURCS, autres syndromes)				
		Autres (hypospade sévère, extrophie cloacale)						

**Tableau 3 :** Proposition de classification des désordres du développement sexuel (Hughes *et al.*, 2006). CAIS : complete androgen insensitivity syndrome; DSD : désordres du développement sexuel; PAIS : partial androgen insensitivity syndrome; POR : cytochrome p450 oxidoreductase; MURCS : Müllerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia; STAR : steroidogenic acute regulatory protein.

l'absence totale de cellules germinales dans les tubes séminifères et se manifestant par une azoospermie (Siffroi *et al.*, 2003, Ravel *et al.*, 2006). La région AZFa est flanquée d'éléments répétés de 10kb de long favorisant ainsi les événements de recombinaison homologue (Kamp *et al.*, 2000). La région AZFa contient trois principaux gènes dont l'absence ou la mutation provoque une insuffisance testiculaire, *USP9Y*, *DBY* et *UTY* (Foresta *et al.*, 2000).

La partie proximale de la région AZFb se compose de longues séquences répétées organisées en palindromes, ce qui favorise la recombinaison (Ferlin *et al.*, 2003). Un certain nombre de gènes sont présents dans cet intervalle, et la plupart d'entre eux ont une expression spécifique dans les testicules. Parmi eux, les gènes *RBM1Y*, *CDY*, *XKRY*, *SMCY* et *EIF1AY* (Krausz & Fellous, 2003). Initialement considérée comme une région distincte de la région AZFc, la région AZFb chevauche en réalité la région AZFc. De sorte que, les délétions complètes AZFb emportent la partie proximale (1,5Mb) de la région AZFc (délétion AZFb+c) (Repping *et al.*, 2002). Des délétions dans région AZFb sont associées à un arrêt précoce de la méiose (Siffroi *et al.*, 2003).

Les délétions complètes AZFc sont impliquées dans près de 10% des cas d'infertilité masculine sévère (Ravel *et al.*, 2006). Au sein de la région AZFc, les gènes de la famille *DAZ* ainsi que les gènes *CDY* et *BPY2* ont été cartographiés. Les délétions AZFc (de même que les duplications en tandem ou les inversions) résultent de recombinaisons homologues entre des amplicons présents en nombre élevé (six familles distinctes d'amplicons) dans cette région (Ravel *et al.*, 2006). Les délétions de la région AZFc sont associées à une large gamme de phénotype (syndrome SCOS, réduction des cellules germinales et arrêt de maturation des cellules germinales) (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Comme mentionné précédemment, les délétions supprimant simultanément une partie des régions AZFb et AZFc ont également été rapportées. Elles résultent d'une recombinaison homologue et sont associées à une azoospermie (Yu *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2014).

### **C. Désordres du développement sexuel et infertilité : pathologies du développement gonadique**

Le développement sexuel nécessite l'intervention de multiples gènes, d'hormones et de récepteurs hormonaux qui agissent ensemble. Les troubles du développement sexuel sont des anomalies congénitales dans lesquelles le développement sexuel chromosomique, gonadique ou anatomique est atypique. Les termes d'individus intersexués ou d'hermaphrodite ont longtemps été utilisés pour décrire les nouveau-nés pour lesquels le sexe n'est pas évident à identifier à la naissance. En 2006, ce terme a été remplacé par celui de désordre du développement sexuel (Disorders of Sex Development ou DSD) qui se veut plus inclusif puisqu'il regroupe toutes les formes atypiques de développement de l'appareil génital et de la différenciation sexuelle, dont les situations intersexuées, et les troubles génétiques et endocriniens (Hughes *et al.*, 2006). Ils sont classés selon trois grands groupes : les aneuploïdies affectant les chromosomes sexuels, les individus 46,XY et les individus 46,XX (Tableau 3). Des nombreuses études de cas de patients DSD mais également de modèles animaux ont permis d'identifier de nombreux gènes essentiels au processus de différenciation sexuelle. Dans cette partie nous développerons uniquement les cas de DSD associés

Gène	Position	Anomalie	Phénotype	Histologie testiculaire	Analyses hormonales	Références
SOX9	17q24.3	46,XX,dup(17)(q23.1q24.3)/46,XX	Phénotype masculin normal, hypospade sévère	/	/	Huang <i>et al.</i> , 1999
		Duplication du gène	Phénotype masculin normal (organes génitaux internes et externes), petits testicules	Testicules	Taux en LH, FSH, testostérone et AMH normaux	Lee <i>et al.</i> , 2014
		Duplication des régions régulatrices	Phénotype masculin normal, gynécomastie bilatérale, azoospermie	/	Taux en testostérone bas et en FSH et LH élevés	Vetro <i>et al.</i> , 2015
			Enfant (8 mois), organes génitaux externes ambiguës (clitoris hypertrophique, méat et sinus urogénital unique, absence d'utérus, atrésie vaginale et deux gonades ovoïdes dans le canal inguinal)	Ovotestis	Taux en LH, testostérone et AMH bas	
			Phénotype masculin normal, azoospermie	↓ des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli, atrophie des tubes séminifères, absence de spermatogenèse	/	Cox <i>et al.</i> , 2011
			Phénotype masculin normal, azoospermie	/	/	Kim <i>et al.</i> , 2015
		Triplication des régions régulatrices	Phénotype masculin, gynécomastie bilatérale légère, hypotrophie testiculaire bilatérale	Aplasia de cellules germinales	Taux en testostérone bas et en FSH et LH élevés	Vetro <i>et al.</i> , 2011
SOX3	Xq27.1	Duplication	Phénotype normal, hypospade	Non rapporté	Taux en LH, FSH et testostérone normaux	Moalem <i>et al.</i> , 2012
SOX10	22q13.1	Duplication 22q	Phénotype masculin normal, hypospade, yeux proéminants, hypertélorisme, épicanthus, sourcil droit gris, oreilles bas implantées et hypotonie	Non rapporté	Non rapporté	Seeherunvong <i>et al.</i> , 2004
			Organes génitaux externes ambigus (petit phallus, sac scrotal droit contenant une petite structure, sac scrotal gauche avec une absence de structure palpable et tissu pigmenté)	Un testicule et un ovaire	Taux en testostérone bas	Aleck <i>et al.</i> , 1999
		Triplication 22q	Fœtus (37 SG), malformations sévères, organes génitaux externes masculins (scrotums fusionnés, micropénis), organes génitaux internes féminins (utérus et vagin)	Testicules	Taux en testostérone bas	Nicholl <i>et al.</i> , 1994
RSPO1	1p34.3	Délétion du gène	Phénotype masculin normal, hyperkératose palmoplantaire	Non rapporté	Non rapporté	Parma <i>et al.</i> , 2006
WNT4	1p36.12	Mutation homozygote	Nouveau-né masculin, pénis déformé/hypospade, syndrome SERKAL	Ovotestis /testicule	Non rapporté	Mandel <i>et al.</i> , 2008

Tableau 4 : Génétique et phénotype des hommes 46,XX-SRY-négatif DSD avec tissu testiculaire.

à une infertilité masculine. Les hommes sont phénotypiquement et/ou génétiquement masculins mais rencontrent des problèmes de fertilité associés à un défaut de la différenciation sexuelle. L'aneuploïdie des chromosomes sexuels, les anomalies de structure et les variations du nombre de copies de l'ADN sont des causes génétiques communes aux DSD et à l'infertilité.

#### 1. Les hommes 46,XX DSD

Le syndrome homme 46,XX est une pathologie rare observée avec une incidence de 1/25000 nouveau-nés phénotypiquement masculins. Ce syndrome présente un éventail de troubles qui affectent les voies génito-urinaires et le système endocrinien-reproducteur, allant du développement partiel à l'ambiguïté des organes génitaux masculins, en combinaison avec une masculinisation complète ou incomplète. Ces cas sont généralement diagnostiqués après la puberté lorsqu'un hypogonadisme, une gynécomastie et/ou une infertilité sont constatés. Dans approximativement 80% des cas, on retrouve chez ces individus la présence du gène *SRY* dans le génome. Le gène *SRY* s'est transloqué sur l'un des chromosomes X à la suite d'une recombinaison dans les régions distales du bras court des chromosomes X et Y lors de la méiose paternelle ou se trouve plus rarement sur un autosome. Ces hommes 46,XX-*SRY*-positif ont généralement un phénotype masculin à la naissance et sont amenés à consulter pour infertilité après la puberté (Li *et al.*, 2014b). Ces hommes présentent une azoospermie pouvant être aussi associée à une atrophie testiculaire et à une ambiguïté des organes génitaux externes (Chiang *et al.*, 2013).

Le gène *SRY* active l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription en aval impliqués dans la formation des testicules. La surexpression du gène *SOX9*, cible directe du gène *SRY*, peut induire un développement masculin en l'absence de *SRY*. Des duplications du gène *SOX9* (Lee *et al.*, 2014) ou de sa région régulatrice *TESCO* en amont du gène (Xiao *et al.*, 2013, Benko *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2015, Hyon *et al.*, 2015) ont été rapportées chez des hommes 46,XX-*SRY*-négatif. Des études d'homologie de séquences ont montré que le gène *SRY* était très probablement issu d'une évolution du gène *SOX3*, qui chez les humains est situé dans la région Xq27.1. Les mutations perte de fonction de *SOX3* n'affectent pas la détermination du sexe chez les souris ou les humains. Cependant, l'expression ectopique de *SOX3* dans la gonade bipotentielle chez l'homme (comme chez la souris) entraîne une régulation positive de *SOX9*, résultant en un développement testiculaire chez des individus 46,XX-*SRY*-négatif (Moalem *et al.*, 2012).

Lorsque le tissu testiculaire se différencie à partir d'une gonade 46,XX-*SRY*-négatif, deux mécanismes différents peuvent être envisagés : l'augmentation de l'expression des gènes pro-testiculaires ou l'absence d'expression de gènes pro-ovariens/anti-testiculaires (Parma *et al.*, 2006, Mandel *et al.*, 2008). De nombreux autres cas 46,XX-*SRY*-négatif ont été identifiés chez l'homme et sont présentés dans le tableau 4. Bien qu'aucun sujet DSD 46,XX-*SRY*-négatif associé à une sur-expression du gène *DMRT1* n'ait encore été identifié, la surexpression de *Dmrt1* dans les gonades fœtales de souris transgéniques XX est suffisante pour diriger le développement testiculaire et la différenciation sexuelle masculine (Zhao *et al.*, 2015a). Comme le résume le tableau 4, il existe dans certains cas plusieurs phénotypes causés par une duplication/triplication du gène et/ou de la région

Anomalie	Gène	Position	Phénotype masculin DSD	Références	
<b>46,XY DSD et anomalie du développement gonadique</b>					
Gènes impliqués dans la différenciation de la gonade bipotentielle	Mutation perte de fonction	<i>SF1</i>	11q13.1	Dysgénésie gonadique, anorchie bilatérale, micropénis, syndrome de régression testiculaire, insuffisance rénale et tumeur de Wilms; Syndrome de Denys-de Drash	Philibert <i>et al.</i> , 2007
	Mutation perte de fonction	<i>WT1</i>	11p13	Hypospade sévère, cryptorchidie, dysgénésie gonadique	Köhler <i>et al.</i> , 2011
Gènes impliqués dans le développement testiculaire	Délétion	<i>WWOX</i>	16q23.1	Dysgénésie gonadique, organes génitaux ambigus, testicule immature	White <i>et al.</i> 2012
	Gène tronqué	<i>FOG2</i>	8q23	Dysgénésie gonadique partielle	Finelli <i>et al.</i> , 2007
	Mutation perte de fonction	<i>ATRX</i>	Xq21.1	Dysgénésie gonadique, anomalies génitales (hypospade, micropénis), $\alpha$ -thalassémie, déficience intellectuelle et psychomoteur sévères, dysmorphie faciale	Ahmed <i>et al.</i> , 2013
	SNP perte de fonction	<i>TSPYL1</i>	6q22.1	Dysgénésie gonadique, ambiguïté des organes génitaux, signes de dysfonctionnement viscéral en début de vie	Puffenberger <i>et al.</i> , 2004 Vinci <i>et al.</i> , 2009
	Mutation perte de fonction	<i>MAP3K1</i>	5q11.2	Dysgénésie gonadique partielle à complète	Ahmed <i>et al.</i> , 2013 Pearlman <i>et al.</i> , 2010
	Mutation perte de fonction	<i>GATA4</i>	8p23.1	Ambiguïté des organes génitaux (micropénis, hypospadias, hernie inguinale bilatérale contenant des gonades, fusion labioscrotale), azoospermie	Lourenço <i>et al.</i> , 2011 Ahmed <i>et al.</i> , 2013
<b>46,XY DSD associé à un défaut de synthèse du cholestérol</b>					
Syndrome de Smith-Lemli-Opitz	Mutation perte de fonction	<i>DHCR7</i>	11q13.4	Faciès typique, retard de croissance, déficience intellectuelle, hypotonie, anomalies du cœur, des poumons, du cerveau, des membres, des organes génitaux et des reins	Ahmed <i>et al.</i> , 2013
<b>46,XY DSD associé à un défaut de synthèse de la testostérone</b>					
Défaut de la différenciation des cellules de Leydig	Mutation perte de fonction	<i>LHCGR</i>	2p21	Hypoplasie des cellules de Leydig, hypovirilisation (micropénis, hypospade, cryptorchidie)	Ahmed <i>et al.</i> , 2013
Défaut des enzymes de synthèse de la testostérone	Mutation perte de fonction	<i>HSD3B2</i>	1p12	Insuffisance surrénalienne, organes génitaux ambigus (hypospade sévère, micropénis), gynécomastie	Mohnach <i>et al.</i> , 2016 Ahmed <i>et al.</i> , 2013
	Mutation perte de fonction	<i>CYP17A1</i>	10q24.33	Hypertension artérielle, alcalose hypokaliémique, ACTH, LH et FSH élevées, virilisation absente ou incomplète des organes génitaux externes (micropénis, hypospade, cryptorchidie)	Mohnach <i>et al.</i> , 2016 Ahmed <i>et al.</i> , 2013
Défaut de la stéroïdogénèse	Mutation homozygote	<i>CYB5A</i>	18q22.3	Différents niveaux de virilisation allant de l'hypospade aux organes génitaux féminins, méthémoglobémie héréditaire de type IV	Ahmed <i>et al.</i> , 2013
Déficience en cytochrome P450 oxydoréductase	Mutation perte de fonction	<i>POR</i>	7q21.11	Phénotype masculin, syndrome d'Antley-Bixler, hyperplasie surrénalienne congénitale, désordre de la stéroïdogénèse, virilisation incomplète des organes génitaux externes (micropénis, hypospade)	Mohnach <i>et al.</i> , 2016
<b>46,XY DSD associé à un défaut du métabolisme de la testostérone</b>					
Déficience en 5 $\alpha$ -réductase type 2	Mutation perte de fonction	<i>SRD5A2</i>	2q23	Phénotype féminin à masculin, défaut de virilisation, organes génitaux externes ambigus, micropénis, hypospade	Mohnach <i>et al.</i> , 2016
<b>46,XY DSD associé à un défaut de l'action des androgènes</b>					
Syndrome d'insensibilité aux androgènes	Mutation perte de fonction	<i>AR</i>	Xq11.2-q12	Masculinisation incomplète des organes génitaux internes et externes, défaut de la spermatogénèse	Mohnach <i>et al.</i> , 2016
<b>46,XY DSD et syndrome de persistance des canaux de Müller</b>					
Défaut de la synthèse d'AMH	Mutation perte de fonction	<i>AMH</i>	19q13.3	Phénotype masculin, cryptorchidie unilatérale, hernie inguinale, azoospermie, malformation des canaux déférents, agénésie de l'épididyme, persistance de reliquats müllériens	Knebelmann <i>et al.</i> , 1991
Défaut de la synthèse d'AMHR2	Mutation perte de fonction	<i>AMHR2</i>	12q13		Imbeaud <i>et al.</i> , 1995 Belville <i>et al.</i> , 2009
<b>46,XY DSD ovotestis</b>					
<b>46,XY DSD formes non classifiées</b>					

Tableau 5 : Anomalies du développement sexuel des hommes 46,XY d'origine génétique.

régulatrice du gène *SOX9* (Huang *et al.*, 1999, Cox *et al.*, 2011, Vetro *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2015, Vetro *et al.*, 2015) et *SOX10* (Nicholl *et al.*, 1994, Aleck *et al.*, 1999, Seeherunvong *et al.*, 2004).

## 2. Les hommes 46,XY DSD

Les hommes 46,XY présentant un DSD peuvent montrer des organes génitaux ambigus, un hypospade à la naissance, un développement anormal des testicules et une réduction voir une absence de production de spermatozoïdes. Certains patients développent des organes reproducteurs féminins tels que le vagin, l'utérus et les trompes de Fallope. Ces développements sexuels atypiques sont causés par des troubles du développement testiculaire ou des troubles impliquant l'hormone masculine, la testostérone. Les différents cas d'homme 46,XY DSD sont résumés dans le tableau 5.

L'analyse endocrine des enfants 46,XY DSD comprend l'évaluation de la fonction testiculaire par des mesures basales en LH, FSH, inhibine B, AMH et en stéroïdes. Les patients 46,XY DSD sont principalement classés en trois groupes étiologiques : les anomalies du développement testiculaire, les anomalies de la synthèse des androgènes, et les anomalies de l'action des androgènes. Certains individus 46,XY DSD présentent des organes génitaux externes ambigus ou ont des organes génitaux féminins complets ou sous-développés. Une persistance de dérivés müllériens peut être observée.

Les dysgénésies testiculaires peuvent être dues à des anomalies de gènes impliqués dans le développement testiculaire (*SF1*, *WT1*, *WBOX*, *FOG2*, *ATRX*, *TSPYL4* et *MAP3K1*) mais aussi à des anomalies chromosomiques (délétion, duplication, point de cassure, mutation) (Puffenberger *et al.*, 2004, Finelli *et al.*, 2007, Philibert *et al.*, 2007, Vinci *et al.*, 2009, Pearlman *et al.*, 2010, Kohler *et al.*, 2011, Lourenco *et al.*, 2011, White *et al.*, 2012, Ahmed *et al.*, 2013). Ces patients présentent, malgré un phénotype masculin, une ambiguïté des organes génitaux souvent associée à la présence d'un micropénis et/ou d'un hypospade (Tableau 5).

Chez les individus 46,XY, les défauts de la différenciation gonadique, de la synthèse ou de l'action des hormones androgènes ou anti-müllériennes entraînent une masculinisation incomplète ou absente (Knebelmann *et al.*, 1991, Imbeaud *et al.*, 1995, Belville *et al.*, 2009, Mohnach *et al.*, 2016) (Tableau 5). L'infertilité est presque toujours présente chez les patients 46,XY DSD en raison d'une insuffisance testiculaire secondaire à une dysgénésie gonadique, à un défaut de synthèse ou d'action de la testostérone, à une cryptorchidie ou à une éjaculation rétrograde (patients atteints d'hypospade périnéale). Dans les formes de DSD les plus modérées, l'azoospermie ou l'oligozoospermie sont constatés. Les techniques d'aide médicale à la procréation ont permis à des patients 46,XY DSD d'avoir une descendance (Katz *et al.*, 1997, Plante & Fritz, 2008).

La détermination et la différenciation sexuelles exigent l'activation équilibrée et séquentielle des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des hormones et de leurs récepteurs. Les connaissances génétiques dans le domaine ont ouvert de nouvelles possibilités diagnostiques. Les tests génétiques de première intention pour les phénotypes DSD restent le caryotype standard et l'amplification par PCR du gène *SRY*.



## D. Gènes et anomalies de la spermatogénèse

La mutation d'un seul gène impliqué dans la différenciation sexuelle peut contribuer au phénotype d'infertilité. Chaque étape conduisant à l'acquisition de la fonction de reproduction chez l'homme fait intervenir l'expression spécifique d'un nombre important de gènes.

### 1. Hypogonadisme hypogonadotrope

La capacité pour l'homme à se reproduire dépend de l'intégrité de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Les facteurs pré-testiculaires influent sur la régulation hormonale normale du testicule. Différentes mutations ont été décrites associées à un hypogonadisme hypogonadotrope congénital (HHC). Les HHC sont classés en 2 catégories dont les formes isolées avec olfaction normale (gènes *GNRHR*, *GNRH1*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3* et *TACR3*) (Young, 2016). Des défauts de la sécrétion ou de l'action de la GnRH par mutation invalidante des gènes *KAL1*, *FGF8*, *FGFR1*, *PROK2*, *PROKR2*, *WDR11*, *CHD7*, *SEMA3A*, *SOX10*, *FEZFA*, *IL17RD* ou *FRF17* sont associées au syndrome de Kallmann (HHC avec anosmie/hyposmie). Ces défauts entraînent une agénésie du bulbe olfactif associé à un défaut de migration des neurones à GnRH de l'épithélium olfactif à l'hypothalamus et sont une cause fréquente d'hypogonadisme chez l'homme (Young, 2016).

Une perturbation des fonctions testiculaires endocrine et exocrine a également été associée à des anomalies de l'action des gonadotrophines hypophysaires affectant les gènes *FSH*, *FSHR*, *LH*, *LHR*, ou encore *PROP1* (Hamada *et al.*, 2013).

Les HHC peuvent s'intégrer dans un contexte d'obésité (mutation dans les gènes *PCSK1*, *LEP*, ou *LEPR*) ou dans une forme syndromique plus complexe avec d'autres signes cliniques : syndrome de CHARGE (anomalies du gène *CHD7*), syndrome de Prader-Willi (perte de la région 15q1.2 d'origine paternelle), déficience en hormones hypophysaires (mutations des gènes *PROP1*, *HESX1*, ou *LHX3*) et syndrome de Barbet-Biedl (*BBS1-19*) (Fraietta *et al.*, 2013).

Il existe également une autre forme de HH, le HH acquis, qui est quant à lui causé par la consommation abusive d'alcool ou de drogues, des lésions hypophysaires, une hyperprolactinémie, des traumatismes encéphaliques etc (Fraietta *et al.*, 2013).

### 2. Atteintes testiculaires de l'infertilité masculine

La spermatogénèse fait intervenir l'expression testiculaire d'un nombre important de gènes dont seuls certains sont à ce jour connus pour être responsables d'infertilité masculine. Des mutations ponctuelles du récepteur des androgènes bloquent l'action de la testostérone et de la DHT dans l'activation de leurs gènes cibles et conduisent ainsi à l'échec de la spermatogénèse.

De nombreuses études chez la souris ont permis de relier des centaines de gènes à l'infertilité et au phénotype d'azoospermie. Ces études donnent un aperçu des mécanismes moléculaires responsables. Seuls certains gènes, en corrélation avec l'infertilité chez la souris, ont pu





être identifiés chez l'homme comme étant associés à un phénotype d'azoospermie par arrêt de la méiose (*HSF2*, *PRM1*, *PRM2*, *SOHLH1*, et *NR51*) (Choi *et al.*, 2010, Ropke *et al.*, 2013, Mou *et al.*, 2013, Imken *et al.*, 2009).

La grande majorité des gènes méiotiques ont été identifiés dans des modèles de levure et murins. Ces découvertes ont fourni de solides preuves des effets des mutations des gènes méiotiques sur la fertilité (Matzuk & Lamb, 2008). Chez l'homme, des gènes particuliers dont l'expression est altérée peuvent perturber l'association et la synapsie des chromosomes, conduisant à des défauts de recombinaison homologue, de réplication de l'ADN et à l'arrêt précoce de la spermatogenèse en raison de l'existence d'un point de contrôle en pachytène (*SYCP3*, *SPO11*, *FKBP6*, *BOULE*, *H2AX* et *REC8*) (Miyamoto *et al.*, 2003, Westerveld *et al.*, 2005, Mori *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008, Griffin *et al.*, 2008, Sanderson *et al.*, 2008, Miyamoto *et al.*, 2006).

### 3. Défaut spécifique des spermatozoïdes

De nombreux hommes ont un pourcentage important de spermatozoïdes avec une morphologie anormale. Les deux types de défauts morphologiques du spermatozoïde, pour lesquels une base génétique a été identifiée, concernent l'acrosome et le flagelle. Des mutations dans les gènes *SPATA16* ou *DPY19L2* (de transmission autosomique récessive) ont été associées à des rares cas de tératozoospermie nommés globozoospermie (spermatozoïde à tête ronde sans acrosome) (Siffroi, 2015). La dyskinesie ciliaire primitive est une maladie génétique rare causée par une structure ciliaire anormale responsable d'infections des voies aériennes hautes et basses mais également une motilité anormale des spermatozoïdes. Une motilité réduite ou absente des spermatozoïdes peut dans ces cas être causée par une mutation dans les gènes *DNAH5*, *DNAH11*, *CCDC39*, *DNAI1*, *CCDC40*, *CCDC103*, *SPAG1*, *ZMYND10*, *ARMC4*, *CCDC151*, *DNAI2*, *RSPH1*, *CCDC114*, *RSPH4A*, *DNAAF1*, *DNAAF2* et *LRRC6* (Zariwala *et al.*, 2015). Il existe probablement beaucoup d'autres formes de défaut des spermatozoïdes dont la cause génétique reste encore à identifier.

### 4. Infertilité et défaut post-testiculaire

Certaines anomalies perturbent la fonction de reproduction de façon post-testiculaire. Parmi elles, les mutations du gène *CFTR* sont des causes relativement fréquentes d'infertilité masculine. Elles sont impliquées dans diverses formes cliniques de mucoviscidose, parmi lesquelles l'atrésie uni- ou bilatérale des canaux déférents (ABCD) entraînent une oligozoospermie ou une azoospermie obstructive.

Il ne faut néanmoins pas oublier que certaines infertilités résultent d'association de plusieurs anomalies. De la même manière, la conjonction de plusieurs anomalies génétiques peut être nécessaire à la survenue d'un trouble de la fertilité chez l'homme.

	Résolution	Cohorte	CNV d'intérêt	Références
Chr X	Microarray <b>60 K</b> à façon ciblant le chromosome X; 53 069 sondes	Azoospermie: n=49 Cryptozoospermies: n=25 Oligozoospermie: n=22 Normospermie: n=103	73 CNV, dont 55 nouveaux	Chianese <i>et al.</i> , 2014 Krausz <i>et al.</i> , 2012
Chr Y	Microarray <b>1M</b> ; Exons couverts à 81%. Espacement moyen (backbone) : 5 Kb	Normospermie: n=411	22 CNV dont 16 nouveaux	Wei <i>et al.</i> , 2015
Chr Y + séquences cibles	Microarray à façon ciblant le chromosome Y et les gènes <i>AR, CFTR, PLOG, INSL3, RXFP1</i> et l'ADN mitochondrial; 56 205 sondes. Espacement moyen : 0,5 Kb	oligozoospermie: n=5 Azoospermie: n=5 Normospermie: n=8	Nouvelle délétion du chromosome Y	He <i>et al.</i> , 2017
Génome entier	Microarray <b>244K</b> ; 236 381 sondes. Espacement moyen : 8,9 Kb <b>400K</b> microarray; 411 056 sondes Espacement moyen: 5,3 Kb	Oligozoospermie sévère: n=89 Azoospermie (SCOS): n=37 Normospermie: n=100	Oligozoospermie sévère: 10 CNV SCOS: 3 CNV Oligozoospermie sévère + SCOS: 1 CNV	Tuttelmann <i>et al.</i> , 2011
	Microarray <b>244K</b>	Azoospermie: n=9 Normospermie: n=20	10 CNV	Stouffs <i>et al.</i> , 2012
	Microarray <b>1M</b>	Infertilité: n=37 Normospermie: n=10	Aucun CNV spécifique en lien avec l'infertilité sauf microdélétions Yq	Song <i>et al.</i> , 2012

Tableau 6 : Analyses par CGH-array réalisées sur une cohorte de patients infertiles et/ou normospermes.

Malgré nos connaissances accumulées dans le domaine de la génétique de la reproduction chez l'homme, de nombreux cas d'infertilité masculine restent encore inexpliqués, la contribution de facteurs génétiques dans cette pathologie est de plus en plus explorée. Des techniques hautement résolutive d'analyse du génome, telle que l'analyse chromosomique sur puce à ADN, technologie CGH-array (hybridation génomique sur puce à ADN) ou SNP-array (single nucleotide polymorphism array) et le séquençage de l'ADN à haut débit, permettront de découvrir d'autres anomalies associées à un défaut de production des spermatozoïdes.

#### **E. Microremaniements cryptiques et infertilité**

La cytogénétique médicale est en pleine évolution. Les réarrangements génomiques de petite taille, tels que les délétions ou les duplications cryptiques qui perturbent l'intégrité du génome, peuvent affecter l'expression de gènes et donc le phénotype. L'hybridation génomique comparative sur puce à ADN (CGH-array), encore appelée Array comparative genomic hybridization, est apparue comme un outil moléculaire puissant pour l'analyse du génome à haute résolution. C'est une méthode qui permet d'explorer simultanément, et sur tout le génome les déséquilibres chromosomiques ou CNV (copy number variation) entre l'ADN d'une référence et celui d'un patient de même sexe. La CGH-array détecte les déséquilibres génomiques avec une résolution 25 à 1000 fois supérieure à celle du caryotype standard. Les CNV représentent une source importante de diversité génétique avec d'importantes différences entre les individus. Les variations du nombre de copies peuvent également affecter l'activité de gènes cruciaux pour la spermatogenèse et ainsi être responsables d'une insuffisance testiculaire.

Krausz *et al.* (2012) ont spécifiquement étudié les CNV liés au chromosome X sur une cohorte de 96 hommes infertiles et 103 hommes fertiles. Un certain nombre de CNV et de gènes candidats ont ainsi pu être identifiés chez les patients présentant une insuffisance testiculaire (Tableau 6) (Krausz *et al.*, 2012, Chianese *et al.*, 2014). Bien que la plupart des recherches sur la génétique de l'infertilité masculine se soient concentrées sur le chromosome Y, l'infertilité des hommes peut résulter d'autres facteurs génétiques portés par d'autres chromosomes que les chromosomes sexuels. Peu d'études se sont consacrées à la réalisation de la CGH-array du génome complet pour identifier de nouveaux gènes candidats associés à une altération de la spermatogenèse (Song *et al.*, 2012, Stouffs *et al.*, 2012, Tuttelmann *et al.*, 2011). A ce jour, seules les études centrées sur chromosome Y ont su établir un lien évident entre CNV et altérations de la production des spermatozoïdes chez l'homme (Wei *et al.*, 2015, He *et al.*, 2017) (Tableau 6).



## **CHAPITRE 2**

Cellules souches pluripotentes induites (iPS) et différenciation germinale

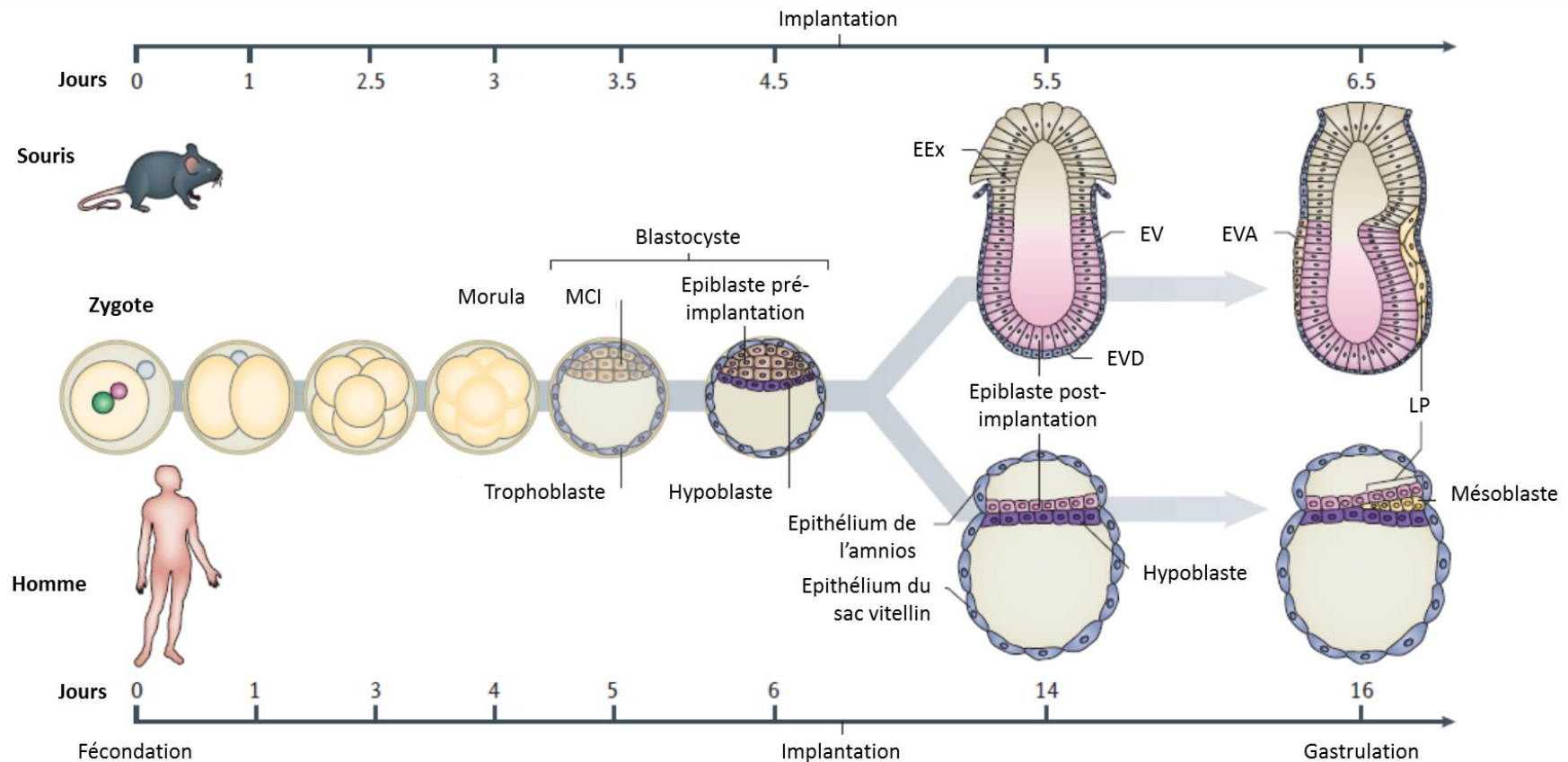


Figure 22 : Embryogenèse chez l'homme et la souris du stade zygote au stade blastocyste. Les divisions cellulaires successives de l'embryon conduisent à la formation de deux tissus distincts au stade blastocyste : le trophoblaste, participant à la formation du placenta, et les cellules de la masse cellulaire interne, source de cellules souches embryonnaires, qui se différencient en entoblaste, mésoblaste et ectoblaste pour former l'embryon. La MCI forme dans un premier temps deux feuillets, l'épiblaste (ectoblaste primitif) et l'hypoblaste (entoblaste primitif). Puis, à la gastrulation se met en place le troisième feuillet embryonnaire, le mésoblaste qui se développe à partir de l'épiblaste. AVE : Entoblaste viscéral antérieur; EEx : Ectoblaste extra-embryonnaire; EVD : Entoblaste viscéral distal; EV : Entoblaste viscéral; LP : ligne primitive; MCI : masse cellulaire interne (d'après Tang *et al.*, 2016).

## I. Les cellules souches embryonnaires murines et humaines

### A. Stade blastocyste et cellules souches pluripotentes

La pluripotence est un état de développement unique à partir duquel l'ensemble de l'embryon se constitue. La chronologie du développement embryonnaire précoce est relativement proche entre la souris et l'Homme. Il est marqué par deux événements consécutifs de ségrégation cellulaire au cours des premières étapes du développement embryonnaire (Figure 22). Après la fécondation et la fusion des pronuclei, le développement débute à partir d'une unique cellule appelée zygote. Cette cellule est totipotente, c'est-à-dire capable à elle seule de développer un organisme entier, soit de générer tous les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires. Au cours du développement pré-implantatoire, le zygote subit une série de divisions segmentant l'embryon en cellules de plus en plus petites appelées blastomères. Ces divisions cellulaires successives conduisent à la formation d'un embryon de 8, 16, 32 puis 64 cellules. Au 4<sup>ème</sup> jour du développement chez l'Homme et à 2.5 jpc chez la souris, l'embryon se présente sous la forme d'une masse cellulaire pleine de 64 cellules, c'est le stade morula (Tachdjian *et al.*, 2016). L'accumulation de liquide suivie de la première spécialisation des cellules de l'embryon en cellules centrales constituant la masse cellulaire interne (MCI), et en cellules formant une couche continue en périphérie, le trophoblaste, aboutit à J5 post-fécondation chez l'Homme et à 3.5 jpc chez la souris, au stade blastocyste (Tachdjian *et al.*, 2016, Tang *et al.*, 2016) (Figure 22). Le trophoblaste est un épithélium différencié nécessaire à l'implantation de l'embryon et la MCI forme l'embryon proprement dit. La MCI constitue une source de cellules souches embryonnaires (ES). Les cellules de la MCI sont pluripotentes. Elles sont dotées de deux capacités fondamentales : celle de se diviser indéfiniment *in vitro* par auto-renouvellement sous forme de lignée immortalisée, et celle de donner n'importe quel type cellulaire différencié provenant de l'un des trois feuilletts embryonnaires, entoblaste, ectoblaste et mésoblaste (Kuijk *et al.*, 2011).

Au cours de la deuxième spécialisation de la MCI, au stade blastocyste tardif, un deuxième lignage extra-embryonnaire se distingue. C'est l'hypoblaste ou entoblaste primitif. Simultanément, le reste des cellules se différencie en épiblaste possédant le potentiel de développement et la flexibilité requis pour produire l'ensemble des lignées embryonnaires (Figure 22). L'hypoblaste est à l'origine du développement du sac vitellin et de l'entoblaste extra-embryonnaire pariétal, et les cellules de l'épiblaste sont à l'origine du fœtus ainsi que des tissus extra-embryonnaires tels que l'amnios et l'allantoïde. A ce stade, l'embryon est donc formé de deux feuilletts l'hypoblaste et l'épiblaste et de la couche externe du blastocyste, le trophoblaste.

Dans l'embryon de mammifère, la pluripotence est une propriété émergente qui s'établit pour la première fois dans la MCI du blastocyste. Ces cellules pluripotentes ne sont présentes que de manière transitoire dans l'embryon *in vivo*, car elles se différencient rapidement en diverses cellules somatiques et en cellules germinales lors du développement. Plusieurs études ont montré que les cellules de l'épiblaste pré- et post-implantation maintiennent une pluripotence jusqu'à l'initiation de la



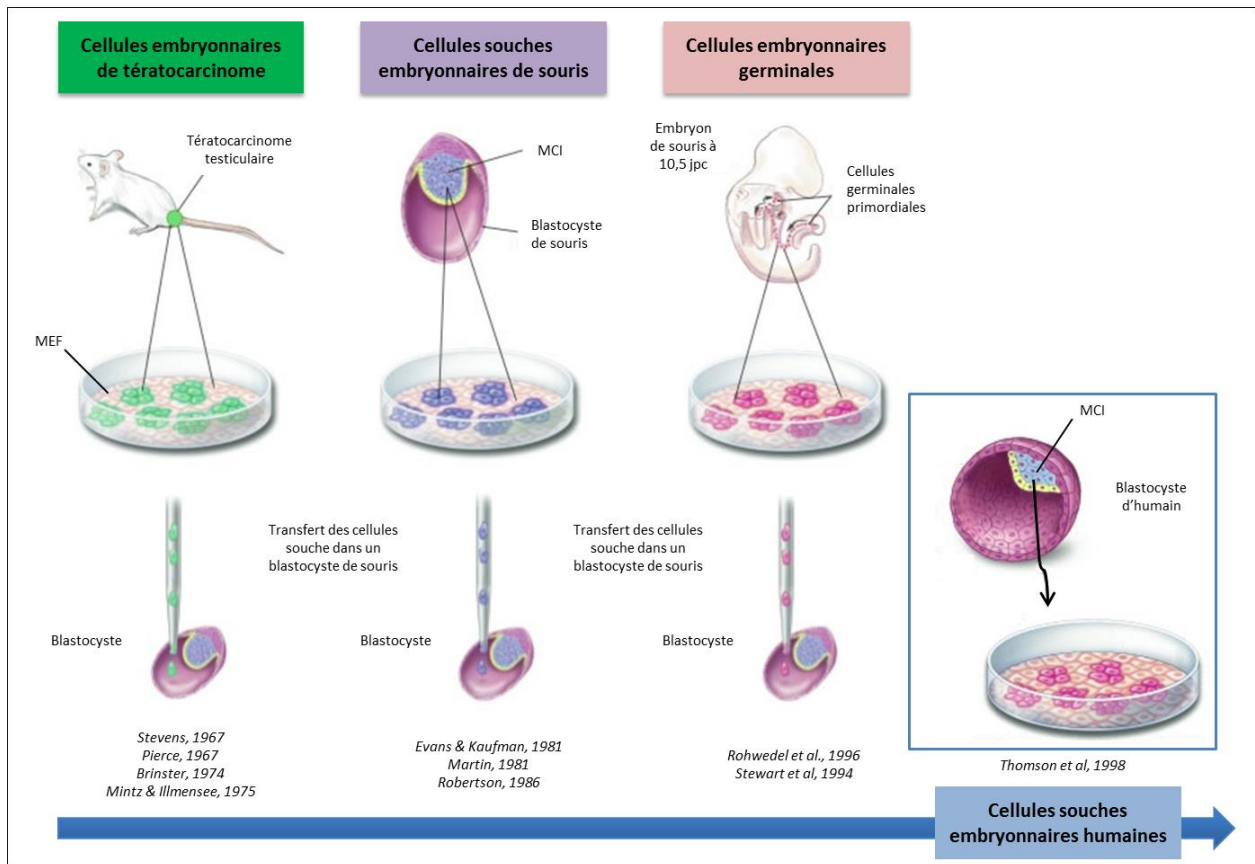


Figure 23 : Origine et découverte des cellules souches pluripotentes chez la souris puis chez l'Homme. MCI : masse cellulaire interne; MEF : mouse embryonic fibroblast (adapté de <https://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixB.htm>).

gastrulation (mise en place du troisième feuillet embryonnaire). Les cellules de l'épiblaste post-implantation ne sont pas limitées en terme de différenciation et peuvent contribuer au développement des trois feuillets embryonnaires. La pluripotence de l'épiblaste prend fin avec le processus de gastrulation (Chazaud, 2008).

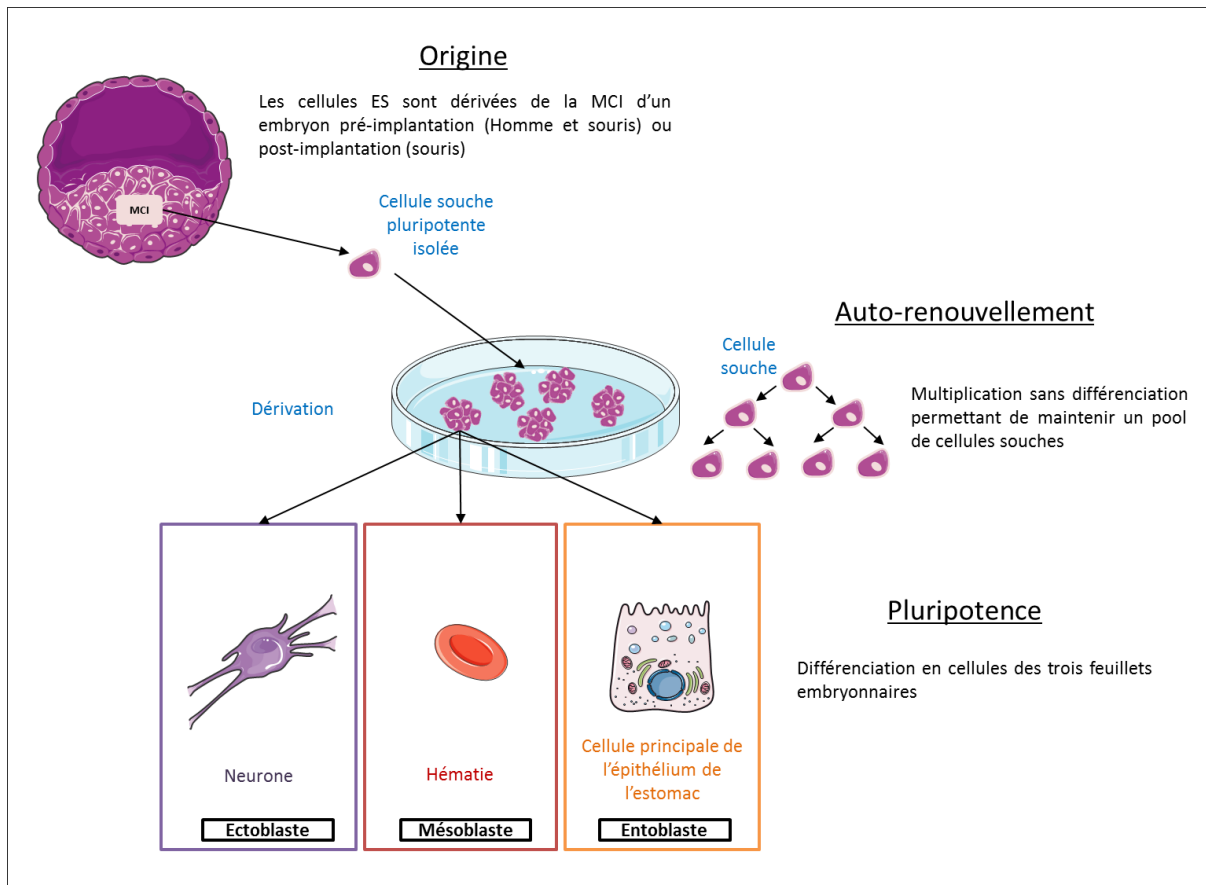
## B. Découverte et dérivation des cellules pluripotentes *in vitro*

### 1. Historique

Différents types de cellules souches pluripotentes peuvent être identifiés et cultivés *in vitro*. La preuve de l'existence des cellules souches pluripotentes vient de l'étude des tératocarcinomes de souris. Dans les années 1960, Leroy Stevens et Barry Pierce ont développé et étudié des lignées de souris chez lesquelles se développent, avec une forte incidence, des tumeurs testiculaires. Les auteurs ont alors cherché l'origine cellulaire de ces cellules tumorales (Stevens, 1967, Pierce, 1967). Ces tumeurs étaient dotées d'un potentiel de croissance indéfini non retrouvé dans les tératomes les plus fréquemment observés et pouvaient se différencier en différents tissus *in vitro*. L'isolation d'une cellule, morphologiquement indifférenciée, au sein du tératocarcinome puis sa transplantation chez une souris hôte adulte histocompatible, a conduit à la formation d'un tératocarcinome autonome contenant une variété de tissus différenciés de la même manière que la tumeur d'origine (Pierce, 1967). Par conséquent, la cellule souche embryonnaire de tératocarcinome a été la première cellule pluripotente douée d'auto-renouvellement à être caractérisée (Figure 23). De plus, il a été démontré que ces cellules de tératocarcinomes étaient capables, une fois injectées dans un embryon de souris au stade blastocyste, de participer au développement normal de l'embryon chimère en contribuant au développement de toutes les lignées cellulaires somatiques mais aussi des cellules de la lignée germinale (Brinster, 1974, Mintz & Illmensee, 1975) (Figure 22).

En 1981, Martin Evans et Gail Martin ont été les premiers à rapporter la dérivation de cellules souches embryonnaires pluripotentes (cellules ES : embryonic stem cells) à partir de la MCI d'embryons de souris au stade du blastocyste pré-implantation (Evans & Kaufman, 1981, Martin, 1981). Cela a constitué une étape décisive dans l'histoire de la recherche sur les cellules ES, car ces cellules peuvent être cultivées directement à partir de blastocystes, sans nécessairement passer par la production de lignées de cellules de tératocarcinome (Evans & Kaufman, 1981, Martin, 1981). Ces études pionnières ont depuis révolutionné la génétique chez la souris et l'étude de la fonction des gènes. Les cellules ES peuvent, dans une chimère, se différencier et contribuer au développement de tous les tissus, y compris les gonades (Robertson, 1986) (Figure 23).

Les lignées cellulaires pluripotentes ont également été dérivées à partir de cellules germinales primordiales migratoires chez la souris (Figure 23). Rohwedel et son équipe ont étudié en 1996 la capacité de différenciation *in vitro* des cellules germinales embryonnaires dérivées de CGP de souris (Rohwedel *et al.*, 1996). Ces cellules sont capables de participer au bon développement d'un embryon ainsi qu'à la lignée germinale, une fois injectées dans un embryon de souris au stade blastocyste



**Figure 24** : Origine et propriétés cardinales des cellules ES. Les lignées de cellules ES sont dérivées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste. *In vitro*, les cellules ES sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment, de se différencier en cellules des trois feuillets primitifs, ectoblaste, mésoblaste et entoblaste. Cellules ES : embryonic stem cells; MCI : masse cellulaire interne (adapté de [www.servier.fr](http://www.servier.fr)).

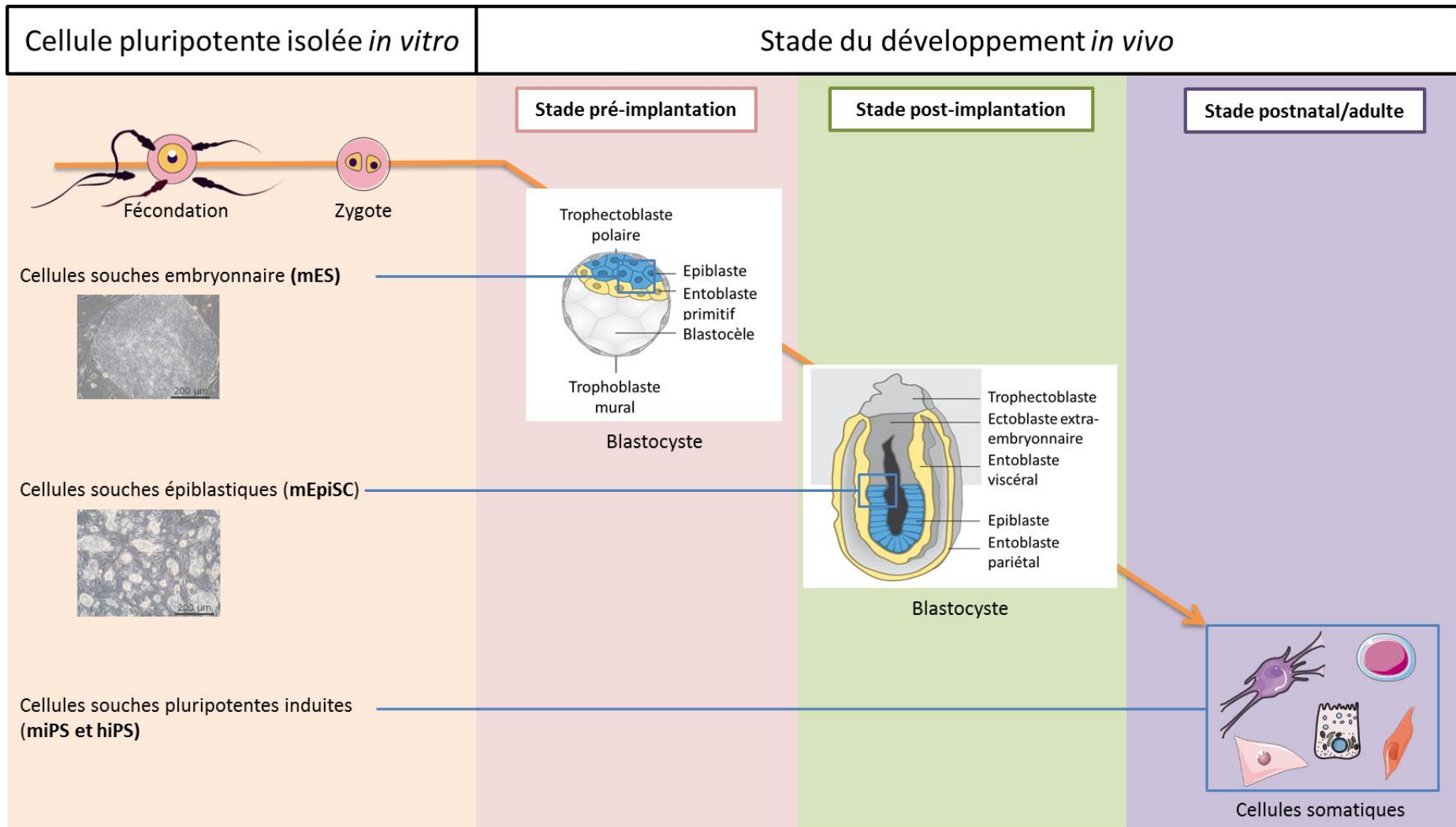
(Stewart *et al.*, 1994). En les cultivant en agrégats embryonnaires, ces cellules germinales embryonnaires se sont différenciées en cellules cardiaques, squelettiques et neuronales (Rohwedel *et al.*, 1996). Ainsi, le potentiel de différenciation des cellules germinales embryonnaires *in vitro* ressemble à celui des cellules ES pluripotentes (Matsui *et al.*, 1992).

Au milieu des années 90, des cellules ES ont été dérivées à partir de blastocyste chez deux espèces de primates non-humains (macaque rhesus et ouistiti) (Thomson *et al.*, 1995, Thomson *et al.*, 1996). Cultivées sur des fibroblastes embryonnaires de souris ou MEF (mouse embryonic fibroblasts), cellules nourricières, ces cellules ES se maintiennent à l'état indifférencié. Suite aux travaux pionniers réalisés chez la souris et le primate, des lignées ES humaines ont été dérivées avec succès par la même équipe en 1998 à partir de la MCI d'embryons pré-implantation au stade de blastocyste (Thomson *et al.*, 1998) (Figure 23). Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) peuvent être maintenues *in vitro* pendant plus d'un an en restant phénotypiquement et génotypiquement stables (caryotype, longueur des télomères, morphologie et activité de la télomérase) (Amit *et al.*, 2000). Comme les cellules souches embryonnaires de souris (mES), les cellules hES ont la capacité de se différencier *in vivo* et *in vitro* vers les trois feuilletts embryonnaires.

Comme évoqué en début de chapitre, la MCI est à l'origine de tous les tissus. Les cellules ES ont hérité de cette propriété de pluripotence. Ainsi, les cellules ES peuvent se différencier en ectoblaste, entoblaste et mésoblaste tout en proliférant de façon illimitée car elles ne subissent pas de sénescence (Figure 24). Elles sont en effet capables de conserver une activité télomérase élevée. Leur potentielle utilisation pour produire des cellules somatiques et germinales confère une valeur certaine aux cellules hES dans le domaine de la médecine régénératrice et la thérapie cellulaire mais aussi dans la recherche à visée médicale (criblage de médicaments, applications en génomique fonctionnelle). Outre leur potentiel thérapeutique, les ES humaines représentent un modèle *in vitro* unique pour étudier les mécanismes qui contrôlent la différenciation et la pluripotence au début du développement humain.

## 2. Deux états dynamiques de cellules souches pluripotentes : naïf et amorcé

La pluripotence est un phénomène dynamique qui évolue au cours des différentes étapes pré- et post-implantation. Le maintien de la pluripotence est crucial pour permettre à l'embryon de mammifère de générer les tissus extra-embryonnaires et embryonnaires nécessaires au développement du fœtus et à la survie intra-utérine. C'est un état transitoire *in vivo*. Néanmoins cet état peut être maintenu *in vitro* à partir de différents stades du développement embryonnaire précoce. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation qui régulent la préservation *in vitro* des cellules souches pluripotentes semblent diverger en fonction de leur origine pré- ou post-implantation (Hackett & Surani, 2014). Les conditions de croissance qui sont nécessaires et utilisées pour développer de telles cellules *in vitro* déterminent l'état pluripotent qu'elles atteignent. On distingue deux états de la pluripotence : l'état naïf et l'état amorcé. Les facteurs nécessaires au maintien de la croissance et de la pluripotence de ces deux types cellulaires semblent diverger.



**Figure 25 :** Dérivation de différents types de cellules souches pluripotentes à partir de cellules provenant de différents stades du développement. hiPS: human induced pluripotent stem cell; mEpiSC : mouse epiblast stem cell; mES : mouse embryonic stem cell; miPS: mouse induced pluripotent stem cell (d'après Weinberger *et al.*, 2016).

## 2.1. Culture et caractéristiques des cellules ES murines : un état naif de la pluripotence

### • Pluripotence et profil d'expression

Les cellules mES sont isolées à partir de la MCI de blastocyste de souris au cours du développement pré-implantation (E3.5) et sont associées à un état de pluripotence dit naif car elles conservent plusieurs caractéristiques moléculaires de la MCI. Cette pluripotence à l'état naif se réfère aux cellules nouvellement isolées au sein de l'épiblaste pré-implantation de souris ainsi qu'aux cellules mES (Figure 25).

Les cellules ES de souris ont été initialement dérivées puis cultivées, dans les mêmes conditions que les cellules embryonnaires de tératocarcinome, sur un tapis de cellules nourricières de fibroblastes embryonnaires de souris (ou MEF) en présence de sérum de bovin fœtal (FBS : 10-20%) (Thomson *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 2001). Les cellules mES ont la capacité de proliférer de façon illimitée *in vitro* selon un cycle cellulaire particulièrement rapide tout en conservant leur potentiel de différenciation. Les cellules mES ont un noyau qui occupe une grande partie du volume cellulaire. Elles prolifèrent en formant des colonies en dôme et forment des corps embryonnaires en culture non-adhérente, une configuration tridimensionnelle favorisant la différenciation par une stimulation mécanique et un contact intercellulaire. Le stroma de MEF est traité à la mitomycine-C ou irradié afin d'arrêter leur potentiel prolifératif et contribue au maintien de la pluripotence des cellules mES en sécrétant un facteur crucial, le LIF (leukemia inhibitory factor) (Ohtsuka *et al.*, 2015). Une étude a montré qu'en l'absence de MEF, l'apport exogène en LIF maintient la prolifération à l'état indifférencié (Williams *et al.*, 1988). Les cellules mES présentent une forte activité télomérase, ce qui leur permet de conserver des télomères extrêmement longs et stables et de ne pas subir de sénescence en culture. Ces cellules mES tolèrent bien la dissociation enzymatique à la trypsine ainsi que l'ensemencement en cellule unique. Par ailleurs, une inactivation aléatoire d'un chromosome X très tôt au cours du processus de différenciation dans les embryons XX a été rapportée. Les deux chromosomes X sont actifs au sein des cellules mES à l'état indifférencié (Monk, 1981).

Après micro-injection de cellules ES dans un blastocyste hôte, les cellules ES sont capables de participer à la production d'une chimère en se différenciant vers tous les types cellulaires embryonnaires et adultes incluant la lignée germinale. De telles propriétés ont conduit à l'utilisation des cellules ES dans le domaine de l'ingénierie génétique animale. Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme jouant un rôle essentiel dans l'induction et le maintien de l'état pluripotent naif des cellules mES *in vitro*. Il existe plusieurs tests permettant de démontrer la pluripotence des cellules mES. Elles sont capables *in vitro* et *in vivo* de se différencier dans les lignages appartenant à l'entoblaste, au mésoblaste et à l'ectoblaste. Les cellules mES peuvent être cultivées pendant de longues périodes (> 6 mois) sans perte des marqueurs de la pluripotence (Andang *et al.*, 2008).

L'état naif de la pluripotence des cellules ES est caractérisé par un état épigénétique plus permissif (Efroni *et al.*, 2008). Un contexte marqué par la présence de domaines bivalents associant la présence simultanée sur l'histone H3 d'une méthylation activatrice de la lysine 4, et répressive de la lysine 27 (Azucara *et al.*, 2006, Bernstein *et al.*, 2006, Stock *et al.*, 2007). Ces marques épigénétiques concernent des gènes du développement (Bernstein *et al.*, 2006). Ces domaines bivalents inhiberaient

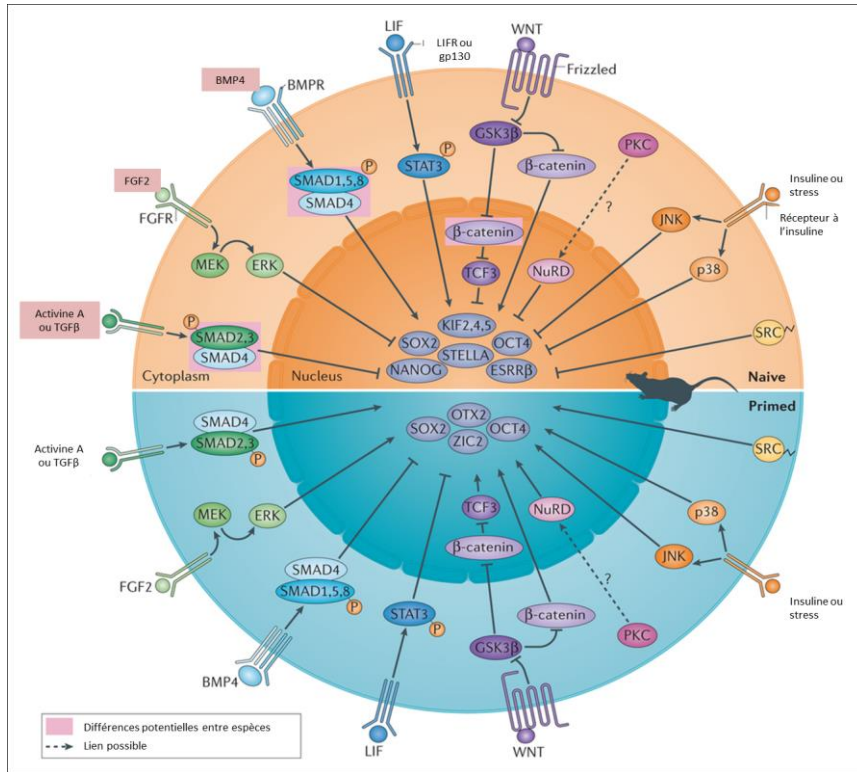


Figure 26 : Ensemble des voies de signalisation régissant le maintien de la pluripotence à l'état naïf et amorcé et leur influence (d'après Weinberger *et al.*, 2016).

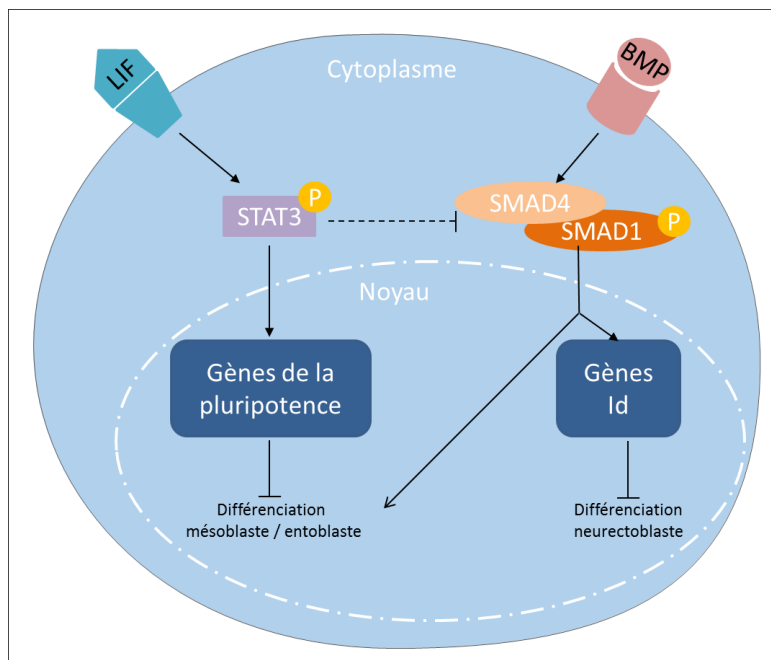


Figure 27 : Equilibre des voies de signalisation BMP/Smad et LIF/Stat3 entre auto-renouvellement et inhibition de la différenciation somatique et germinale chez la souris. La voie LIF/STAT3 contribue à l'expression des gènes de la pluripotence, soit à l'auto-renouvellement des cellules ES ainsi qu'à l'inhibition de la différenciation vers le mésoblaste et l'entoblaste. La voie BMP permet par l'expression d'inhibiteurs de la différenciation (Id) d'empêcher la différenciation en neurectoblaste. En parallèle, la capacité de BMP à induire la différenciation mésoblastique et entoblastique est limitée par STAT3.

l'expression des gènes du développement dans les cellules mES tout en les gardant prêts pour une future activation (Bernstein *et al.*, 2006). Le retrait de la marque inhibitrice au cours du développement se fait ainsi rapidement (Bernstein *et al.*, 2006). Les cellules mES sont également marquées par une hypométhylation globale de l'ADN avec une prévalence réduite des marques épigénétiques répressives H3K27me3 au niveau des histones des promoteurs (Marks *et al.*, 2012, Ficiz *et al.*, 2013, Habibi *et al.*, 2013). Par ailleurs, ces cellules sont caractérisées par l'expression de plusieurs marqueurs de surface spécifiques comme SSEA1 (Stage specific early antigen 1), la molécule d'adhésion E-Caderin, mais aussi intracellulaires (gènes clés de la pluripotence) et par la présence d'une forte activité de la phosphatase alcaline (Solter & Knowles, 1978, Nagaoka *et al.*, 2006). Parmi les principaux facteurs intrinsèques de pluripotence : Oct3/4 (octamer-binding transcription factor 4), Nanog et Sox2 (sex determining region Y-box2) contrôlent de manière coopérative l'expression des gènes dans les cellules souches pluripotentes (CSP). Oct3/4 a été identifié pour la première fois chez la souris en tant que facteur de transcription spécifique des cellules mES et de la lignée germinale (Rosner *et al.*, 1990). Il est essentiel pour le développement embryonnaire précoce. En l'absence d'*Oct4*, les embryons meurent au moment de l'implantation en raison d'un défaut de cellules pluripotentes dans la MCI (Nichols *et al.*, 1998). *Nanog* joue un rôle essentiel dans la régulation de l'engagement des cellules pluripotentes de la MCI pendant le développement embryonnaire, en maintenant l'épiblaste pluripotent et en empêchant la différenciation vers l'entoblaste primitif (Chambers *et al.*, 2007). Le gène *Sox2* intervient dans la reprogrammation des cellules somatiques, renversant la configuration épigénétique des cellules différenciées vers un état embryonnaire pluripotent (Zhang & Cui, 2014).

- **Maintien de l'auto-renouvellement**

Le LIF constitue une cytokine clé du maintien de l'auto-renouvellement et de la pluripotence des cellules mES en agissant par l'intermédiaire de son récepteur (LIFR ou gp130) sur la voie de signalisation JAK/STAT3 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3) (Smith *et al.*, 1988, Williams *et al.*, 1988) (Figure 26). Les protéines BMP (bone morphologic proteins) peuvent agir conjointement avec le LIF pour maintenir l'auto-renouvellement des cellules mES *in vitro* (Ying *et al.*, 2003). Cette capacité des protéines BMP à favoriser l'auto-renouvellement des cellules mES est principalement due à leur capacité de bloquer la différenciation neurale et dépend de la présence continue de la signalisation LIF (Ying *et al.*, 2003) (Figure 27). La voie de signalisation des BMP agit par l'activation des protéines SMAD (Weinberger *et al.*, 2016) (Figure 26-27). Les SMAD permettent l'expression de gènes inhibiteurs de la différenciation ectodermique et favorisent la différenciation vers le mésoblaste et l'entoblaste (Figure 27). Une fois STAT3 phosphorylé par la fixation du LIF à son récepteur, STAT3 est alors capable d'inhiber les protéines SMAD et donc la différenciation (Ying *et al.*, 2003) (Figure 27). Néanmoins, BMP est plus rarement utilisé pour le maintien des lignées de cellules mES en culture. Il a été prouvé que la voie de signalisation BMP-SMAD restait moins active au sein des cellules mES. De plus, les cellules mES mutantes homozygotes pour *Smad4* maintiennent leur état naif de pluripotence, ce qui indique que la voie de signalisation BMP/SMAD n'est pas indispensable pour le maintien de la pluripotence des cellules mES naïves (Boroviak *et al.*, 2014). Battle-Morera et son équipe





ont constaté que la réduction de l'activation de la protéine Erk était nécessaire à la dérivation des cellules mES (Batlle-Morera *et al.*, 2008). En utilisant un cocktail d'inhibiteurs des voies médiées par MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinases) ou iMEK, et GSK3 (glycogen synthase kinase 3) ou iGSK3 (CHIR99021), les auteurs ont montré que leur inhibition était suffisante pour induire une totale pluripotence des cellules mES *in vitro* (Ying *et al.*, 2008, Ye *et al.*, 2014) (Figure 26). La supplémentation en LIF renforce cette induction. Le cocktail LIF/iMEK/iGSK active les voies de signalisation LIF/STAT3 et WNT/ $\beta$ -catenin et bloque celle médiée par FGF2 (Figure 26). Un milieu nécessaire et suffisant pour induire et maintenir la pluripotence des cellules mES (Ye *et al.*, 2014). Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -catenin induit de nombreux gènes de la pluripotence qui ne sont alors plus réprimés par Tcf3 (transcription factor 3) (Wray *et al.*, 2011) (Figure 26). D'autres inhibiteurs ont également montré leur capacité à induire la pluripotence des cellules mES : les inhibiteurs des voies SRC et aPKC (atypical protein kinase C) en présence ou non de LIF et de iMEK (Dutta *et al.*, 2011, Shimizu *et al.*, 2012). Ainsi, de nombreux facteurs de transcription contrôlent l'auto-renouvellement, la pluripotence et/ou la différenciation des cellules souches.

Les voies de signalisation sont souvent pléiotropes et peuvent simultanément avoir des effets positifs et négatifs sur l'état naif de la pluripotence (Wray *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2013, Faunes *et al.*, 2013, Morgani & Brickman, 2015). Ainsi, c'est un véritable équilibre d'activation et de répression de voies de signalisation qui contribue au maintien de la pluripotence des cellules mES (Figure 26).

## 2.2. Les cellules EpiSC de souris : un état amorcé de pluripotence

### • Pluripotence et profil d'expression

Après l'implantation, l'épiblaste est soumis à de nombreux signaux provenant de l'épiblaste lui-même mais aussi des tissus extra-embryonnaires, et se prépare à la différenciation (Surani *et al.*, 2007). La pluripotence cellulaire doit ainsi être maintenue malgré l'influence contraire des signaux de différenciation qui l'entourent. Des modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN par les DNA méthyl-transférase (DNMT) ou les modifications d'histones par méthylation, phosphorylation ou acétylation, jouent un rôle majeur dans ce processus (Surani *et al.*, 2007). De ce fait, les cellules EpiSC possèdent une hyperméthylation globale des promoteurs des gènes (Veillard *et al.*, 2014). Ainsi, dans l'embryon post-implantation, les cellules souches épiblastiques (EpiSC) pluripotentes sont contrôlées par divers mécanismes répressifs. Bien que ces cellules soient définies comme pluripotentes, elles ont un potentiel de développement plus limité que les cellules mES.

La pluripotence amorcée a également été dérivée *in vitro* à partir cette fois-ci des cellules de l'épiblaste post-implantation (EpiSC), à E5.5-E7.5 (blastocyste tardif), chez le rongeur (Tesar *et al.*, 2007, Brons *et al.*, 2007) (Figure 26). Comme les cellules mES, les cellules EpiSC prolifèrent indéfiniment en culture sur MEF et se différencient vers les trois feuilletts embryonnaires *in vitro* et *in vivo*. Elles correspondent en réalité à un stade de développement plus avancé que les cellules pluripotentes naïves, on parle de pluripotence amorcée ou encore de cellules Epiblast-like. En effet, les mEpiSC diffèrent des cellules mES sur plusieurs caractéristiques qui reflètent les deux états de l'épiblaste dont elles sont issues (Figure 26).

Propriétés	Cellules pluripotentes naïves	Cellules pluripotentes amorcées
Dépendance de la voie MEK/ERK	Non	Oui
Dépendance à long terme de la voie FGF2	Non	Oui
Dépendance à long terme de la voie activine A ou TGF $\beta$	Non	Oui
Tolérance pour l'absence de L-glutamine exogène	Oui	Non
Présence des marques H3K27me3 sur les régulateurs du développement	Faible	Elevée
Hypométhylation globale de l'ADN	Oui	Non
Hypométhylation des promoteurs et des régions régulatrices	Oui	Non
Inactivation d'un chromosome X	Non	Oui
Marqueurs de la pluripotence NANOG, KLF et ESRR $\beta$	↗	↘
Maintien de la pluripotence par NANOG ou PRDM14	Oui	Non
Expression des molécules d'adhésion	E-cadherin	N-cadhérine
Capacité à coloniser la MCI d'un embryon hôte pré-implantatoire et à contribuer au développement de chimères embryonnaires	Elevée	Faible
Compétence pour initier la différenciation en CGP-like	Elevée	Faible
Forme des colonies	Dôme	Aplatie
Supportent la dissociation enzymatique ainsi que l'ensemencement en cellule unique	Oui	Non

Tableau 7 : Propriétés des cellules pluripotentes naïves et amorcées (d'après Weinberger *et al.*, 2016).

Les deux types cellulaires diffèrent d'un point de vue morphologique. Les colonies de cellules EpiSC adoptent une forme plus aplatie et, à l'inverse des cellules mES, elles supportent mal la dissociation enzymatique, par la trypsine en particulier, ainsi que l'ensemencement en cellules uniques. Seules les cellules mES peuvent produire des chimères lorsqu'elles sont introduites dans un embryon au stade blastocyste (Tableau 7). Les mEpiSC peuvent néanmoins y contribuer dès lors qu'elles sont injectées au niveau de l'épiblaste d'un embryon de souris post-implantation. Ces mEpiSC diffèrent également dans leur programme d'expression et leurs exigences de culture *in vitro*.

D'un point de vue moléculaire, les mEpiSC partagent une signature moléculaire qui rappelle celle de l'épiblaste post-implantation plutôt que celle de la MCI. Bien que les EpiSC maintiennent l'expression des principaux marqueurs de la pluripotence Oct3/4, Sox2 et Nanog, elles présentent une hyperméthylation des îlots CpG de certains gènes de la pluripotence notamment *Rex1*, *Esrrβ*, *Klf2* et *Klf4* régulant ainsi négativement leur expression (Brons *et al.*, 2007, Hackett & Surani, 2014). Les EpiSC diffèrent ainsi considérablement des cellules mES dans leur statut épigénétique et leur profil de transcription génique (Brons *et al.*, 2007, Tesar *et al.*, 2007). Les EpiSC ont subi l'inactivation de l'un des chromosomes X et montrent une expression hétérogène des marqueurs d'engagement vers un lignage cellulaire (Tableau 7). Des gènes spécifiquement exprimés par les cellules de l'épiblaste tardif post-implantation, tels que *Fgf5* et *Nodal*, ont été détectés au sein des cellules EpiSC (Brons *et al.*, 2007, Tesar *et al.*, 2007).

#### • **Maintien de l'auto-renouvellement**

Le maintien *in vitro* de l'auto-renouvellement à long terme des mEpiSC dépend de la signalisation médiée par la voie activin A/Smad et FGF2/bFGF (fibroblast growth factor 2 ou basic fibroblast growth factor) (Figure 26). Leur croissance est inhibée par BMP4 et semble être indépendante de l'activité LIF/STAT3 (Hanna *et al.*, 2010). A l'inverse des cellules mES, une inhibition de la voie de l'activine A induit la différenciation des cellules mEpiSC (Brons *et al.*, 2007, Tesar *et al.*, 2007). Le FGF2 semble quant à lui stabiliser les cellules en culture (Brons *et al.*, 2007). Récemment, il a été démontré qu'une combinaison de deux inhibiteurs, CHIR99021 (iGSK3) et IWR1 (inhibiteur de la tankyrase) maintient également l'auto-renouvellement *in vitro* des EpiSC (Kim *et al.*, 2013a). CHIR99021 et IWR1 favorisent cet auto-renouvellement par la stabilisation et l'accumulation de la  $\beta$ -catenin dans le cytoplasme (Kim *et al.*, 2013a). La figure 26 résume les différentes voies de signalisation et les caractéristiques moléculaires des cellules pluripotentes naïves et amorcées. Les caractéristiques clés des cellules pluripotentes naïves et amorcées chez la souris sont résumées dans le tableau 7.



### 3. Les cellules ES humaines : un état naïf ou amorcé de la pluripotence ?

#### • Pluripotence et profil d'expression

Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) sont dérivées de la MCI d'embryon humain au stade blastocyste pré-implantatoire (Thomson *et al.*, 1998) (Figure 25). Ces embryons sont conçus dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et pour lesquels le couple n'a plus de projet parental. Les cellules hES poussent en colonies aplaties. Une trop forte confluence des colonies hES favorise la différenciation cellulaire. Les hES sont stables au cours des passages cellulaires et présentent également une forte activité de la télomérase. Leur pluripotence est prouvée par leur capacité à former *in vivo* des tératomes après injection des cellules à des souris immunodéficientes par voie intra-musculaire, par exemple. Des tissus différenciés issus des trois feuillets embryonnaires (ectoblaste, mésoblaste et entoblaste) sont observés dans ces tératomes. Ces cellules pluripotentes sont également capables de former en suspension des agrégats en trois dimension, appelé corps embryonnaires ou EB (embryoid bodies). La formation d'EB *in vitro* à partir de cellules pluripotentes est une méthode largement utilisée pour générer différents types de tissus (Rungarunlert *et al.*, 2009).

Contrairement aux cellules mES/miPS, les cellules pluripotentes hES n'expriment pas le marqueur de surface SSEA1 mais expriment les marqueurs SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 ainsi que la phosphatase alcaline (Thomson *et al.*, 1998). L'état d'inactivation du chromosome X dans les cellules hES est sujet à controverse et dépend souvent des lignées et des conditions de culture. Le profil global de l'expression des gènes et l'analyse épigénétique ont montré que les cellules mEpiSC et hES sont étroitement associées aux cellules épiblastiques des embryons post-implantation (Tesar *et al.*, 2007).

#### • Maintien de l'auto-renouvellement

Comme pour les cellules mES, les cellules hES sont maintenues en culture dans un état indifférencié grâce aux cellules MEF. Cependant, de nombreux supports « feeder-free » peuvent être utilisés, notamment le matrigel ou les laminines 511 ou 521 avec ou sans milieu préalablement conditionné en présence de MEF (Thomson *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 2001). Cependant, les cellules hES semblent différer considérablement des cellules mES dans leur réponse à l'activation des voies de signalisation associées au FGF et aux protéines de la famille du TGF $\beta$ . La pluripotence des cellules hES n'est pas assurée, *in vitro*, par les mêmes facteurs que pour les mES.

L'activine et Nodal (antagoniste de BMP) inhibent la différenciation des cellules hES, tandis que BMP induit leur différenciation en cellules du mésoblaste et du trophoblaste ou de l'entoblaste extra-embryonnaire (Xu *et al.*, 2002, Pera *et al.*, 2004, Fei *et al.*, 2010). Comme vu précédemment, au sein des cellules mES, le phénomène inverse se produit : la signalisation BMP inhibe la différenciation des cellules mES (Ying *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2012). Il a été démontré qu'en réponse au FGF2, les MEF et les cellules hES sécrètent des facteurs de soutien, les TGF $\beta$ , agissant de manière autocrine et paracrine pour soutenir la pluripotence des cellules hES (Greber *et al.*, 2007). L'addition du LIF dans le



milieu ne contribue pas à conserver l'état de pluripotence des cellules hES. Le maintien des cellules hES dans un état indifférencié n'est donc pas associé à l'activation de STAT3 (Daheron *et al.*, 2004).

La voie LIF/STAT3 semble être inactive dans les cellules ES humaines indifférenciées. La voie Wnt/ $\beta$ -catenin est impliquée dans la régulation de la pluripotence des cellules hES en soutenant l'auto-renouvellement des cellules hES mais n'est cependant pas suffisante (Dravid *et al.*, 2005). FGF2 active les récepteurs FGFR et stimule la voie MAPK et ainsi l'expression de gènes des cellules souches tout en supprimant les gènes de mort cellulaire, en particulier l'apoptose. L'inhibition de la signalisation du FGF autocrine provoque une augmentation de l'expression des gènes liés à la différenciation et une diminution de l'expression des gènes spécifiques des cellules souches. On observe une véritable synergie des voies FGF et TGF $\beta$ /Activine/Nodal dans le maintien de la pluripotence des cellules hES (Vallier *et al.*, 2005). Il a été montré que les cellules hES et mEpiSC se différencient rapidement suite à l'inhibition de MEK, alors que les cellules naïves tolèrent l'inhibition de MEK et consolident ainsi leur état naïf de la pluripotence (Hanna *et al.*, 2010). Par la suite, un milieu basal breveté, KO-DMEM complété par du KSR (Knock-out Serum Replacement), initialement développé pour les cellules mES, est devenu largement utilisé à la fois pour le maintien et la dérivation des hES.

Ainsi, malgré leur origine commune, les cellules hES nécessitent des conditions différentes de celles des cellules mES. Il s'avère que les inducteurs impliqués dans le maintien et la culture des hES *in vitro* se rapprochent plus de ceux des cellules mEpiSC (Roelen & Chuva De Sousa Lopes, 2011). Les cellules mEpiSC et hES partagent une morphologie aplatie, l'intolérance à l'ensemencement en cellules individuelles, leur dépendance à la signalisation TGF $\beta$ /activin A et l'inactivation du chromosome X dans la plupart des cellules femelles isolées (Thomson *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008). Ainsi, tout comme les mEpiSC, les hES sont des cellules souches pluripotentes amorcées (Brons *et al.*, 2007, Xiao *et al.*, 2016).

### **C. Intérêt et enjeux de la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines**

Les cellules souches embryonnaires humaines ont vivement suscité l'intérêt des scientifiques, notamment pour leur immense potentiel thérapeutique. En effet, ces cellules peuvent se répliquer indéfiniment, proliférer en culture et se différencier en n'importe quels types de tissus de l'organisme dans un milieu adapté. Ces propriétés des cellules souches embryonnaires offrent une grande promesse pour la compréhension des mécanismes fondamentaux du développement humain et de la différenciation, ainsi que l'espoir de nouveaux traitements de nombreuses maladies génétiques ou acquises. La thérapie cellulaire, plus connue sous le terme de « médecine régénératrice », est certainement le champ d'application le plus attrayant, avec des enjeux médicaux considérables (Lo & Parham, 2009). Cette thérapie a pour visée de remplacer des cellules lésées ou qui ont subi une perte de fonction du fait d'une maladie dégénérative (diabète, maladie de Parkinson, lésions de la moelle épinière, infarctus du myocarde) ou d'un accident (traumatismes spinaux, brûlures), dans l'espoir de réparer le tissu endommagé (Lo & Parham, 2009). Théoriquement, les cellules différenciées à partir de cellules hES pourraient même se substituer à terme à certaines greffes d'organes. Les cellules hES permettent de concevoir et d'analyser des modèles de pathologies *in vitro* au plus proche du contexte





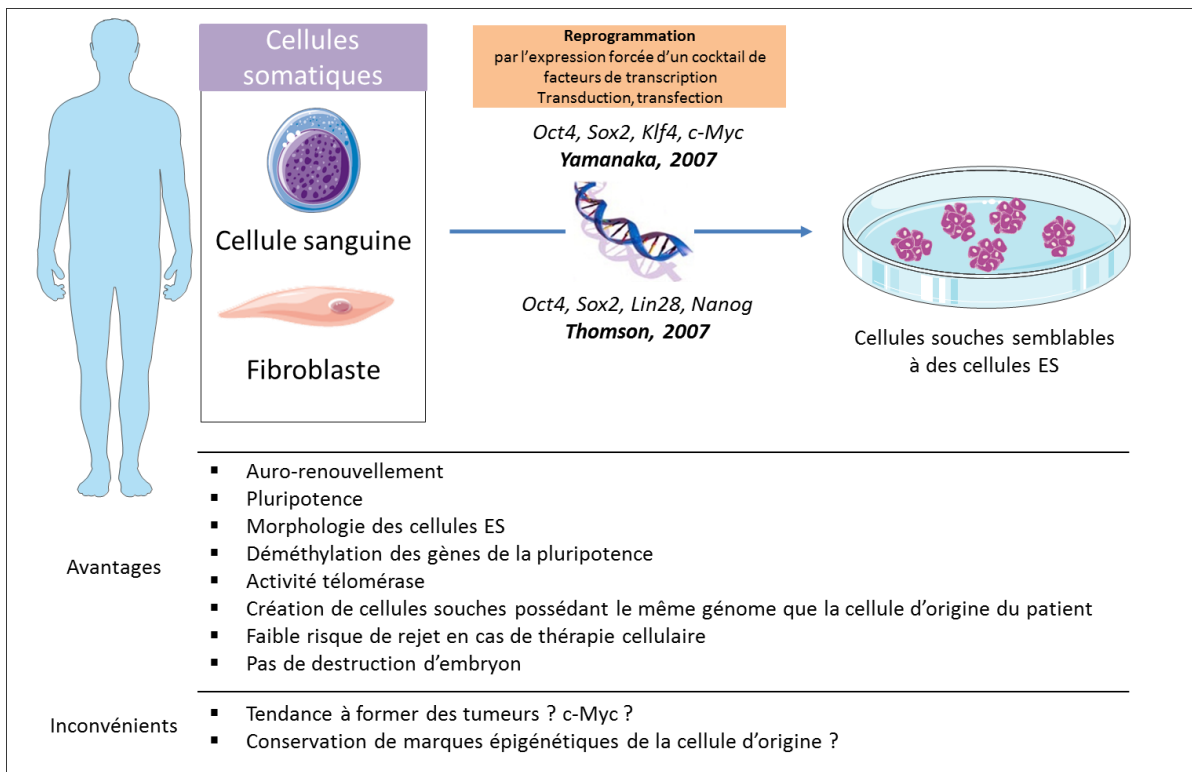
*in vivo*. Les cellules souches issues d'embryons porteurs d'anomalies génétiques, caractérisées au cours d'un diagnostic pré-implantatoire, fournit des modèles *in vitro* de maladies génétiques (Frumkin *et al.*, 2010). A ce jour, des lignées cellulaires ont été dérivées à partir d'embryons humains porteurs d'anomalies génétiques (maladie de la Myotonie Dystrophique de type 1, dystrophie musculaire de Duchenne et Becker, syndrome du X fragile, adrénoleukodystrophie, maladie d'Huntington... dans l'espoir de conduire à une meilleure compréhension des mécanismes du développement de ces pathologies et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées (Verlinsky *et al.*, 2005, Eiges *et al.*, 2007, Marteyn *et al.*, 2011). Un autre champ d'application émergent des cellules souches pluripotentes humaines, et de leur différenciation vers un type cellulaire d'intérêt, est l'étude des effets toxiques possibles de nouveaux médicaments sur les cellules différenciées *in vitro* (Frumkin *et al.*, 2010).

#### **D. Enjeux éthiques et limites de la recherche sur l'embryon et les cellules hES**

Le principal inconvénient des cellules souches embryonnaires est leur origine. L'obtention de telles cellules nécessite la destruction d'embryons humains. Cet acte rend la recherche sur les hES impopulaire renvoyant à des interrogations morales à savoir si la vie humaine commence à la conception. Ces cellules soulèvent donc de fortes controverses éthiques et politiques et la recherche sur l'embryon est par conséquent très encadrée et réglementée selon les pays.

En France, depuis la révision de la loi de bioéthique de 2013, l'Agence de la Biomédecine assure cet encadrement et autorise, ou non, les protocoles de recherche sur l'embryon. La loi française permet la réalisation de certains projets pour une durée de 4 à 5 ans sous certaines conditions relatives à la pertinence scientifique de la recherche, à l'éthique, à la finalité médicale (soit l'apport de progrès médicaux majeurs) et au fait de ne pouvoir réaliser l'étude en utilisant un autre type de cellules. A l'issue de cette période, les équipes doivent renouveler leur demande en justifiant la poursuite de leurs travaux. Le texte précise qu'une recherche peut être menée uniquement à partir d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. Cela nécessite en outre un consentement écrit du couple. Enfin, les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation.

La recherche sur l'embryon humain et les cellules hES est donc très limitée. Celle effectuée sur les cellules mES ne présente pas de tels problèmes éthiques et a permis une avancée scientifique considérable. Néanmoins, des différences dans le développement embryonnaire des deux espèces murine et humaine existent. De même, il existe des propriétés et des fonctions cellulaires spécifiques à chaque espèce. Le modèle de souris est-il réellement un bon outil pour comprendre les mécanismes moléculaires des processus de différenciation chez l'homme ? Les avancées de la recherche fondamentale, comme celles des applications cliniques, nécessitent donc de reproduire *in vitro* le micro-environnement *in vivo* et ce sur des cellules humaines afin de recréer au mieux le contexte physiologie des pathologies humaines.



**Figure 28** : Génération des cellules iPS. La reprogrammation des cellules somatiques adultes en cellules iPS est médiée par les facteurs Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc ou Oct3/4, Sox2, Lin28, et Nanog et donne naissance à des cellules souches pluripotentes semblables aux cellules ES.

## II. Les cellules souches pluripotentes induites : une alternative aux cellules ES

### A. La reprogrammation cellulaire induite

Des études avaient déjà rapporté la capacité des cellules somatiques à être reprogrammées par transfert de leur contenu nucléaire au sein d'un ovocyte, par fusion avec des cellules ES, ou encore cultivées en présence d'extraits de cellules ES. Cela révèle ainsi que les ovocytes non fécondés et le cytoplasme des cellules ES, contiennent des facteurs qui peuvent conférer une pluripotence aux cellules somatiques (Wilmot *et al.*, 1997, Tada *et al.*, 2001, Cowan *et al.*, 2005, Collas *et al.*, 2006). L'identification des facteurs de transcription qui déterminent et maintiennent la pluripotence dans l'embryon et dans les cellules ES a permis le développement des cellules souches pluripotentes iPS à partir de cellules somatiques par reprogrammation moléculaire (Takahashi & Yamanaka, 2006). Les chercheurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les facteurs qui maintiennent l'identité des cellules ES jouent également des rôles essentiels dans l'induction de la pluripotence dans les cellules somatiques. Ainsi, en 2006, une équipe japonaise dirigée par Shinya Yamanaka a démontré que des cellules somatiques matures de souris pouvaient être reprogrammées vers un état de pluripotence suite à un transfert de gènes, produisant ainsi des cellules pluripotentes induites (Takahashi & Yamanaka, 2006) (Figure 28). Ainsi, l'expression forcée de quatre facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc, sélectionnés parmi 24 gènes impliqués dans la pluripotence des cellules mES au sein de fibroblastes de souris a permis de les reprogrammer en cellules pluripotentes de type embryonnaires (Takahashi & Yamanaka, 2006). Des rétrovirus codant pour les facteurs de transcription évoqués ont été utilisés. Ces facteurs sont à l'origine de changements épigénétiques cruciaux qui modifient l'organisation de la chromatine et la méthylation de l'ADN. Ces modifications permettent d'éliminer les marques épigénétiques propres aux cellules somatiques sources et d'établir de nouvelles marques caractéristiques de la pluripotence. Les cellules miPS générées dans des conditions classiques de croissance des cellules mES conduisent à la génération de cellules miPS semblables à des cellules mES, alors que celles reprogrammées dans les conditions de croissance des cellules mEpiSC, engendrent des cellules iPS de type EpiSC, soit des cellules à l'état amorcée de la pluripotence (Hanna *et al.*, 2009, Han *et al.*, 2011). Ces travaux montrent que des conditions de culture particulières sont essentielles pour stabiliser les cellules de la MCI à l'état naïf ou amorcé.

Un an plus tard, ces expériences ont été reproduites par la même équipe sur des cellules humaines (Takahashi *et al.*, 2007). Les cellules iPS représentent une véritable révolution biologique dans le monde de la recherche puisque ces cellules pluripotentes dérivées *in vitro* ne dépendent pas l'utilisation et donc la destruction d'embryons. Ces travaux ont valu à Shinya Yamanaka le prix Nobel de médecine en 2012.

Combinaison des facteurs de reprogrammation	Espèce	Références
Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4	<b>Souris</b>	<i>Takahashi &amp; Yamanaka, 2006</i>
	<b>Homme</b>	<i>Takahashi et al., 2006</i>
	<b>Souris</b>	<i>Maherali et al., 2007</i>
	<b>Souris</b>	<i>Okita et al., 2007</i>
	<b>Souris</b>	<i>Wernig et al. 2007</i>
Oct3/4, Sox2, N-Myc ou L-Myc et Klf4	<b>Souris</b>	<i>Nakagawa et al., 2010</i>
Oct3/4, Sox2 et Klf4	<b>Homme et souris</b>	<i>Nakagawa et al., 2008</i>
	<b>Souris</b>	<i>Wernig et al. 2008</i>
Oct3/4, Sox2, Lin28 et Nanog	<b>Homme</b>	<i>Yu et al., 2007</i>
Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Lin28 et Nanog	<b>Homme</b>	<i>Liao et al., 2008</i>

Tableau 8 : Ensemble des facteurs de transcription qui ont contribué avec succès à la dérivation de cellules iPS à partir de cellules somatiques.

## B. Choix des cellules reprogrammées

Yamanaka et son équipe ont premièrement réalisé la dérivation de cellules iPS à partir de fibroblastes murins puis ensuite à partir de fibroblastes humains (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007). Ces cellules ont été utilisées pour la reprogrammation du fait de leur accessibilité. Il s'agit d'une source illimitée de cellules présentant une simplicité d'amplification *in vitro* (16-24h) et une bonne capacité à se reprogrammer.

Depuis, divers types de cellules somatiques ont été utilisées pour la dérivation de cellules iPS. Chez la souris, des cellules iPS ont été générées à partir de dérivés cellulaires des trois feuillets embryonnaires : fibroblastes (mésoblaste) (Takahashi & Yamanaka, 2006), cellules épithéliales (entoblaste) (Aoi *et al.*, 2008) et kératinocytes (ectoblaste) (Wernig *et al.*, 2008a). Les cellules hiPS ont été produites principalement à partir de mésoblaste (fibroblastes et cellules sanguines) ou d'ectoblaste (kératinocytes et cellules souches neurales) (Takahashi *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2007, Aasen *et al.*, 2008, Lowry *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008b, Ye *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2009b).

Néanmoins, il a été rapporté que la reprogrammation semblait plus efficace lorsque la cellule somatique utilisée présentait un stade de différenciation précoce du développement. La reprogrammation semble en effet plus efficace à partir d'un fibroblaste foetal qu'à partir d'un fibroblaste adulte. Mais aussi dès lors que la cellule montre une forte expression de facteurs de reprogrammation au sein de la cellule. Les cellules souches neurales peuvent être reprogrammées en utilisant uniquement deux facteurs (Oct4 et Klf4), ou même un seul facteur (Oct4) du fait d'un niveau d'expression plus élevé des gènes endogènes liés à la pluripotence Sox2 et c-Myc (Kim *et al.*, 2008, Hester *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2009c). Les kératinocytes dérivés de la peau et de cheveux prélevés chez l'Homme expriment des niveaux élevés de c-Myc, et ont ainsi montré une reprogrammation 100 fois plus efficace par rapport aux fibroblastes (Aasen *et al.*, 2008). Les mélanocytes humains des biopsies cutanées expriment des niveaux élevés de Sox2 et peuvent être reprogrammés efficacement (~ 10 jours) avec trois facteurs (Oct4, Klf4 et c-Myc) (Utikal *et al.*, 2009). D'autres groupes ont récemment dérivé des cellules iPS à partir d'une petite quantité de sang périphérique, une source de cellules facile d'accès et non invasive (Loh *et al.*, 2010, Seki *et al.*, 2010, Staerk *et al.*, 2010).

Ainsi, chaque type de cellules sources possède ses propres avantages et limites pour la génération de cellules iPS. Des études ont montré des effets significatifs de la mémoire génétique et épigénétique des cellules sources sur le potentiel de différenciation des lignées cellulaires iPS (Ghosh *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010).

## C. Facteurs de reprogrammation

### 1. Combinaisons des facteurs de transcription

Les cellules somatiques différenciées peuvent être reprogrammées en cellules iPS par l'introduction d'un ensemble défini et limité de facteurs de transcription. En tout, quatre combinaisons ont été utilisées et ont contribué avec succès à la génération de cellules iPS. Ces différentes combinaisons de facteurs de transcription sont résumées dans le tableau 8. Les facteurs Oct3/4, Sox2,



c-Myc et Klf4 ont été les premiers facteurs de transcription identifiés comme inducteurs de la reprogrammation (Takahashi & Yamanaka, 2006) : il est communément appelé cocktail Yamanaka. D'autres équipes ont par la suite utilisé avec succès cette combinaison (Maherali *et al.*, 2007, Okita *et al.*, 2007, Wernig *et al.*, 2007). Plus tard, Thompson et son équipe ont démontré que la combinaison de quatre autres facteurs (OCT4, SOX2, NANOG, and LIN28) était également suffisante pour induire la génération de cellules iPS (Cocktail « Thomson ») (Yu *et al.*, 2007). Le facteur de transcription c-Myc est un oncogène. Une reprogrammation sans l'utilisation de c-Myc est possible mais reste peu efficace (Nakagawa *et al.*, 2008, Wernig *et al.*, 2008b). Une autre équipe a entrepris de remplacer c-Myc par N-Myc. Cependant N-Myc est similaire à c-Myc en terme de longueur, de structure et d'association fréquente avec des cancers humains. Plus récemment, il a été montré qu'un autre membre de la famille Myc, L-Myc, peut générer des cellules hiPS plus efficacement et plus spécifiquement (Nakagawa *et al.*, 2010). Pour finir, une équipe a publié la reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS en utilisant chacun des six facteurs de transcriptions identifiés (Liao *et al.*, 2008).

## 2. Composés chimiques augmentant l'efficacité de la reprogrammation cellulaire

La reprogrammation est améliorée par l'ajout de molécules spécifiques. Ces petites molécules peuvent être perméables aux cellules, elles sont non immunogènes, plus rentables et plus facilement synthétisées et conservées. En outre, leurs effets sur l'inhibition et l'activation de la fonction de protéines spécifiques est souvent réversible et peut être finement régulée en faisant varier les concentrations (Hou *et al.*, 2013).

L'acide valproïque (VPA) est un acide gras à chaîne courte qui agit comme un modificateur épigénétique en inhibant les histones désacétylases. Huangfu et collaborateurs ont rapporté que le VPA permet une reprogrammation de fibroblastes primaires humains avec seulement deux facteurs de reprogrammation, Oct4 et Sox2, en s'affranchissant des oncogènes c-Myc ou Klf4 (Huangfu *et al.*, 2008a). Le VPA augmente de 50 fois l'efficacité de la reprogrammation des fibroblastes murins, et de 10 à 20 fois celle des fibroblastes humains lorsque trois facteurs sont utilisés (Huangfu *et al.*, 2008a, Huangfu *et al.*, 2008b)

L'utilisation du BIX-01294, un inhibiteur de l'histone méthyltransférase G9a, rend possible la reprogrammation des fibroblastes murins en utilisant seulement deux facteurs, Oct4 et Klf4, avec un rendement 5 fois plus élevée en terme de nombre de clones iPS obtenus par rapport à l'expérience témoin sans BIX-01294 (Shi *et al.*, 2008).

D'autres molécules ont été utilisées pour favoriser la reprogrammation telles RG108, un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN. Son rôle dans la reprogrammation est d'initier une déméthylation plus rapide et plus efficace des promoteurs de gènes spécifiques de cellules pluripotentes. A noter aussi BayK8644, un antagoniste des canaux calciques du type L dont le rôle dans la reprogrammation n'est pas bien décrit. D'autres inhibiteurs de la désacétylase, tels que la TSA (trichostatine A) et la SAHA (acide surohoylanilide hyroxamique), augmentent l'efficacité de la



	Traitement	Effet
Petite molécules inhibitrices	Acide valproïque	Inhibition de l'histone désacétylase
	Sodium butyrate	Inhibition de l'histone désacétylase
	PD0325901	Inhibition de MEK
	A-83-01	Inhibition de TGFβ
	SB43152	Inhibition de TGFβ
Autres	Vitamine C	Modification épigénétique des régions régulatrices et effets antioxydants
	Thiazovivine	Inhibition de ROCK, favorisation de la survie cellulaire
	PS48	Activation de PI3K/Akt, favorisation de la glycolyse
	Oxygène (5%)	Favorisation de la glycolyse

Tableau 9 : Composés qui augmentent l'efficacité de génération des cellules iPS (inspiré de Malik, *et al.*,2013).

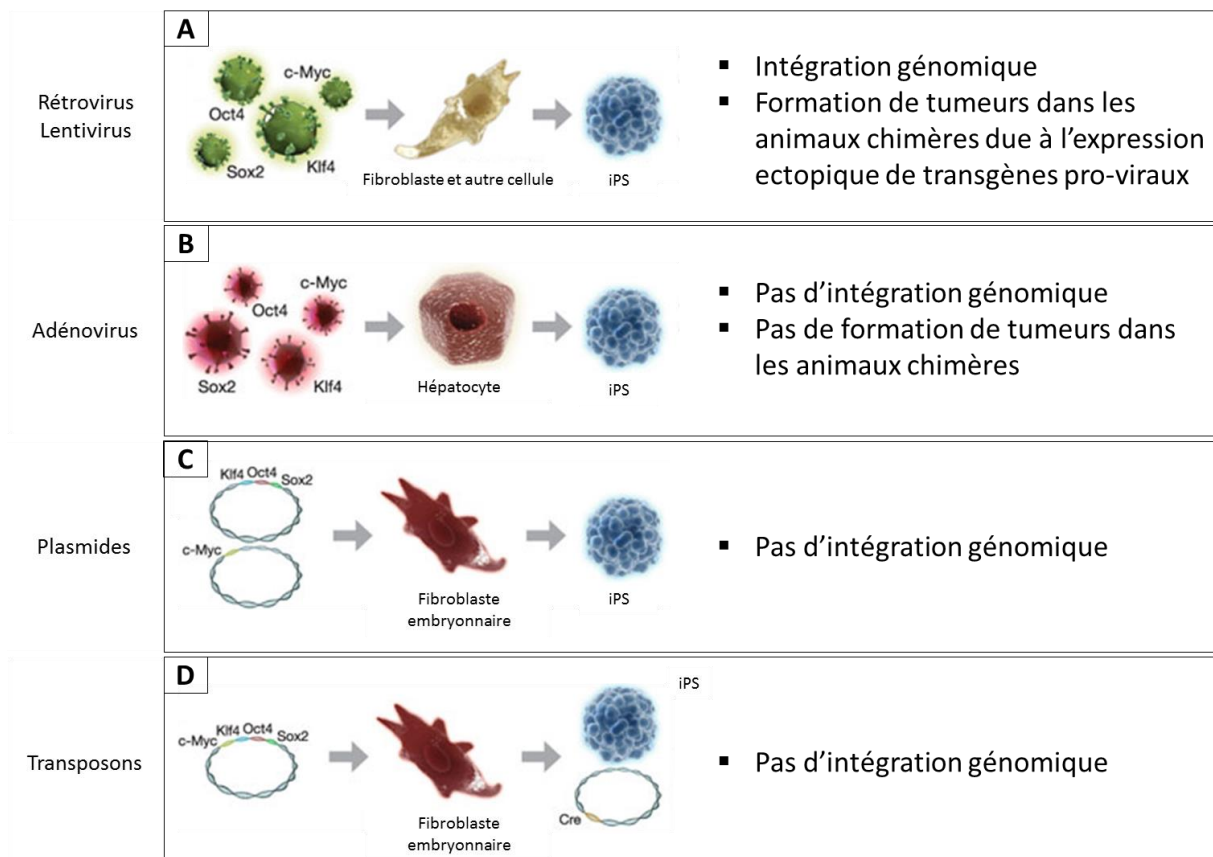


Figure 29 : Méthodes de génération des cellules iPS. A : Transduction des cellules primaires par des rétrovirus ou des lentivirus. B : Transduction par des adénovirus. C : Transfection avec des plasmides. D : Transfection basée sur l'utilisation de transposons (d'après <http://www.sabiosciences.com>).

reprogrammation (Huangfu *et al.*, 2008a). L'acide ascorbique (vitamine C) peut influencer l'efficacité de production des cellules iPS à partir de divers types de cellules somatiques murines et humaines (Esteban *et al.*, 2010). De nombreuses autres molécules chimiques (butyrate, inhibiteur de la voie TGF $\beta$ , et autres inhibiteurs chimiques) peuvent soutenir la reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS (Ichida *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009, Lyssiotis *et al.*, 2009, Liang *et al.*, 2010). Récemment, des cellules miPS ont été générées en utilisant exclusivement une combinaison de sept petites molécules sans recours aux transgènes (Hou *et al.*, 2013). Certaines molécules chimiques utilisées dans le but d'optimiser l'efficacité de la reprogrammation et leur effet sur les voies de signalisation intracellulaire sont résumées dans le tableau 9.

#### D. Evolution des techniques de reprogrammation

##### 1. Méthodes de reprogrammation et vecteurs intégratifs

Afin de reprogrammer des cellules somatiques déjà engagées dans une voie de différenciation, il a fallu induire l'expression de facteurs de transcription choisis dans les cellules hôtes. Cette expression forcée s'est premièrement réalisée au moyen de vecteurs intégratifs : rétrovirus ou lentivirus (Takahashi & Yamanaka, 2006, Sommer *et al.*, 2009) (Figure 29A). Par ce mode de reprogrammation, il y a un risque d'expression résiduelle ou de réactivation potentielle non désirées des transgènes ainsi qu'un risque de mutagenèse insertionnelle, ou d'immunogénicité (Okita *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2011) (Figure 29A). En effet, l'insertion aléatoire des transgènes dans le génome peut venir perturber l'expression d'un gène. Ils peuvent s'insérer dans le gène lui-même, généralement le cas des vecteurs lentiviraux, ou de ses régions régulatrices, ce qui est plus fréquemment observé avec les vecteurs rétroviraux. Pour ce qui est de l'expression résiduelle ou de l'éventuelle réactivation, le facteur de transcription c-Myc pose particulièrement problème. La réactivation de cet oncogène, après différenciation des cellules iPS en cellules d'intérêt, peut conduire à la formation de tumeurs (Okita *et al.*, 2007) (Figure 29A). Les lentivirus semblent néanmoins avoir un profil d'intégration génomique plus sûr que celui des rétrovirus. Malgré tout, l'intégration dans le génome qu'implique ce type de reprogrammation compromet une utilisation thérapeutique des cellules iPS.

##### 2. Méthodes de reprogrammation sans modification du génome

D'autres approches ont donc été proposées pour s'affranchir des problèmes liés à l'intégration des rétrovirus et des lentivirus. On distingue les stratégies de reprogrammation transgénique et chimique. En ce qui concerne la reprogrammation transgénique, elle repose sur le transfert soit de la séquence en ADN, en ARN ou du produit du gène directement.



- ADN

Les transferts d'ADN sont les plus utilisés et sont de trois types : les particules virales, les transposons et les plasmides (Figure 29). Pour contrer les effets indésirables de l'utilisation des particules virales intégratives, des équipes ont rapporté l'utilisation de plasmides (et plasmide épisomal) (Yu *et al.*, 2007, Okita *et al.*, 2008, Chou *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2012a), de vecteurs excisables (Sommer *et al.*, 2010), de transposons (Woltjen *et al.*, 2009), de vecteurs viraux non intégratifs (Stadtfield *et al.*, 2008, Zhou & Freed, 2009) et de vecteurs non viraux et non intégratifs (Yu *et al.*, 2009, Jia *et al.*, 2010, Narsinh *et al.*, 2011a). Yamanaka et son équipe décrivent en 2008 la génération de cellules miPS sans utiliser de vecteurs viraux. Ils ont effectué pour cela des transfections quotidiennes de deux plasmides d'expression, l'un contenant les ADN complémentaires (ADNc) de Oct3/4, Sox2 et Klf4 et l'autre contenant celui de c-Myc, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, ce qui a conduit à l'apparition de lignées de cellules iPS sans intégration de plasmides (Okita *et al.*, 2008). L'utilisation des adénovirus qui ne s'intègrent pas dans le génome cellulaire et qui ne sont présents que transitoirement dans les cellules, le temps d'exprimer les gènes de reprogrammation, a également été publiée (Stadtfield *et al.*, 2008, Zhou & Freed, 2009).

Des équipes ont fait appel au système transposon de type piggyBac (PB) (Kaji *et al.*, 2009, Woltjen *et al.*, 2009). Elles ont démontré que le système transposon de type PB peut être utilisé pour induire l'expression de gènes de la pluripotence dans une cellule hôte ainsi que leur reprogrammation en cellules iPS, puis pour éliminer les transgènes des lignées iPS établies (Kaji *et al.*, 2009, Woltjen *et al.*, 2009). Le transposon PB est ainsi un élément génétique mobile qui transpose efficacement vecteurs et chromosomes en l'intégrant dans le génome au niveau des séquences TTAA par un mécanisme de type "coupé et collé". L'élément PB peut ensuite être retiré du génome en transfectant les cellules de manière transitoire avec une transposase d'excision, et l'ADN est ensuite réparé avec l'ADN ligase. Cette méthode semble être une méthode prometteuse pour reprogrammer les cellules iPS de souris, mais il n'existe aucune étude publiée montrant que le vecteur peut être excisé des cellules hiPS ou que des cellules autres que les cellules souches mésenchymateuses puissent être correctement reprogrammées. Soldner et collaborateurs ont utilisé le système de recombinaison Cre/loxP pour produire des cellules hiPS dépourvues de gènes de reprogrammation exogènes (Soldner *et al.*, 2009). Les gènes codant pour des facteurs de la pluripotence sont insérés dans le génome des cellules à modifier. Une fois la reprogrammation réalisée, l'expression d'une enzyme va exciser les gènes ajoutés. Cette méthode peut être utilisée pour éliminer tout risque lié à la présence d'oncogènes tels que c-Myc et Klf4.

Le matériel génétique exogène apporté aux cellules tend à se diluer au fil des divisions mitotiques pour finalement disparaître totalement. C'est aussi pourquoi une administration répétée de matériel génétique exogène est requise. L'inconvénient majeur de ces méthodes de reprogrammation, qui s'affranchissent du phénomène d'insertion, est leur très faible efficacité (Malik & Rao, 2013).



## • ARN

Une autre procédure recourt à l'emploi d'ARN viraux pour reprogrammer les cellules somatiques en cellules iPS. Le risque de mutagenèse insertionnelle est nettement diminué voire inexistante (Fusaki *et al.*, 2009, Ban *et al.*, 2011, Nishimura *et al.*, 2011). Le virus de Sendai a la propriété avantageuse d'être un virus à ARN. Il ne comporte aucun risque d'intégration dans le génome de l'hôte. C'est donc une solution d'intérêt pour générer efficacement les cellules iPS. Ainsi, il n'entre pas dans le noyau, produit de grandes quantités de protéines, et finit par se diluer environ 10 passages après la transduction. Les virus de Sendai génèrent efficacement des cellules hiPS à partir de fibroblastes humains et de cellules sanguines humaines (Fusaki *et al.*, 2009, Seki *et al.*, 2010). Bien que ces virus soient lentement dilués lors des divisions cellulaires, une solution définitive pour l'éliminer rapidement une fois la cellule reprogrammée serait préférable. Une étude a proposé une solution pour l'élimination du virus et sa réplication cytoplasmique, en utilisant un anticorps anti-SeV-HN (Fusaki *et al.*, 2009). L'avantage de l'approche de la reprogrammation par le virus de Sendai est qu'il nécessite beaucoup moins de cellules primaires au départ (environ  $1.10^4$ ) que d'autres méthodes (Beers *et al.*, 2015). Cette méthode montre ainsi une efficacité de reprogrammation élevée et nécessite une seule procédure de transduction (Malik & Rao, 2013).

D'autres techniques efficaces qui s'affranchissent de l'utilisation de virus ont également été développées, comme l'utilisation d'ARNm synthétiques (Warren *et al.*, 2010), des micro-ARN (Miyoshi *et al.*, 2011), de protéines cellulaires (Zhou *et al.*, 2009) ou de petits composés moléculaires. La transfection d'ARNm codant pour des facteurs de reprogrammation offre une autre alternative pour générer des cellules iPS sans modification du génome de la cellule hôte. Warren et son équipe ont reprogrammé avec succès des fibroblastes humains en utilisant des ARNm synthétiques codant pour les quatre facteurs canoniques de Yamanaka, OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (Warren *et al.*, 2010). Néanmoins, cette méthode reste laborieuse puisqu'elle réclame une transfection quotidienne en durant 7 jours au moins (Malik & Rao, 2013).

Plusieurs familles de micro-ARN sont fortement exprimées dans les cellules souches embryonnaires. Certains d'entre eux peuvent reprogrammer des cellules efficacement sans la présence des facteurs de Yamanaka nécessairement (Anokye-Danso *et al.*, 2011, Miyoshi *et al.*, 2011, Subramanyam *et al.*, 2011). Cependant, il n'y a pas eu d'études publiées reproduisant les résultats obtenus avec l'une des trois méthodes de reprogrammation basée sur l'utilisation d'un ensemble spécifique de micro-ARN (Malik & Rao, 2013). Il est alors difficile de conclure sur la robustesse de cette méthode de reprogrammation.

## • Protéines

L'utilisation de protéines comme facteurs de reprogrammation serait une méthode idéale pour générer des cellules iPS sans apport de matériel génétique exogène. Deux études ont été publiées à ce jour dans lesquelles des cellules miPS et hiPS ont été générées en utilisant les protéines recombinantes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (Kim *et al.*, 2009a, Zhou *et al.*, 2009). Malheureusement, il

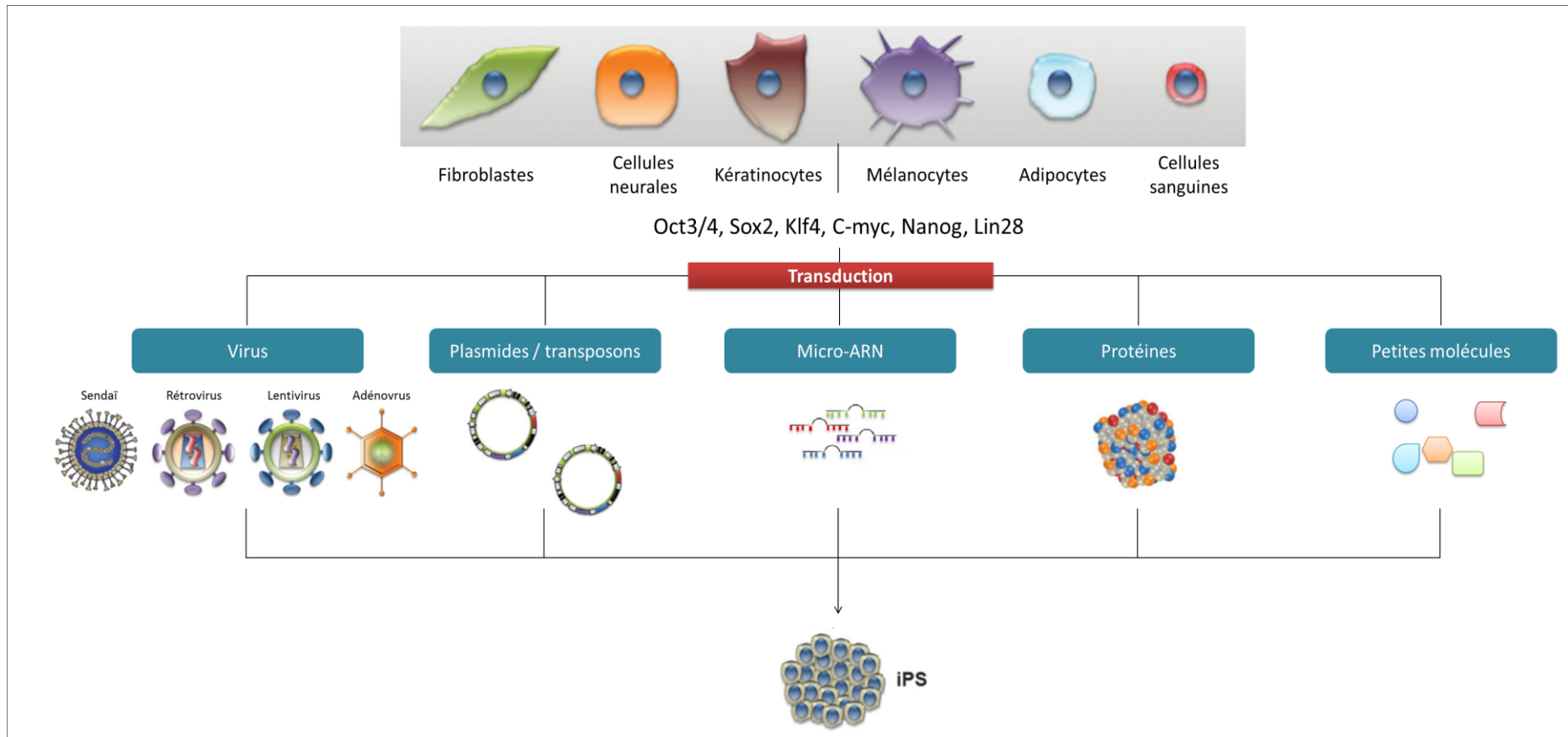


Figure 30 : Sources de cellules somatiques et méthodes utilisées pour générer les cellules iPS.

est techniquement difficile de synthétiser de grandes quantités de protéines bioactives stables qui peuvent traverser la membrane plasmique. Les deux seules études publiées ont montré une très faible efficacité de reprogrammation chez la souris comme chez l'Homme (Kim *et al.*, 2009a, Zhou *et al.*, 2009).

Par conséquent, la reprogrammation au moyen de vecteurs intégratifs, tout type cellulaire et toute espèce confondus, reste la plus efficace face aux tentatives de reprogrammations réalisées à l'aide de vecteurs non-intégratifs. Les techniques ayant le meilleur rapport sécurité/efficacité sont actuellement les plasmides et les ARN. Les méthodes de reprogrammation se basant sur l'utilisation d'ARNm et de micro-ARN semblent plus que prometteuses puisqu'elles permettent de concilier efficacité de reprogrammation et espoir thérapeutique. Ainsi, cette nouvelle possibilité de générer des iPSC sans altération du génome de la cellule hôte laisse envisager, avec moins de préoccupation, une éventuelle utilisation de cellules iPS dans le cadre de la médecine régénératrice. Le résumé des stratégies de reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS est représenté dans la Figure 30 et leurs efficacités à partir de fibroblastes humains dans le Tableau 10 (Okita & Yamanaka, 2011).

## **E. Les cellules hiPS : une alternative aux cellules hES ?**

### **1. Des caractéristiques comparables aux cellules souches embryonnaires**

Malgré la différence d'origine et la stratégie d'obtention, les cellules iPS sont similaires aux cellules ES sur de nombreux aspects : morphologie cellulaire, expression de marqueurs de la pluripotence (Oct4 et Nanog), forte activité phosphatase alcaline. Les critères de pluripotence des cellules iPS sont les mêmes que ceux des cellules ES : auto-renouvellement illimité, formation de corps embryonnaires *in vitro* et de tératomes après injection à des souris immunodéficientes ainsi que l'obtention de souris chimériques après injection des cellules dans un blastocyste (Narsinh *et al.*, 2011b). L'un des avantages indéniables des cellules hiPS est que leur utilisation n'est pas sujette à controverses éthiques. De plus, elles représentent une source presque illimitée de la plupart des types cellulaires, offrant ainsi un grand potentiel pour les thérapies cellulaires et les modélisations *in vitro*.

Contrairement à leurs homologues chez la souris (mES), les cellules hiPS comme les hES semblent être des cellules souches à l'état amorcé de la pluripotence, soit similaires aux cellules mEpiSC (Buecker & Geijsen, 2010, Hirai *et al.*, 2011). Elles conservent un grand nombre de caractéristiques de l'état amorcé de la pluripotence : culture en présence de FGF2, niveaux d'expression faibles de certains marqueurs de la pluripotence naïve [tels que KLF17 et DPPA3 (developmental pluripotency-associated protein 3)], présence de marque épigénétique d'extinction d'expression sur des gènes de développement, perte de la pluripotence suite à l'inhibition de la signalisation MEK-ERK, absence d'hypométhylation globale et présence d'inactivation du chromosome X (Hirai *et al.*, 2011, Mekhoubad *et al.*, 2012, Gafni *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2014).



Type de vecteur		Intégration génomique	Facteurs *	Efficacité de la reprogrammation sur fibroblastes humains	Références
Virus	rétrovirus	+	OSKM	++++	<i>Takahashi et al., 2007</i>
	Lentivirus	+	OSNL	+++	<i>Yu et al., 2007</i>
	Adénovirus	- <sup>a</sup>	OSKM	+	<i>Zhou et al., 2009</i>
	Virus de Sendai	- <sup>b</sup>	OSKM	++++	<i>Fusaki et al., 2009</i>
ADN	Plasmide épisomal	- <sup>a</sup>	OSKMNLT	+	<i>Yu et al., 2009</i>
	Transposon	- <sup>a, c</sup>	OSKM	++	<i>Woltjen et al., 2009</i> <i>Kaji et al., 2009</i>
	Mini-cercle	- <sup>a</sup>	OSNL	+	<i>Jia et al., 2010</i>
ARN	ARNm	-	OSKM	+++	<i>Warren et al., 2010</i>
Protéine	Protéine	-	OSKM	+	<i>Kim et al., 2009</i>

**Tableau 10** : Méthodes d'induction des cellules iPS dans les fibroblastes humains (d'après Okita & Yamanaka, 2011).

<sup>a</sup> L'absence d'intégration génomique devrait être vérifiée expérimentalement.

<sup>b</sup> L'élimination des virus ARN devrait être vérifiée expérimentalement.

<sup>c</sup> Le vecteur Transposon est intégré au génome, mais il peut être supprimé.

\* O: OCT3/4; S: SOX2; K: KLF4; M: C-MYC; N: NANOG; L: LIN28; T: SV40-large T antigen.

## 2. Les cellules iPS sont-elles différentes des cellules ES ?

Les cellules iPS semblent cependant montrer un profil global d'expression des gènes différent des cellules ES. Chin et collaborateurs ont comparé trois lignées de cellules hES et cinq lignées de cellules hiPS par micro-array d'expression et ont identifié des centaines de gènes qui étaient exprimés différemment (Chin *et al.*, 2009). Des analyses du génome entier de lignées iPS et ES ont montré que ces deux types de cellules pluripotentes partageaient des motifs de méthylation similaires mais également des régions différemment méthylées (Deng *et al.*, 2009). Une étude, réalisée sur un plus grand nombre de lignées (20 ES et 12 iPS), a montré à l'inverse que les cellules iPS et ES sont très similaires dans leur profil d'expression génique et de méthylation de l'ADN, rendant difficile leur distinction (Bock *et al.*, 2011)

Comme mentionné précédemment, une mémoire épigénétique liée au tissu d'origine des cellules a été constatée. Ainsi, il n'est pas étonnant de pouvoir constater une différence en terme de méthylation de l'ADN d'une cellule iPS à l'autre et comparé aux cellules ES. En plus des variations dans l'expression de certains gènes et de la méthylation de l'ADN, des anomalies de type mutations, CNV et immunogénicité ont également été mises en évidence (Gore *et al.*, 2011, Hussein *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2011). Les différences entre ES et iPS peuvent être très importantes si la comparaison des types cellulaires est réalisée trop tôt après dérivation des iPS et avant leur stabilisation, soit avant "effacement" des marques épigénétiques de la cellule d'origine.

Différents mécanismes ont été décrits dans la survenue de l'instabilité génomique des cellules iPS : la reprogrammation elle-même pourrait induire des dommages de l'ADN. Il existerait une instabilité intrinsèque aux cellules iPS et enfin leur expansion *in vitro* favoriserait la survenue de mutations (Blasco *et al.*, 2011). Des analyses cytogénétiques ont montré que les cellules hiPS et hES sont susceptibles d'acquérir des trisomies des chromosomes 8, 10q, 11, 11q, 12, 14q, 16q et 17q, mais aussi des translocations robertsoniennes, des variations du nombre de copies (gain ou perte) (Mayshar *et al.*, 2010, Amps *et al.*, 2011, Taapken *et al.*, 2011, Steinemann *et al.*, 2013, Tosca *et al.*, 2015). En outre, les cultures de cellules iPS humaines sont susceptibles de subir des changements chromosomiques au cours des passages cellulaires précoces et tardifs (Ishii, 2014, Tosca *et al.*, 2015). Les facteurs environnementaux peuvent influencer le comportement génomique des cellules pluripotentes *in vitro*, tels que les milieux de culture, la couche nourricière ou les méthodes de dissociation utilisées pour le passage des cellules (Tosca *et al.*, 2015). Au cours des passages mécaniques (manuels), les colonies sont coupées en petits morceaux contrairement aux méthodes enzymatiques qui dissocient les cellules entre elles. Les plus agressives sont basées sur l'utilisation de la trypsine, responsable d'un fort niveau de mutations. Cependant, le passage enzymatique est plus efficace pour générer un nombre suffisant de cellules pluripotentes (Kim *et al.*, 2012). Le nombre des anomalies génétiques identifiées au sein des cellules iPS pourraient également provenir des cellules somatiques utilisées pour la reprogrammation (Cheng *et al.*, 2012b, Young *et al.*, 2012). De plus, les discordances observées entre ces deux types de cellules pluripotentes pourraient tout aussi bien dériver des différences d'induction et du type de culture utilisé. En ce qui concerne leur potentiel de différenciation, il a été démontré que les deux types de



cellules suivent les mêmes étapes au cours de leur différenciation par exemple vers des cellules neurales (Hu *et al.*, 2010). Lors de la différenciation en cellules neuronales, les cellules iPS se différencient avec une efficacité plus faible et une plus grande variabilité (Hu *et al.*, 2010). Quoi qu'il en soit, une évaluation et une sélection des clones iPS seraient essentielles pour identifier ce qui conviendrait aux applications médicales. Par conséquent, concernant la similitude entre les cellules iPS et les ES, le débat reste ouvert.

### 3. Intérêt des cellules iPS en recherche et en thérapie cellulaire

Les cellules iPS présentent un avantage certain en terme de statut immunitaire et de bioéthique. La possibilité d'établir une lignée spécifique d'un patient, sans réaction immunitaire en cas d'utilisation thérapeutique, représente un espoir de taille pour la transplantation autologue et la thérapie cellulaire. Cela permettrait en effet d'éviter les rejets de greffe sans avoir recours aux immunosuppresseurs. Par ailleurs, l'origine et les propriétés des cellules iPS, notamment pour modéliser des maladies génétiques ou acquises permettent une meilleure compréhension des pathologies concernées. Un atout supplémentaire est de ne pas présenter de problèmes éthiques. Ces cellules représentent un remarquable outil d'étude des mécanismes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. Elles sont également particulièrement précieuses pour le criblage de molécules pharmacologiques.

Plusieurs études ont décrit la génération de cellules iPS de patients atteints de maladies génétiques. Des fibroblastes de peau ainsi que des cellules mésenchymateuses de moelle osseuse ont été utilisées pour dériver des cellules iPS de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, d'atrophie musculaire spinale, de la maladie de Parkinson, de la maladie de Huntington ou encore du syndrome de Down (Trisomie 21) (Dimos *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008a, Ebert *et al.*, 2009).

Il a été rapporté que des cellules iPS générées à partir de fibroblastes humains et murins peuvent se différencier en cardiomyocytes fonctionnels qui présentent des potentiels d'action cardiaques caractéristiques (Mauritz *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2009). Une autre étude, publiée en 2010 par Yamanaka, a montré qu'il est possible de reprogrammer des cellules iPS en cellules hépatiques fonctionnelles capables de régénérer le foie d'une souris amputé aux deux tiers, ou un foie gravement atteint d'un déficit génétique (Espejel *et al.*, 2010).

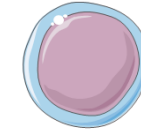
### 4. Différenciation des cellules hiPS

Depuis l'avènement de la technologie des cellules souches pluripotentes induites il y a dix ans, des progrès énormes ont été réalisés dans le domaine de la recherche sur les cellules souches et la médecine régénérative (Shi *et al.*, 2017).

Chez l'homme, les cellules iPS ont permis d'élucider de nouveaux mécanismes pathologiques (Shi *et al.*, 2017). Par exemple, des cellules neuronales dérivées de cellules hiPS ont été utilisées pour modéliser la pathologie de la sclérose latérale amyotrophique. Ces travaux ont conduit à l'identification



Cellules hES



Cellules hiPS

	/	Reprogrammation à partir de cellules somatiques = source illimitée
	Lignée immortelle (auto-renouvellement)	Lignée immortelle (auto-renouvellement)
+	Modélisation <i>in vitro</i>	Modélisation <i>in vitro</i>
	Cribles pharmacologiques et génétiques	Cribles pharmacologiques et génétiques
	/	Immunohistocompatibilité = évite le rejet immunitaire
	/	Pas de limitation éthique
-	Dérivation = destruction d'embryon	/
	Limitation éthique	/
	Instabilité génomique	Instabilité génomique
	Propension à se transformer en cellules tumorales (tératome)	Propension à se transformer en cellules tumorales (tératome)
	/	Utilisation d'oncogène pour la reprogrammation

Figure 31 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des cellules hES et hiPS en recherche.

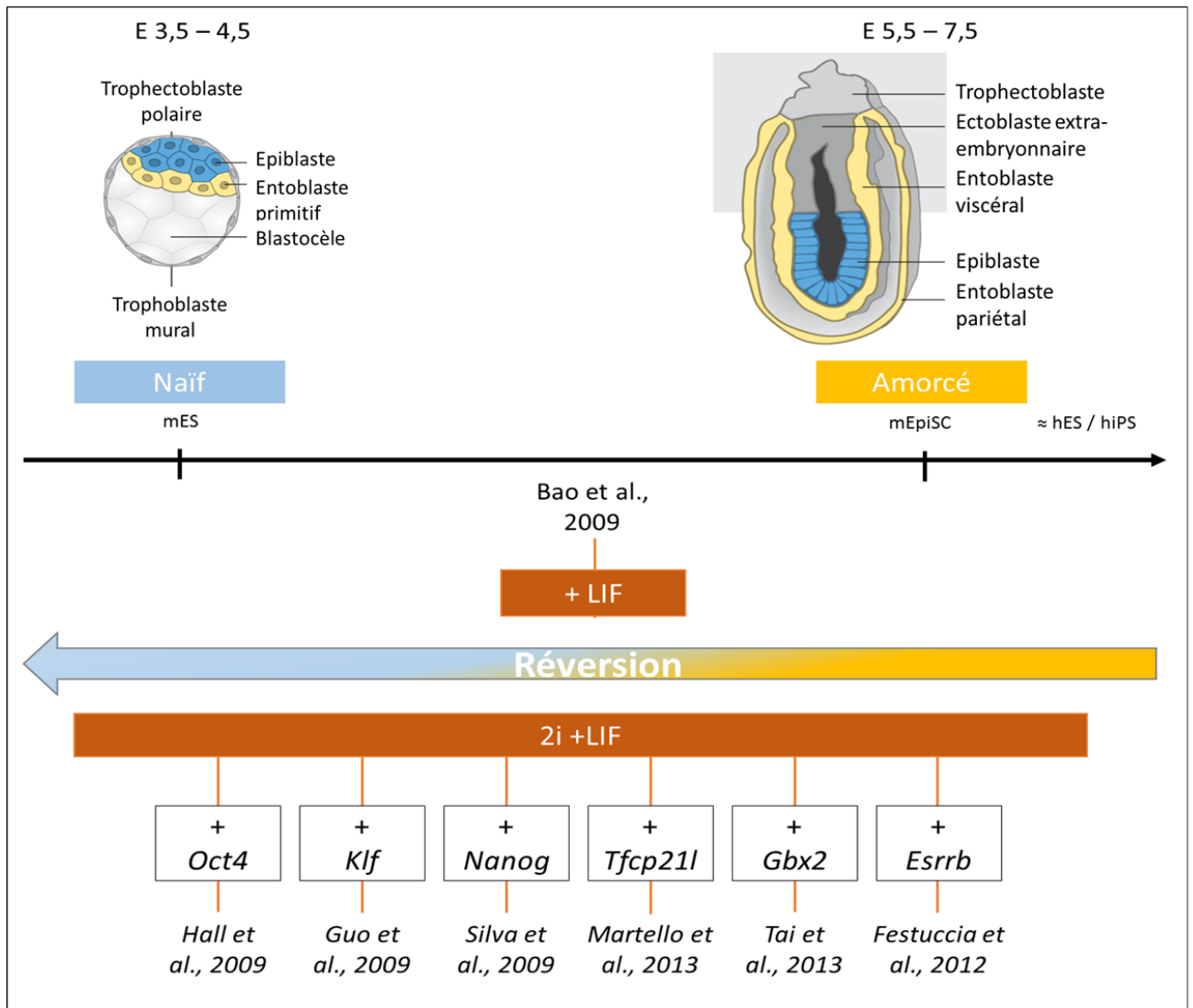
des astrocytes comme composant cellulaire critique contribuant à la dégénérescence des neurones moteurs dans la pathologie (Marchetto *et al.*, 2008, Haidet-Phillips *et al.*, 2011). Par ailleurs, de nouveaux médicaments provenant de criblages sur cellules iPS sont en préparation et le premier essai clinique prometteur utilisant des produits issus de cellules hiPS a été initié (Yamashita *et al.*, 2014, Shi *et al.*, 2017). L'étude en question a utilisé des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine dérivées à partir de cellules hiPS pour traiter la dégénérescence maculaire (Kimbrel & Lanza, 2015, Scudellari, 2016). Le traitement a démontré une amélioration de la vision du patient (Kimbrel & Lanza, 2015, Scudellari, 2016). L'étude a cependant été temporairement arrêtée en raison de l'identification de deux variants génétiques dans les cellules iPS chez un second patient. La greffe de cellules souches issues de banque de cellules hiPS représente ainsi une option prometteuse pour le futur. Néanmoins, les anomalies observées à l'issue de la reprogrammation et de la différenciation (instabilité génétique, risque de transformation maligne, variabilité de différenciation...) demandent à être maîtrisées avant de progresser vers leur utilisation en thérapie. Les points forts et les points faibles que présentent l'utilisation des cellules hES et hiPS sont présentés dans la figure 31.

Chez l'homme, l'inaccessibilité aux ovocytes et aux embryons pour des raisons éthiques a beaucoup limité la recherche et la connaissance sur les processus fondamentaux de la gamétogenèse. Reproduire les premiers stades de la gamétogenèse *in vitro* en générant des cellules germinales à partir de cellules hiPS en laboratoire améliorerait considérablement notre compréhension des bases de la reproduction humaine. Par ailleurs, la recherche sur les cellules germinales humaines dérivées de cellules hiPS constitue une plate-forme précieuse pour la modélisation de l'infertilité et des anomalies congénitales difficiles à étudier sur des modèles animaux du fait des différences morphologiques, fonctionnelles et développementales évidentes qui existent entre l'homme et les autres espèces.

## **II. Différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules de la lignée germinale**

### **A. IPS et état naïf de la pluripotence : un entretien et une spécification plus efficace**

Le fait que les cellules pluripotentes amorcées ne parviennent pas à former des souris chimériques lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste pourrait être dû à leur potentiel de différenciation limité. Il a donc semblé évident que pour optimiser le processus de différenciation *in vitro*, le passage à l'état naïf de la pluripotence serait avantageux. Ainsi, la capacité de différenciation limitée des cellules iPS à l'état amorcée est améliorée par la conversion de ces cellules vers un état naïf. De nombreuses études ont démontré qu'il était possible de reprogrammer des cellules iPS de l'état amorcé vers un état naïf, équivalent à celui des cellules mES (Figure 32). Ce processus dépend principalement de l'activation des voies de signalisation LIF/STAT3, BMP/SMAD et WNT/  $\beta$ -catenin et de la répression des voies MEK/ERK, SCR et MAPK (Ying *et al.*, 2003, Lin *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2012, van Oosten *et al.*, 2012). La signalisation JAK/STAT3 stimulée par le LIF est connue pour être indispensable à l'état naïf des cellules souches pluripotentes.



**Figure 32 :** Stratégies utilisées afin d'induire la réversion d'un état amorcé (mEpiSC) vers un état naïf de la pluripotence (mES) chez la souris. *Esrrb* : Estrogen-related receptor b ; *Gbx2* : gastrulation brain homeobox 2; *Klf* : Kruppel-Like Factor; *Nanog* : Nanog homeobox; *Oct4* ou *Pou5f1* : POU domain, class 5, transcription factor 1; *Tfcp21l* : transcription factor CP2-like 1.

Pour se faire, certains travaux ont couplé la surexpression transitoire de gènes, tels que *Nanog*, *Oct4*, *Klf4*, *Esrrb* (Estrogen-related receptor b), des gènes cibles de la voie LIF/STAT3 (Tfcp2l1 et Gbx2) dans les cellules iPS à l'état amorcé, induisant leur réversion vers un état naïf de pluripotence (Guo *et al.*, 2009, Hall *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2009, Festuccia *et al.*, 2012, Martello *et al.*, 2013, Tai & Ying, 2013) (Figure 32). Néanmoins, d'autres équipes ont prouvé que cette réversion pouvait s'effectuer spontanément lorsque les cellules pluripotentes amorcées sont placées dans un milieu favorisant la dérivation des cellules de type épiblastique post-implantation. Bao et son équipe ont démontré que la culture de cellules épiblastiques de souris dans un milieu ES standard avec LIF et du sérum de veau fœtal sur des cellules nourricières induit leur réversion vers un état naïf (Bao *et al.*, 2009). La voie LIF/STAT3 joue un rôle central dans la réversion des cellules EpiSC en cellules mES. Les principales stratégies de réversion des cellules souches pluripotentes amorcées vers un état naïf de la pluripotence sont résumées dans la figure 32.

Plusieurs rapports récents montrent la stabilisation de l'état naïf de la pluripotence sans transgène en utilisant des inhibiteurs de voies de signalisation spécifiques. Ainsi, de nombreux inhibiteurs ont été jugés nécessaires pour induire cette réversion vers un état naïf de la pluripotence. Parmi ces inhibiteurs, CHIR99021 et PD0325901 (2i), qui activent respectivement la voie de signalisation WNT et inhibent la voie MEK/ERK, ont ainsi montré leur capacité à améliorer efficacement le processus de reprogrammation des cellules souches en cellules naïves (Hanna *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2013, Takashima *et al.*, 2014, Valamehr *et al.*, 2014, Theunissen *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014, Ware *et al.*, 2014, Duggal *et al.*, 2015). En utilisant encore une autre condition de culture naïve (4i/LIF), une stratégie comprenant l'ajout des inhibiteurs des voies JNKi (SP600125) et p38i (SB203580), a montré son efficacité dans la réversion de l'état amorcée de la pluripotence vers un état naïf marquée par une conservation de caractéristiques moléculaires et propriétés fonctionnelles très similaires aux cellules mES naïves (Gafni *et al.*, 2013, Irie *et al.*, 2015).

Chez l'homme, la réversion des cellules hiPS de l'état amorcé à naïf a ainsi principalement été réalisée en milieu 2i/LIF couplé à l'utilisation de petites molécules, de protéines recombinantes ou en forçant l'expression de gènes spécifiques tels que OCT4, KLF2, KLF4 et NANOG (Hanna *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2013, Gafni *et al.*, 2013, Theunissen *et al.*, 2014, Takashima *et al.*, 2014, Valamehr *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014, Ware *et al.*, 2014, Duggal *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2016, Carter *et al.*, 2016). Les méthodes utilisées sont résumées dans le Tableau 11. Une autre étude chez le porc a montré que l'ajout des 2i peut ouvrir la voie à la génération de la lignée germinale (Rodriguez *et al.*, 2012).

## **B. Différenciation des cellules souches pluripotentes vers la lignée germinale**

Depuis 1950, le taux de fertilité à l'échelle mondiale a continuellement baissé selon différents rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ce qui a conduit en 2010 à une révision à la baisse des normes de qualité des spermatozoïdes (dont concentration, morphologie, mobilité et vitalité) (cf chapitre 1). Ces dernières années, plusieurs laboratoires ont réussi à imposer un destin germinal aux cellules ES et iPS chez la souris comme chez l'homme (Tosca *et al.*, 2011, Mouka *et al.*, 2016).



Référence	Méthode utilisée	Milieu
<i>Hanna et al., 2010</i>	Induction ectopique (soutenue ou transitoire) de Oct4, Klf4 et Klf2	LIF/2i ou LIF/2i/FK ou LIF/2i
<i>Gafni et al., 2013</i>	Petites molécules	LIF/2i/bFGF/TGFβ/JNKi/p38i/ROCKi
<i>Chan et al., 2013</i>	Petites molécules	LIF/2i/ROCKi
<i>Takashima et al., 2014</i>	Induction ectopique (soutenue ou transitoire) de NANOG et KLF2	LIF/2i/ PKCi
<i>Valamehr et al., 2014</i>	Petites molécules	LIF/2i/bFGF
<i>Theunissen et al., 2014</i>	Sélection basée sur l'activité distale de l'enhancer d'OCT4	LIF/5i/bFGF/ ActivinA
<i>Wang et al., 2014</i>	Sélection des cellules exprimant HERVH	LIF/2i/bFGF
<i>Ware et al., 2014</i>	Petites molécules	2i/bFGF
<i>Duggal et al., 2015</i>	Petites molécules	LIF/2i/bFGF/FK/AA
<i>Yang et al., 2016</i>	Petites molécules	LIF/5i/bFGF/ActivinA
<i>Carter et al., 2016</i>	Protéines recombinantes	NME7AB

**Tableau 11** : Résumé des différents protocoles utilisés pour générer des cellules souches pluripotentes humaines naïves. 2i : GSK3i (CHIR99021), MEKi (PD0325901); 5i : PD0325901/IM12/BRAFi/ROCKi/SRCi. AA : Acide Ascorbique; BRAFi : Inhibiteur de la voie B-Raf kinase; GSK3i : Inhibiteur de la voie GSK3; Forskolin (FK) : agoniste de la voie PKA; IM12 : Inhibiteur de GSK; MEKi : inhibiteur de la voieMEK/ERK; NME7 : Facteur de croissance qui supporte le stade précoce de l'état naïf; PKCi : Inhibiteur de la voie PKC; ROCKi : inhibiteur de ROCK; SRCi : Inhibiteur de la voie de SRC.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour enrichir les cultures en CGP, moduler l'environnement cellulaire en mimant le microenvironnement *in vivo* ou en forçant l'expression de gènes clés (transfert de gènes). Chez l'homme, la cellule germinale primordiale représente la première étape de la différenciation germinale. La formation des CGP est une étape critique de l'embryogenèse des mammifères pour assurer une fertilité normale.

Dans la revue qui suit, sont résumées les différentes stratégies expérimentales utilisées pour obtenir des cellules germinales mâles et femelles à partir des cellules souches pluripotentes (ES et iPS) chez la souris comme chez l'homme. L'identification des marqueurs moléculaires et de surface a permis de définir les bases moléculaires de l'identité des cellules souches pluripotentes et des premières stades de la gamétogenèse (germinales primordiales précoce et tardive, cellules germinales en méiose et post-méiotiques). Ces connaissances acquises dans le domaine de la différenciation germinale serviront de base pour l'élaboration d'un protocole de différenciation germinale à partir de cellules pluripotentes induites humaines.



## REVUE

### ***In Vitro* Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility**

Mouka Aurélie, Tachdjian Gérard, Dupont Joelle, Drévilon Loïc, Tosca Lucie.

Stem cells and developement. 2016; 25(7):509-21



# In Vitro Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility

Aurélié Mouka,<sup>1,2</sup> Gérard Tachdjian,<sup>1,2</sup> Joëlle Dupont,<sup>3</sup> Loïc Drévilion,<sup>1</sup> and Lucie Tosca<sup>1,2</sup>

Generation of gametes derived in vitro from pluripotent stem cells holds promising prospects for future reproductive applications. Indeed, it provides information on molecular and cellular mechanisms underlying germ cell (GC) development and could offer a new potential treatment for infertility. Great progress has been made in derivation of gametes from embryonic stem cells, despite ethical issues. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology allows the reprogramming of a differentiated somatic cell, possibly emanating from the patient, into a pluripotent state. With the emergence of iPSCs, several studies created primordial GC stage to mature gamete-like cells in vitro in mice and humans. Recent findings in GC derivation suggest that in mice, functional gametes can be generated in vitro. This strengthens the idea that it might be possible in the future to generate functional human sperm and oocytes from pluripotent stem cells in culture.

## Introduction

INFERTILITY IS A major public health concern affecting 10%–15% of reproductive age couples in the world [1]. The reasons for infertility can involve one or both partners: in about one-third of cases, it concerns the man, another one-third the woman, and one-third infertility affects both, or no cause can be identified [1].

Significant progress has been realized in the treatment of human infertility. However, artificial reproduction techniques (ARTs) cannot offer an answer for all causes of infertility. Knowledge concerning early stages of gamete development is rather poor. Indeed, therapeutic methods are missing, particularly for gametogenesis abnormalities. A human model of in vitro gametogenesis from stem cells would have a significant impact on evolution of fundamental knowledge and on the development of adapted therapies. Thus, obtaining male and female gametes in vitro could modify current ARTs and provide laboratories with a plentiful source of mature and functional oocytes and sperm [2].

Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass (ICM) of a blastocyst stage embryo [3]. These cells exhibit pluripotency and self-renewal properties, and can give rise during development to the three embryonic germ layers allowing potential use in therapeutics, transplantation, drug testing, and early embryogenesis study [3]. Stem cells include ESCs as well as fetal and adult stem cells.

Up to the morula stage [3 days *postcoitum* (dpc), in humans], embryonic cells are totipotent, meaning each cell is theoretically capable of generating a whole organism. At the blastocyst stage (5 dpc in humans), ICM cells segregate into

epiblast and hypoblast. The epiblast gives rise to the three primary germ layers (ectoderm, endoderm, and mesoderm). The hypoblast forms the yolk sac. Cell lines of pluripotent and self-renewal ESCs are derived from the ICM, while induced pluripotent stem cells (iPSCs) arise from the reprogramming of differentiated adult or fetal somatic cells.

The iPSCs were obtained in mice [mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs)] and in humans [human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)] by inducing overexpression of defined genes such as *POU class 5 homeobox 1 (POU5F1 or Oct4)*, *SRY-box 2 (Sox2)*, *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc)*, *Kruppel-like factor 4 (gut) (Klf4)*, *Nanog homeobox (Nanog)*, and *Lin28* [4,5]. These genes are involved in pluripotency and cell proliferation.

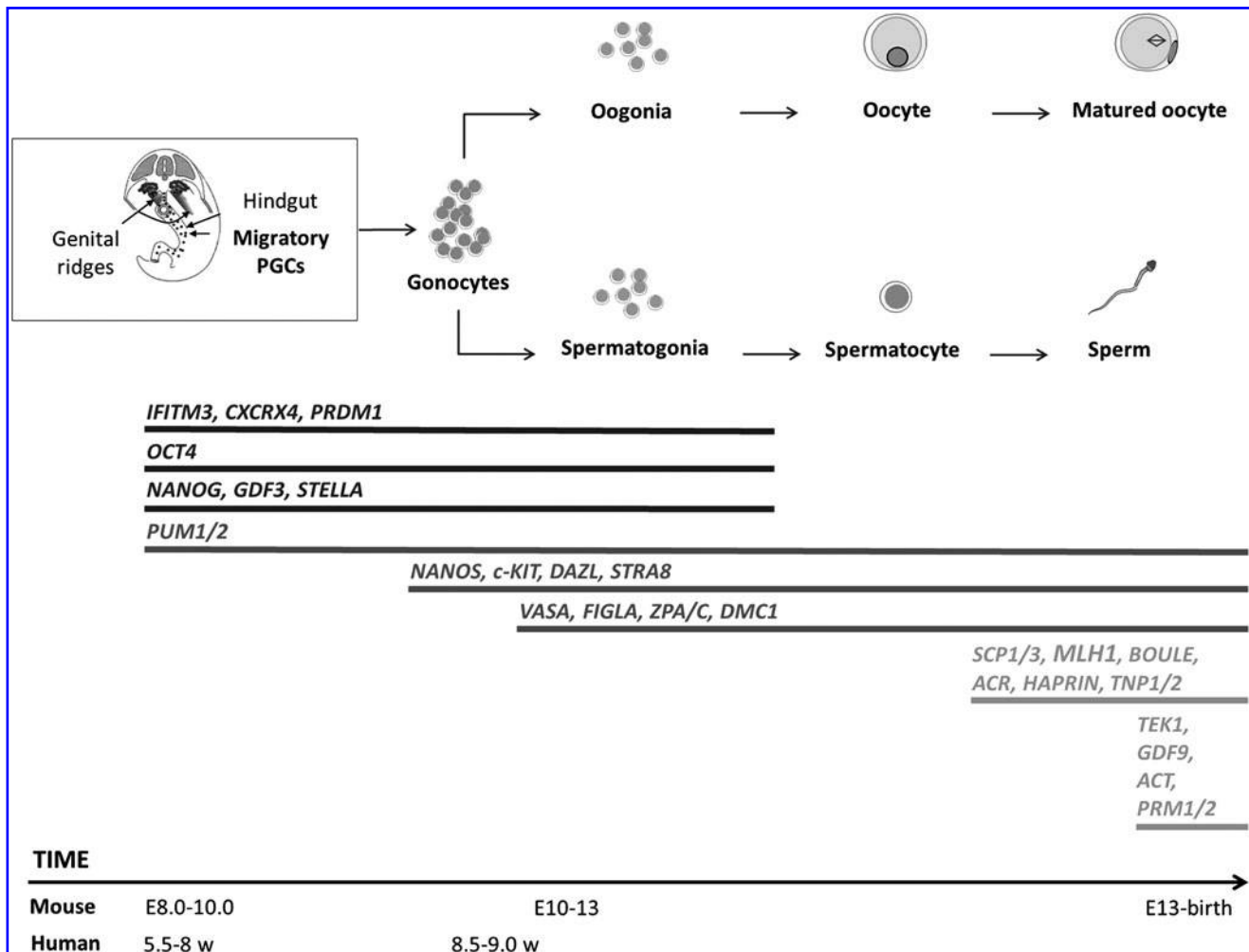
In vivo gametogenesis is a complex process, including a succession of defined stages. First, the epiblast cells adopt a primordial germ cell (PGC) fate during the extraembryonic phase after receiving an induction signal from the surrounding extraembryonic tissues. Then, the PGCs migrate to the genital ridge finally to become gonocytes that will differentiate into gametes through meiosis and cellular differentiation.

Cells are first pluripotent, then evolve during migration under the influence of defined signals emanating from neighboring tissues. Thus, each stage matches a window of responsiveness reflected by the presence of specific inducers and by the appearance/disappearance of a set of specific or ubiquitous molecular markers (also named molecular determinants) in a context of cell niches (Fig. 1 and Supplementary Table S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/scd](http://www.liebertpub.com/scd)) [6].

<sup>1</sup>AP-HP, Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Clamart, France.

<sup>2</sup>Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

<sup>3</sup>Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, Nouzilly, France.



**FIG. 1.** Molecular determinants' expression during germ line specification. Chronology of male and female germ line development events. Expression profile of premeiotic (*black lines*), pre-, and postmeiotic (*dark gray lines*) or exclusively meiotic (*light gray lines*) key genes (adapted from De Felici [8]). PGC, primordial germ cell; w, weeks.

Furthermore, germ line cells belong to an exceptional lineage because they become haploid through the process of meiosis, evolve into mature gametes, and perpetuate life. All these events are under the dependence of genetic (sexual chromosomes) and epigenetic (genomic imprinting) factors updating at each generation [7].

This review describes scientific advances toward germ cell (GC) differentiation from pluripotent hESCs and iPSCs, in the light of results from experiments performed in mice.

### In Vitro Production of PGCs and Gonocytes

The formation of PGCs is a critical step in mammalian embryogenesis to ensure normal fertility. Indeed, their successful later differentiation leads to the obtaining of fertilizable oocytes and sperm. PGCs are indistinguishable from neighboring embryonic cells in the yolk sac wall, then acquire gradually germinal molecular markers also named molecular determinants, that is to say, genes expressing at a precise timing during germinal development.

To do so, cells activate a germinal specific program and inhibit a somatic program [8]. This double action comes

along with a reactivation or maintenance of pluripotency [8]. In vivo, when PGCs reach the genital ridges, they differentiate into gonocytes and proliferate actively [8]. In vitro, it has been possible to obtain the expression of PGC and gonocyte markers mainly from human embryonic stem cells (hESCs) and mice embryonic stem cells (mESCs). The ESC-PGC and PGC-gonocyte transitions are not easy to distinguish because markers are often common. Results are described according to the most representative molecular determinants of each stage.

Clark et al. published a pioneering work in obtaining GCs from hESCs [9]. Differentiated cells expressed *Deleted in Azoospermia-like* (*DAZL*), a specific gene of germinal lineage, *DEAD* (*Asp-Glu-Ala-Asp*) *box polypeptide 4* (*DDX4* or *VASA*), whose expression appeared during embryoid bodies (EBs) formation after 14 days of culture, and other later markers [9].

Ever since, in vitro PGC differentiation has generated great interest as PGC specification is the first and crucial step in germ line development. Therefore, the crucial question arises of the relevance of the PGC-specific markers used. Several strategies used to enrich cultures with a PGC population leading to the identification of PGC-specific

markers (Supplementary Table S2). These strategies modulate the expression level of specific genes by using gene transfer technologies or try to reproduce in culture PGC physiological environment.

### *PGC and ESC common molecular signature*

hESCs share a panel of markers with human and/or mouse PGCs [8]. However, these genes showed differential expression patterns between ESCs and PGCs [8]. Some genes associated with pluripotency are critical in human primordial germ cell (hPGC) specification, proliferation, and survival. hPGCs are pluripotent as shown by the expression of specific markers, such as OCT4, NANOG, Developmental pluripotency-associated 3 pseudogene 2 (DPPA3P2 or STELLAR), Stage-specific embryonic Antigen 4 (SSEA4), or V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (C-Kit) [8,9]. In this way, PGCs can also be a source of pluripotent stem cells, called embryonic GCs [10]. Pluripotent gene expression is found in hESCs, in PGCs, and in gonocytes until the gonial stage.

Stage-specific GC marker genes [*PR domain containing 1, with ZNF domain (PRDM1)*, *Deleted in azoospermia (DAZ)*, *DAZL*, *Pumilio homolog 2 (PUM2)*, *Nanos homolog 1/3 (NANOS1/3)*, *STELLAR*, *Piwi-like RNA-mediated gene silencing 2 (PIWIL2)*, *Testis expressed 14 (TEX-14)* among others] were found to be expressed in both hPGCs and hESCs [8,9,11]. *PRDM1* expression is controlled by the bone morphogenetic protein (BMP)/Mothers Against DPP Homolog family member (SMAD) signaling pathway and is essential to ESC orientation toward a PGC identity in mice as in humans [12,13]. The highly conserved DAZ genes family contains *DAZ* [also named azoospermia factor c (AZFc)], *DAZL*, and *Homolog of the human gene DAZ in Drosophila (BOULE)* genes.

Mice knockout for *Dazl* are infertile because GCs are lacking [14]. *BOULE* null mice show a complete spermatogenic arrest at the round spermatid stage, before elongation [15]. In addition, 15% of human azoospermic or oligozoospermic patients carry a genetic microdeletion in the AZF regions. Using overexpression experiments on hESCs, Kee et al. showed *DAZL* is involved in PGC formation [16]. In addition, undifferentiated ESCs expressed other premeiotic genes such as *PUM2*, *NANOS1*, and *C-KIT* [9]. Therefore, given the similarity of gene expression profiles between PGCs and ESCs, it is very difficult to distinguish early GCs from undifferentiated ESCs. Meiotic and postmeiotic markers are more suitable markers in GC isolation from pluripotent stem cells.

### *PGC-specific molecular signature*

Several markers began to be recognized as inescapable to establish the PGC phenotype allowing the distinction between pluripotent stem cells and early-stage GCs.

SSEA1/3/4 are expressed by migrating PGCs. The use of SSEA1 expression as a cell surface marker for identifying human in vitro-derived PGCs led to isolation of a subpopulation of hESC-enriched PGCs [17,18]. Another relevant cell surface marker is Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4). The interaction of CXCR4 with its ligand Chemokine (C-X-C motif) receptor 4/ligand 12 (CXCL12) is

necessary for PGC migration toward the primitive gonads [19]. Furthermore, CXCR4 is not expressed in ESCs and, until now, it has been one of the rare markers allowing the distinction between ESC and PGC stages [12].

VASA is also a valuable gene for the detection of GCs differentiated from pluripotent stem cells. VASA is regulated by *DAZL* and remains a significant marker of the PGC stage as seen previously in the work by Clark et al. [9,16]. Indeed, it has been shown that deficiency in VASA gene impaired mice male GC proliferation and differentiation [9,16]. Moreover, several studies showed that PGCs obtained from ESCs expressed the *Developmental pluripotency associated 3 (DPPA3 or STELLA)* gene [9,16,17]. The importance of *Stella* expression for germinal specification in mESCs was demonstrated by the generation of transgenic mice [20].

Finally, authors also reported the key role of the transcription factor SOX17 as a critical specifier of human PGC fate. *SOX17* expression was significantly upregulated in generated primordial germ cell-like cells (PGCLCs) and, thus, was considered the earliest marker of PGCLCs in humans [21].

Besides, some markers are expressed exclusively by ESCs and iPSCs and not PGCs. For example, TRA-1-60 and TRA-1-81 (cell surface antigens) on human embryonic carcinoma cells and human pluripotent stem cell surfaces are used mainly as markers in identifying and isolating ESCs and iPSCs to discriminate them from differentiated PGCs [8].

Thus, PGC differentiation and isolation has been possible using GC gene and protein expression analysis and/or reporter construct tools [expression of Green fluorescent protein (GFP) under control of PGC-specific gene] [11,12,16–18,21–26]. All these works were directed toward generating PGCs from pluripotent stem cells in mice and humans.

Postmigratory and gonocyte-like cells, stages downstream of the PGC stage, were obtained with several culture strategies. Cells often expressed premeiotic markers [*OCT4*, *NANOG*, *STELLA*, *Growth differentiation factor 3 (GDF3)*, *PUM2*, and *NANOS*], postmeiotic markers [*Synaptonemal complex protein 1/3 (SCP1/3)*, *MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (MLH1)*, *Tektin 1 (TEKT1)*, and *GDF9*] or both (*DAZL*, *VASA*) [16,17,21–24,26].

In conclusion, even if it was possible to isolate populations enriched with PGCs, the expression of specific markers of the PGC stage can also be associated with later markers of more advanced cell stages. This observation underlined the absence of a clear in vitro transition between the PGCs and the later meiotic steps. Furthermore, both genetic manipulation and environment modification strategies were successful in generating PGCs from ESCs or iPSCs in both species. However, the environment modification strategy seemed the most suitable since it strived to reproduce the in vivo environment in culture. Furthermore, iPSCs have already been genetically manipulated during the reprogramming process, so further genetic engineering could increase the risk of genetic instability even more.

### **Differentiation of Male and Female Advanced GCs and Mature Gametes**

Gametogenesis is a general process allowing gamete formation in both male and female. In the testis, gonocytes proliferate considerably and gradually reach critical points of transition before initiating meiosis and sperm differentiation.



This orientation and the successful progression of spermatogonia into sperm specification depend on local factors [BMP, retinoic acid (RA), stem cell factor (SCF), leukaemia inhibitory factor (LIF)] and, more particularly, on the cellular niche constituted by Sertoli and Leydig cells.

At puberty, hormonal factors dependent on the hypothalamus–pituitary axis [luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)] add to the paracrine factors. Leydig cells secrete testosterone, the main hormonal regulator of spermatogenesis, and regulate Sertoli cells that nourish, support, and protect developing GCs. These processes allow a normal progression of spermatogenesis [27]. Thus, the process of spermatogenesis in the seminiferous tubules is controlled by the regulation of both somatic and GCs, including physical interaction and secretion of biological factors [27]. These events follow one another according to a precise chronology that is necessary to reproduce in vitro.

In ovaries, gametogenesis is a discontinuous process during life. Meiosis begins during fetal life, is stopped before birth, restarts during puberty, stops again, then ends with fertilization. Gamete formation in the ovary is a cyclic phenomenon associated with an important apoptosis process. The relationship between oogenesis and folliculogenesis underlines the close and essential link between somatic cells and GCs. Folliculogenesis is under the control of locally produced factors [KIT/KIT ligand system; transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ); GDF9; Anti-Mullerian hormone (AMH); androgens] and then becomes sensitive through granulosa and theca cells to pituitary gonadotrophin LH and FSH [28].

Spermatogenesis and oogenesis involve the formation of haploid cells from a diploid cell through meiosis. Nevertheless, two major differences remain. First, the number of gametes produced from every gametogenesis (only one for oogenesis in contrast to four for spermatogenesis). Second, oocyte production occurs only once a month during normal oogenesis from puberty to menopause, whereas sperm production begins at puberty and usually continues uninterrupted throughout adult life.

ESC-based research is rather limited, especially in humans due to ethical concerns involving human embryos' fate. Internationally, many jurisdictions have established specific legislation, ethical guidelines, and oversight bodies to govern stem cell and related embryo research [29]. Despite this, several groups were able to report ESC ability to differentiate into germ line cells [9,12,16,22,23,30–46]. Some have successfully obtained male and female GCs at various stages of gametogenesis [spermatogonia, spermatids, sperm, oocytes with or without zona pellucida (ZP), follicle-like structures] by using different experimental strategies. The PGC or gonocyte intermediate stages were not a necessary intermediate step.

The development of the iPSCs technology has contributed enormously to the in vitro gamete derivation research. Recently, several research groups have shown that gametes could be produced in vitro from iPSCs [10,24,30,36,44,47–56].

### Male germinal differentiation from ESCs

*Experiments in mice.* Most of experimental strategies for ESC differentiation are based on EB formation. EBs are three-dimensional structures in suspension, in which ESCs acquire the ability to differentiate into a wide variety of cell

types, including GCs. Toyooka et al. stated that mESC differentiation into male GCs was dependent on EB formation [22]. In this study, EB formation was induced by BMP4 addition. The BMP4 factor, produced by the extra-embryonic ectoderm, plays a crucial role in GC formation in the proximal region of the epiblast. After coculture of mESCs with cells producing BMP4, and after 6–8 weeks of transplantation under a host testis capsule, they induced testicular tubule reconstruction and mature sperm in the light of the seminiferous tubules. Indeed, elongated spermatids were observed as shown by an anti-HSC70T (constitutively expressed in mice spermatids) staining.

RA is another inductor used for GC differentiation. Following this approach, Geijsen et al. obtained haploid male GCs by selecting a SSEA1<sup>+</sup>/Oct4<sup>+</sup> population from mESC-derived EBs in the presence of RA [31]. Genomic imprinting erasure of the insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*) and *H19* genes was observed as well as the expression of *LHR*, *AMH*, sex determining region Y (*Sry*), *Acrosin* (*ACR*), and Tripartite motif containing 36 (*Trim36* or *haprin*) transcripts. After intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of the obtained round spermatids into oocytes, blastocysts had developed. Diploidy was confirmed by fluorescent in situ hybridization [31].

Other authors showed that RA associated with testosterone allowed the expression of specific genes of the male germinal lineage [*Stra8*, *Dazl*, *Activator of CREM in testis* (*Act*) and *Prm1*] [33]. However, cell morphology was not described, and cell functionality was not evaluated.

Kerkis et al. reported in vitro production of early and late male gametes from XY mESCs using RA induction within nonadherent EBs. Interestingly, the authors were able to generate gamete-like cells without genetic manipulation or cell population selection. Produced GCs expressed germinal-specific genes [*Mvh*, *Stella*, *Dazl*, *Piwil2*, *Tex14*, *Bmp8b*, and *ring finger protein 17* (*Rnf17*)], but also meiotic and post-meiotic male germinal-specific genes (*Scp1*, *Scp3*, *Stra8*, *Haprin*, and *Acr*) [34]. Early spermatids were observed with a meiosis I chromosome organization and a normal morphology. In this study, both types of presumptive gametes were obtained [34].

Other authors developed a culture system allowing PGC specification in mice, through the epiblast-like state. In mice, PGCs can be found in the ICM of preimplanted embryos and in the epiblast of postimplanted embryos. The epiblast-like cells (EpiLCs) transition obtained in PGC induction exhibits similar features to the transitional postimplantation epiblast, including the capacity to give rise to PGCs. Hayashi et al. reported for the first time viable healthy offspring from PGCLCs derived from mESCs and miPSCs [47]. To achieve this, a two-step differentiation protocol (the same one used for iPSCs) was undertaken, including the EpiLC transition step. In this way, PGCLCs produced were fully potent cells, since they differentiated into sperm. Fertilization of oocytes with the obtained sperm gave rise to healthy adult mice [47].

Finally, Nayernia et al. chose genetic manipulation strategies to facilitate in vitro GC isolation [32]. mESCs were transfected with the fusion genes *Stimulated by retinoic acid gene 8* (*Stra8*)-EGFP or *Protamine 1* (*Prm1*)-DsRed in the presence of RA allowing the development of haploid male gametes (early spermatids) [32]. To show that the resulting gametes were functional after fertilization by

ICSI, 65 embryos at the two-cell stage were transferred into the fallopian tubes of a pseudopregnant mouse. Twelve births were obtained; however, all newborns died between day five and the fifth month after birth. A defect of genomic imprinting establishment is the most likely hypothesis to explain this neonatal mortality [32].

*Experiments in humans.* Based on the presence of meiotic markers (*SCP1/3*, *MLH1*, *TEKT1*), Clark et al. showed that hESCs, once gonocyte stage was obtained as described above, were capable of spontaneous differentiation into male GCs. However, no morphological criteria were evaluated [9]. Others strategies were based on the addition of various elements in the culture medium (RA, BMP, testicular extracts, laminin, spermatogonial stem cells [SSCs]) or target expression of PGC marker genes to induce hESC differentiation into male GCs [12,25,35,36].

West et al. reported that simply addition of mouse embryonic fibroblast feeders and basic fibroblast growth factor (bFGF) induced spontaneous GC differentiation. Hence, they extended the differentiation of a POU5F1+(OCT4+)/DDX4+(VASA+) population (reflecting pre/postmigratory PGC stages) and measured determining factors' expression of the spermatogonia stage (*PUM2*, *DAZ1/4*, and *NANOS1*) and meiotic markers (*SCP3* and *MLH1*) [25] (Supplementary Table S2). Another team achieved haploid cells as round spermatid-like cells by cultivating hESCs with standardized mouse SSC culture conditions [36]. Bucay et al. also generated spontaneous emergence of PGCs expressing specific markers of male differentiation (ACR), including somatic-specific gene expression (*FSHR*, *AMH*, and *SOX9*) (Supplementary Table S2) [12].

These results displayed that spontaneous differentiation of ESCs into GCs was possible since PGCs and mature gametes were identified and isolated from cell aggregates. Thus, EB formation is often used as a mean to initiate ESC spontaneous differentiation. However, spontaneous differentiation is generally low and inefficient [33].

The addition of specific inductors for GC differentiation could actually mimic in culture the in vivo developmental processes. Using culture conditions enriched with various factors (*BMP4*, *LIF*, *RA*, or a preparation of neonatal testis), Aflatoonian et al. obtained round spermatids from hESCs after a selection of a SSEA1<sup>+</sup>/C-KIT<sup>+</sup> PGC population [35]. Differentiated human cells expressed gradually early germinal (*DAZL*, *VASA*), meiotic (*SCP3*), and spermatid [*Transition nuclear protein 1* (*TNP1*), *PRM1/2*] mRNA. In this study, round haploid spermatids with a compacted nucleus and a flagellum emergence were obtained. Simultaneously, the authors detected dihydrotestosterone and estradiol concentrations in the culture medium, two key hormones of spermatogenesis physiologically produced by surrounding somatic cells [35].

Thus, used together, EB induction and the addition of specific factors promoted hESC differentiation by simulating the physiological environment surrounding SSCs.

Concerning genetic manipulation strategies, *VASA*, *DAZ*, *DAZL*, and *BOULE* genes were mainly used by the authors. Following the overexpression strategy of *DAZ*, *DAZL*, and *BOULE* genes, Kee et al. succeeded in generating round spermatids and haploid male gametes (Supplementary Table S2) [16]. Progression through meiosis was initiated, and *SCP3* staining patterns were observed consistent with the leptotene stage of prophase I [16]. In response to the overexpression of intrinsic regulators (*VASA* and/or *DAZL*), Medrano et al. also

completed meiosis, as judged by haploidy and ACR expression of induced GCs [30].

Thus, strategies to induce male GCs in vitro used either forced expression of specific genes (*DAZL*, *DAZ*, *BOULE*, *VASA*) and/or the introduction of specific factors (*BMP*, *RA*, testosterone, bFGF, *LIF*, laminin-1, mSSC standard culture medium) into the medium.

Success was reported in the generation of haploid GCs from mice and hESCs [16,22,30–32,34–36,47]. In these articles, teams obtained spermatogenic cells matured from spermatid [16,22,31,34–36] to sperm [47] stages. Cells expressed male germinal, meiotic, or postmeiotic genes [47]. EB formation can be used to promote spontaneous differentiation of mESCs into male GCs [12,22]. Available evidence indicated that the use of RA may be beneficial too [31–35]. RA promotes meiosis initiation by stimulating *Stra8* expression and may require the supporting cells for paracrine interaction leading to meiotic process. As showed by Silva et al., [33] the combination of RA and testosterone led to early spermatid-like cell formation.

In mice, transplantation of EB derived from ESCs succeeded in the reconstruction of seminiferous tubules with the formation of mature sperm in the lumen [22]. In humans, one recreated the physiological microenvironment in vitro by generating surrounding somatic cells [35]. Some studies further evaluated the fertilization potential of the generated male gametes [31, 32,47]. In mice, ICSI experiments succeeded in embryo development [31,32] and gave birth to an offspring [32,47].

Nevertheless, a single study, which generated PGCs through an epiblast-like state, succeeded in generating healthy offspring [47]. Individuals reached adult age and had normal fertility [47]. It is important to underline that the functionality of obtaining cells was never tested in human protocols.

### Female germinal differentiation from ESCs

Fewer studies were undertaken for female germinal differentiation from pluripotent stem cells compared to male. As in male, two main strategies were used: overexpression of specific genes and/or the creation of an in vitro microenvironment most suitable for gamete differentiation.

*Experiments in mice.* In several studies, fluorescently labeled cells (transgene containing a specific gene promoter upstream of a fluorescent protein sequence) were used to isolate the initial steps of GC formation in vitro. In mice, Hübner et al. were the first to report the successful derivation of oocyte-like cells (OLCs) from mESCs in vitro. They used a monolayer culture system and introduced in mESCs a GFP construct under the control of the GC-specific Oct4 promoter [23]. Oct4 expression remained low during the last stages of oocyte maturation (Supplementary Table S2) [38].

Thus, after PGC induction, authors were able to observe meiotic GCs recognizable by a GFP<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>/Vasa<sup>+</sup> population (Supplementary Table S2). Further differentiation led to OLC differentiation expressing *Gdf9* and *Scp3*, surrounded with a visible ZP expressing the membrane proteins ZP2 and ZP3 (Supplementary Table S2). Follicle-like structures were also observed with a typical morphology and three-dimensional organization, expressed steroidogenesis enzymes, and secreted estradiol [23]. Stimulation by pregnant serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin led to oocytes' expulsion and polar body-like formation,

suggesting the complete achievement of the first meiotic division. Parthenogenetic embryos were then observed and developed up to the blastocyst stage [23].

Using the same protocol, Novak et al. described the formation of primary and primordial follicles from mESCs, but without clear meiotic chromosomal organization [41]. The synaptonemal protein SCP3 was detected, but its localization was atypical and its molecular partners were not detectable. So, the differentiation remained incomplete. An increase of estradiol concentration was however observed and signed the functionality of follicular-like somatic cells [41].

Using an eGFP reporter construct under the control of *Gdf9* gene promoter, Salvador et al. reported the derivation of an OLC phenotype. Differentiation was based on the monolayer culture system or EB formation. Authors observed ZP with *Zp3* expression, typical metaphase spindle with condensed chromosomes, and one polar body. Despite the fact that most of the *Gdf9*/eGFP-positive cells degenerated, authors obtained parthenogenetic zygotes at two- and four-cell stages [39].

Other studies focused on in vitro gamete induction with determined environmental factors only. Nicholas et al. combined the use of fluorescently labeled cells and a specific culture medium [37]. Indeed, they differentiated mESCs carrying *Oct4*-GFP reporter in culture with defined factors (BMP4, Kit-ligand, SCF, RA, R115866, bFGF). In this way, oocyte-like structures were obtained by secondarily selecting a SSEA1<sup>-</sup> population [37]. The authors showed that these cells initiated meiosis, but chromosomal localization of SCP3 remained partial. mESC-derived oocyte finally aborted in vitro [37]. These cells, transplanted under the renal capsule of a receiver mouse, were able to form primordial and primary-like follicles [37]. These data underlined that the niche context is required for follicle differentiation and maturation.

Lacham-Kaplan et al. and Qing et al. combined EB formation with coculture [40,42]. Lacham et al. obtained follicle-enclosed oocytes from mESCs cocultivated with testes of newborn male mice preparation medium [40]. *Zp3* and *Folliculogenesis-specific basic helix-loop-helix* (*Figα*, an oocyte-specific transcription factor) expression was detected without visible ZP [40]. The benefic use of testicular cell condition medium in follicle-like generation from mESCs suggested that the male gonad microenvironment provided the necessary cues for oocyte development. However, authors failed to observe a ZP indicating that oocyte cells were at an early stage.

Qing et al. underlined the necessity of reproducing in vitro cellular interactions between germ and somatic cells by cocultivating mESC-derived PGCs with granulosa cells [42]. Obtaining oocytes expressed the oocyte-specific genes *Figα*, *Gdf9*, *Zp1/3*, and the meiosis marker *Scp3* (well localized in the cytoplasm) with a typical morphology. However, the authors failed to fully distinguish the ZP [42].

Under the same experimental conditions described above, Kerkis et al. generated not only male but also female presumptive gametes from XY mESCs under RA induction [34]. This study represented significant advance as expression of meiotic (*Scp1*, *Scp3*, and *Stra8*) and female post-meiotic (*Gdf9*, *Zp2*, and *Zp3*) genes was detectable and also chromosomal reduction was observed in these ESC-derived gamete-like cells [34]. Hence, these observations indicated that GCs derived from mESCs progressed also into female gamete-like cell differentiation.

More recently, Wan et al. showed the potential of RA and oleanolic acid/or (OA) to induce mESC differentiation toward female germinal fate [43]. Indeed, RA and/or OA induced a significant upregulation of early GC markers (*Gdf9*, *Stra8*, *Mvh*), *Scp3*, and oocyte-specific markers (*Zp1*, *Zp2*, and *Zp3*) [43]. These results suggested the OA could be also used alone as an inducer.

Hayashi et al. managed to develop PGCs as a precursor step for fully functional oocyte derivation [44]. Indeed, mESCs carrying germ line-specific fluorescent marker were induced successively into EpiLCs and PGCLCs. This two-step procedure appeared clearly efficient in generating PGC-like cells from mESCs. PGCLCs and embryonic gonadal somatic cells put together result in an in vitro reconstructed ovary. Then, the transplantation of this “artificial” ovary under ovarian bursa or kidney capsules of recipient mice allows follicle development, including oocyte-like growth with multiple layers of granulosa and theca cells [44]. However, the authors noticed abnormalities in the cumulus complex formation.

In vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) led to the development of two-cell embryos and further into blastocysts [44]. Two-cell embryos were transferred into mice and ended in a fully fertile offspring. However, some oocytes were unable to extrude the second polar body [44]. In a promising way, Hayashi et al. manifestly proved the full potency of ESC-derived OLCs.

*Experiments in human.* In humans, differentiation of female GC from hESCs was demonstrated. Performing spontaneous differentiation in vitro, ovarian follicle-like structures were obtained from hESCs [45]. The structures, obtained after 21 days of spontaneous culture, expressed *VASA*, *STELLA*, and *GDF9*, but quickly degenerated [45].

Chen et al. [45] and Aflatoonian et al. [35] concentrated their work in recreating local extracellular signals from the gonad microenvironment. This strategy was based on neonatal testicular factors utilization and led to in vitro OLC differentiation [35]. By using this type of culture on SSEA1<sup>+</sup>-selected hESCs, Aflatoonian et al. obtained OLCs as well as primordial follicle-like structures [35]. The expression of *SCP3* and *GDF9* was measured, but ZP essential proteins were not detected [35]. Using granulosa cells combined with RA cotreatment, female GC differentiation from hESCs was improved [46]. A subpopulation of cells Oct4-EGFP<sup>+</sup> expressed *VASA*, *GDF9*, and *SCP3*, but the marker expression for mature oocyte ZP3 appeared to be low [46]. However, cells were able to develop into ovarian follicle-like structures, but putative oocytes did not progress through normal meiosis [46].

As in male, two main strategies were used: overexpression of specific genes and/or the creation of an in vitro microenvironment most suitable for gamete differentiation. In humans, promising progress was made in the generation of OLCs from ESCs by using spontaneous differentiation or coculture strategies. Results showed the potential of hESCs to differentiate into female GCs. Nevertheless, human oocyte-like differentiation in vitro was limited to the earliest stages. In contrast to humans, ESC-derived oocytes [42,43] and follicle-like structures [23,34,37,39–41,44] were reported in mice. Some authors failed to observe nuclear meiotic progression [37,40,41,46].

However, oocyte-specific expression of *Zp* was successfully reported [23,34,39,43,44]. In mice, a parthenogenetic

development of embryos was described [23,39] as well as a functional oocyte maturation [44]. Indeed, one study reported successful mESC-derived gamete cell fertilization resulting in a healthy offspring [44]. This underlines the difficulty in coordinating in vitro oocyte differentiation and meiosis. To date, fully mature oocytes derived from ESCs have not been obtained in humans.

In conclusion, fewer studies were undertaken for female germinal differentiation from pluripotent stem cells compared to male. Although it remains particularly difficult to isolate oocytes from ESCs due to the lack of suitable surface markers to distinguish GCs and oocytes, female gamete differentiation drafts from ESCs were possible [37]. Several protocols were undertaken and key factors regulating GC formation were identified. The efficiency of specific induction factors (RA, BMP, OA, R115866, neonatal testicular factors) [34,35,37,43] and coculture with gonad-specific cells or condition medium [40,42,46] were assessed for GC differentiation from ESCs.

Late GC stages were generated from both sexes, but the functionality was not always achieved. However, in mouse, Hayashi et al. generated successfully both functional oocyte and sperm in vitro and healthy offspring [44,47]. Nonetheless, this protocol implied a mouse transplantation step to recreate the in vivo microenvironment, making it difficult to consider any application in humans.

**Male germinal differentiation from the iPSCs**

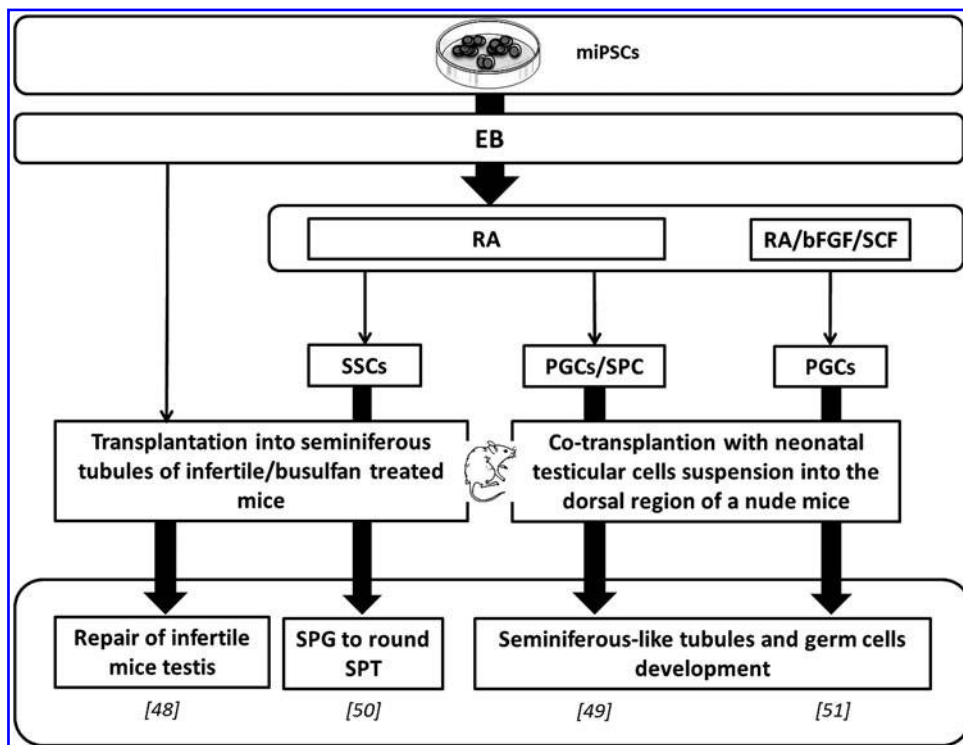
*Experiments in mice (Figs. 2 and 3).* Many approaches combined in vitro PGC differentiation to further in vivo maturation [11,47–51] (Fig. 2). Niu et al. transplanted iPSCs under the kidney capsule of recipient mice. This led not only to large round cell differentiation expressing GCs and

meiotic markers (*Oct4*, *Dazl*, *Vasa*, *Stra8*, and *Scp3*) but also to other cells expressing the sperm marker ACR [48]. This indicated that miPSCs had the capacity to differentiate into GCs. Once transplanted into seminiferous tubules, in vivo maturation obtained cells expressed *Mvh* and *Stra8* and succeeded in repairing of the fibrosis testis [48].

Few studies combined in vitro early GC-like stages acquisition with further in vivo steps. In vivo steps involved either transplantation into a sterile mice testis [50] or an ectopic cotransplantation with immature testicular cell suspension [49,51]. In this way, Zhu et al. reached SSC stages from miPSC EBs [expressing MVH, cadherin 1 (CDH1), and glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 (GFR $\alpha$ 1)], then, following transplantation, they managed to get spermatogonia to round spermatid stages (expressing MVH and SCP3). Thus, it underlined the real potential of miPSCs to differentiate into late male germinal GCs [50].

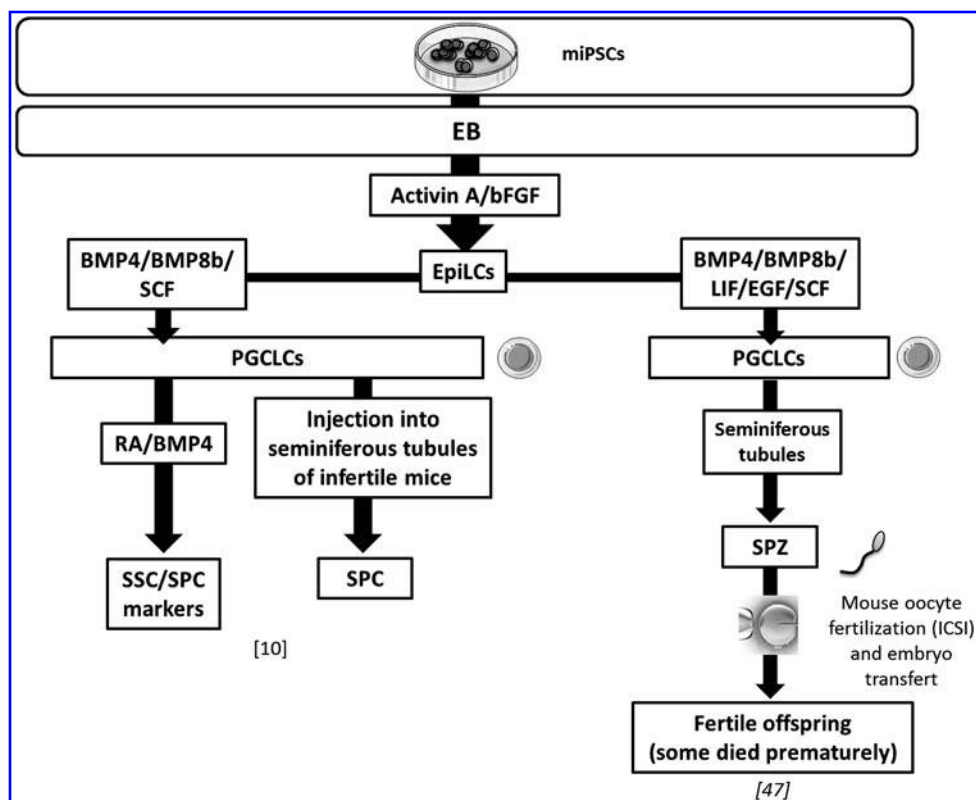
Yang et al. obtained not only in vitro RA induction cells expressing GC markers (*Stella*, *Vasa*, *Dazl*, and *Stra8*) but also spermatogonia (*c-kit*), meiotic, and postmeiotic (*Scp3* and *haprin*, respectively) marker genes [49]. PGCLCs expressing *Oct4*, male germ line markers *c-kit* and *Mvh* were obtained in vitro by Cai et al., thanks to RA, bFGF, and SCF induction [51]. In both studies, the PGCLCs were then co-transplanted in addition to neonatal testicular cells into the dorsal region of nude mice allowing an ectopic reconstruction of seminiferous tubule structures containing spermatogenic cells (Fig. 2) [49,51]. This underlines the beneficial use of in vivo transplantation. However, further differentiation was not observed in reconstituted seminiferous tubules.

Two teams performed PGCLC differentiation from iPSCs through EpiLC induction [11,47] (Fig. 3). In one study, PGCLCs acquired spermatogenic specification in vitro as



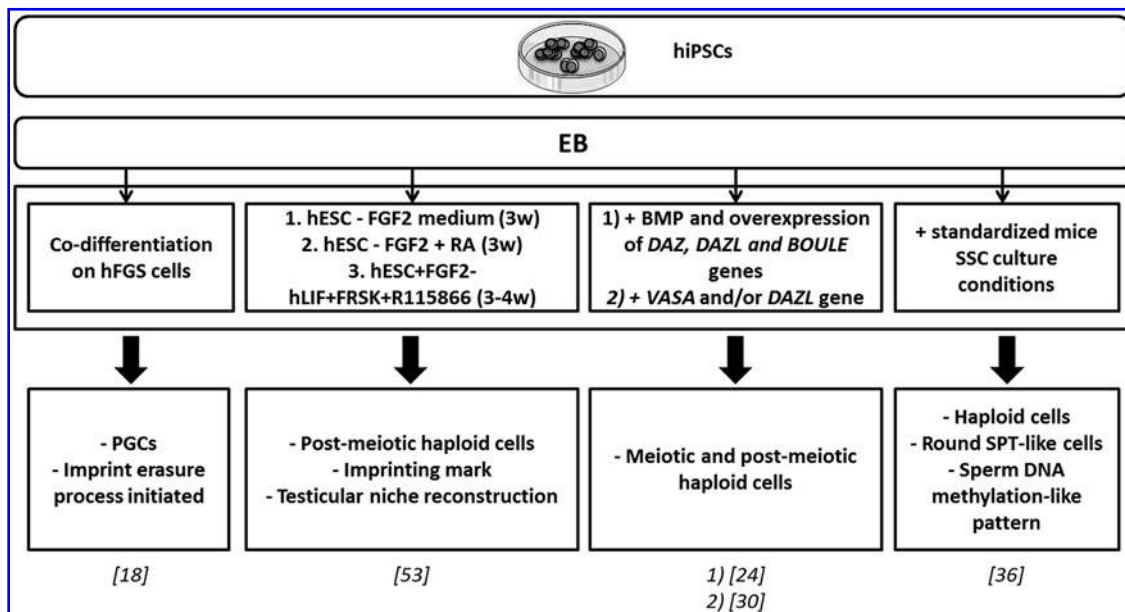
**FIG. 2.** Main germ line differentiation protocols from miPSCs. Protocols reproducing in vivo conditions in culture to generate primitive germ cells and then transplanted obtaining cells in recipient mice for further in vivo maturation. bFGF, basic fibroblast growth factor; EB, embryoid body; miPSC, mouse-induced pluripotent stem cell; PGC, primordial germ cell; RA, retinoic acid; SCF, stem cell factor; SPC, spermatocyte; SPG, spermatogonia; SPT, spermatid; SSC, spermatogonial stem cell.

**FIG. 3.** In vitro germ line differentiation protocols based on the EpiLC intermediate stage from miPSCs. One of the studies generated a healthy and fertile offspring. BMP4/8b, bone morphogenetic protein 4/8b; EGF, epidermal growth factor; EpiLC, epiblast-like cell; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; LIF, leukemia inhibitory factor; PGCLC, primordial germ cell-like cell; SPZ, spermatozoa.



in vivo by differentiating into spermatocytes expressing meiotic markers such as SCP3 [11]. In a functional study, haploid male GCs were generated and authors obtained fertile adult mice from PGCLCs derived from miPSCs, although some of the newborn died prematurely [47] (Fig. 3).

Few studies tested the iPSC ability to differentiate without any in vivo stage. Spontaneous differentiation of miPSCs into EBs and RA and/or testosterone induction for further differentiation strategies were efficient in GC differentiation from miPSCs [52]. This succeeded in haploid



**FIG. 4.** Main protocols for in vitro male germ line differentiation from hiPSCs. Germ cell differentiation from human iPSCs using forced expression of specific genes (*DAZL*, *DAZ*, *BOULE*, *VASA*) or introduced specific factors in the culture medium. *BOULE*, homolog of the human gene *DAZ* in *Drosophila*; *DAZ*, deleted in azoospermia; *DAZL*, deleted in azoospermia like; *FGF2*, fibroblast growth factor 2; *FRSK*, forskolin; hESC, human embryonic stem cell; hFGS, human fetal gonadal stromal; hiPSC, human-induced pluripotent stem cell; hLIF, human leukemia inhibitory factor; R115866, CYP26 inhibitor; *VASA* (*DDX4*), DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4; w, weeks.

cell development [Outer dense fiber of sperm tails 2 (Odf2), Act, Prm1 transcripts] with a significant increase of Stra8 expression [52].

*Experiments in humans (Fig. 4).* Since 2011, human iPSCs have been successfully used to differentiate into postmeiotic male GCs, including haploid cells [24,30,36,53]. Using conjointly BMP addition and overexpression of the specific regulator genes with or without BMP addition, authors obtained meiotic cells (with extensive synaptonemal complexes) and postmeiotic haploid cells with a similar pattern of ACR staining as observed in human spermatids [24,30].

Conversely, Eguizabal et al. and Easley et al. demonstrated that postmeiotic haploid cells could also be obtained from hiPSCs without the overexpression process of germ line-specific factors [36,53]. Eguizabal et al. developed a strong two-step differentiation protocol and obtained GCs differentiated into postmeiotic sperm-like cells showing ACR staining [53]. Furthermore, the expression level of six imprinted genes after 10 weeks of differentiation was evaluated that turned out to be comparable with sperm [53]. Efforts in this work to reproduce the physiological gonad microenvironment must be emphasised. Indeed, this 10 weeks protocol used hiPSCs of different origin and from both genetic sex for GC differentiation.

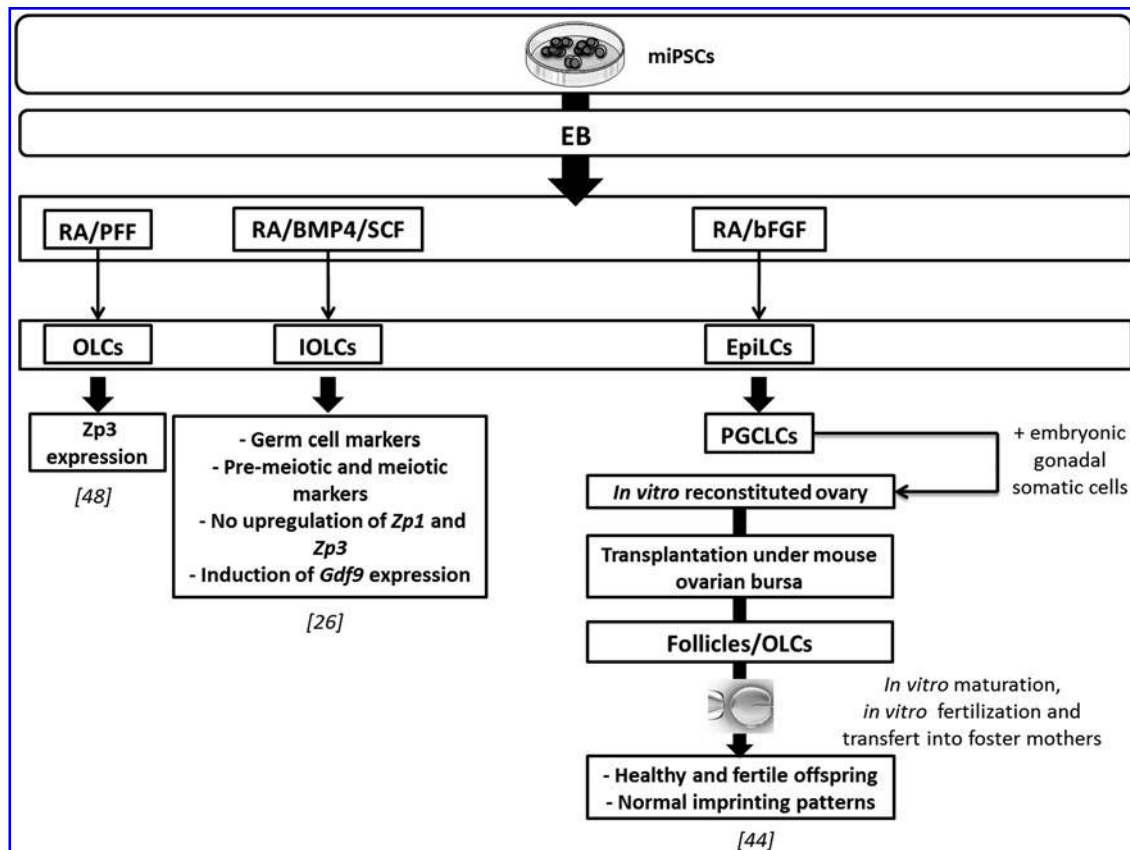
Eguizabal et al. demonstrated that without the overexpression of specific germ line-related regulator genes, postmeiotic haploid cells were successfully obtained from hiPSCs. Easley et al. also reported Piwi-like RNA-mediated

gene silencing 1 (HIWI or PIWIL1) and HILI-positive spermatocyte-like cells, and round spermatid-like cells expressing ACR, Trophoblast protein-1 (TP1), PRM1, and showing a DNA methylation pattern similar to those of human sperm on at least two parent-of-origin genomic imprints [36].

Thus, since Park et al. [18], numerous studies have been performed on sperm and oocyte derivation from skin cells in mice and in humans. In this way, the attempts of iPSCs into male GCs appeared to be successful in vitro under EB formation and specific induction or by specific gene overexpression from iPSCs. In vitro haploidization was reported in several studies [24,36,52,53] at a stage close to spermatid [24,30] or even to sperm [53]. Combining in vitro and in vivo differentiations, late male GCs have been generated from iPSCs. In vivo transplantation led to the reconstruction of the testicular tissue [48–51] that in some cases contained spermatogenic cells [48–51] or even spermatocytes [49] and spermatids [50]. As previously described, only one team tested the functionality of the haploid cells obtained from miPSCs, succeeding in giving birth to a fertile offspring [47].

*Female GC differentiation from the iPSCs*

*Experiments in mice (Fig. 5).* Several groups reported in vitro formation of hiPSC-derived OLCs by using different techniques without in vivo steps. Niu et al. showed that RA



**FIG. 5.** In vitro female germ line differentiation protocols from miPSCs. Female germ line differentiation from miPSCs using defined factors in culture medium. Oocyte-like cells were obtained. Their fertilization led to healthy and fertile offspring birth [44]. Gdf9, growth differentiation factor 9; IOLC, immature oocyte-like cell; OLC, oocyte-like cell; PFF, porcine follicular fluid; Zp1, 2, and 3: zona pellucida glycoprotein 1, 2, and 3.

and porcine follicular fluid were beneficial both for the derivation of male GCs as described above and of OLCs from miPSCs. OLCs expressed the *Mvh*, *Dazl*, *Stra8*, *Scp3*, and *Zp3* after 7 days of differentiation [48]. Differentiation induction using coaggregation culture with cells producing BMP4, SCF, and epidermal growth factor led to an increased expression of premeiotic and meiotic markers (Supplementary Table S2). The formation of round-shaped cells *Oct4*-GFP<sup>-</sup>/*Mvh*-RFP<sup>+</sup> resembling immature oocytes has also been reported (Supplementary Table S2) [26].

Female miPSCs (bearing *Pou5f1*-EGFP transgene) were also shown to be efficient in inducing fully functional oocytes as described above from female mESCs [44]. PGCLCs first generated reconstituted ovaries and then formed OLCs and even contributed successfully to oogenesis when transplanted under ovarian bursa or kidney capsules of recipient mice. Following IVM and IVF from the generated PGCLCs, two-cell embryos were transferred into foster mothers. Three offsprings were obtained and grew into fertile adults [44].

Anchan et al. assumed that initiating iPSC generation from cells originating from the gonadal tissue may provide an advantage due to the iPSC epigenetic memory [56]. In this way, they functionally evaluated the epigenetic memory of novel iPSC lines derived from mouse and human ovarian granulosa cells. Thus, based on spontaneous differentiation, they obtained cells expressing ovarian markers (AMHR, FSHR, P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, estrogen receptor, and inhibin alpha) as well as markers of early gametogenesis (*Mvh*, *Dazl*, *Gdf9*, *Boule*, and *Zp1*) [56]. Furthermore, obtained ovarian and primitive GCs were present in higher incidence than in EBs of the other cell lines (from fibroblast or G4 ESCs) and were able to synthesize more estradiol. In summary, these data support the hypothesis for epigenetic-mediated mechanisms of homo-typic differentiation of iPSCs [56].

*Experiments in humans.* In contrast to male germ line induction, not much has been achieved with female, especially from hiPSCs. However, some studies obtained promising results.

Indeed, a team used hiPSCs derived from women with primary ovarian insufficiency (POI) for further differentiation into GCs [55]. POI-iPSCs were transfected with the VASA-GFP construct for selection. Differentiation was induced through wingless-type MMTV integration site family, member 3a, and BMP4 addition. After 12 days of differentiation, the percentage of GFP-positive cells increased as did expression of GC markers (*PRDM1*, *STELLA*, *DAZL*, and *VASA*). GCs differentiated from POI-iPSCs showed a gene expression profile similar to the premeiotic stage [55]. Thus, iPSC technology could provide in vitro disease modeling helping to accelerate the development of novel therapies notably in fertility-related diseases [55].

In mice, OLCs were generated from miPSCs in four studies [26,44,48,56]. The specific protein ZP1 is a molecular marker of oocyte development competence, but was not systematically identified in the studies. Nevertheless, it has been demonstrated that miPSCs could be driven to develop into mature and functional oocytes [44]. Live births of an offspring using mice-induced GCs were reported [44].

Using a combined in vitro and in vivo induction approach, Hayashi et al. published a successful protocol for PGC derivation from mESCs and miPSCs [44,47]. Never-

theless, in vitro induction also reported great promises in research and clinical applications for human infertility treatment. Progresses were made in the male differentiation field, as demonstrated by the in vitro generation of post-meiotic haploid cells [36,52,53]. Oocyte-like structures were also reported in vitro [26,44,48,56] with even completion of meiosis [44]. To obtain in vitro functional gametes from hiPSCs, protocols need to be optimized in a hope of producing healthy offspring generated from artificial gametes.

## Discussion

Much effort has been made in the generation of functional gametes from pluripotent stem cells, including ESCs and iPSCs. Results showed that it is easier to obtain male gametes with morphological and typical meiotic characteristics than mature oocytes. However, recent exciting achievements reported both derived murine sperm and oocytes functionality by ICSI and IVF giving birth to healthy offspring [44,47]. This demonstrated the relevance of animal models in this domain. To our knowledge, no article has described the generation of totally mature and functional gametes in humans. However, results suggest that it may be possible in future to investigate human gamete development in vitro to establish novel reproductive technologies.

The identification of key signaling molecules favoring PGC emergence allowed the development of in vitro protocols for PGC induction from mice and human pluripotent stem cells. Main efficient protocols are presented in Supplementary Table S2. Different experimental strategies were used for PGC differentiation: spontaneous differentiation [17,23,25], forced gene expression [16,24], or the use of defined factors or specific cell types [12,18,21,22,26].

Taken together, these strategies succeeded to various differentiation stages. Based on PGC-specific marker knowledge, authors were able to isolate a PGC population using a simple fluorescence-activated cell sorting assay. PGC-specific genes such as *Oct4*, *c-kit*, *VASA*, *NANOS3*, and *CXCR4* were labeled. The number of PGCs generated in vivo was rather limited [57]. The alternative is to reproduce in vitro PGC differentiation steps starting from pluripotent stem cells [57]. During embryogenesis, two different transitory stages of PGCs can be identified: naive pluripotent stem cells sharing properties with the ICM of the blastocyst (ie, ESCs) and primed pluripotent stem cells similar to postimplantation epiblast cells of a more advanced pregastrulating stage embryo [57].

Pluripotency found in EpiLCs differs fundamentally from that of ESCs. The naive and primed pluripotent states can be easily discriminated as they exhibit a different miRNA expression profile. Therefore, efforts have been made to optimize culture conditions for induction or maintenance of either type of pluripotent stem cells in vitro. Naive ESCs can be maintained by LIF and adopt a primed EpiSC state following bFGF/Activin A induction. Finally, EpiSCs generated can lead to PGCLCs under an appropriate PGC differentiation medium [57].

Debates on the ethics of hESC research have considerably limited advances in the field, despite opening up a promising and pioneering area for biomedical applications and research (cellular therapies and transplantation) [58]. ESC research is the subject of fierce argument as it involves the use and

destruction of human embryos [59]. Indeed, early embryos had to be destroyed to serve stem cell research; therefore, it raises serious ethical concerns not only among scientists but also politicians and the general population [58].

All this controversy relies on whether life begins at conception and whether we accord or not a moral status to the embryos [58,59]. In such a way, researchers of hESC topics are also considered complicit in the destruction of embryos that makes hESC research unethical [59]. As hESC research likely creates a demand for embryo destruction, iPSC research has been welcomed as an ethical alternative [59].

However, results in humans evolve quickly. Recently, hESCs and iPSCs were derived from azoospermic men carrying deletions in the AZF regions and were able to differentiate into PGCLCs in vitro and after transplant into mice seminiferous tubules [60]. This underlines the potential and progress of in vitro gametogenesis research in infertility treatment. Obviously, in vitro models contribute not only to open our knowledge of human gamete development and related disorders but also hold great promise for the development of alternative infertility treatments.

Nevertheless, other animal models in which gametogenesis physiology is closer to human (porcine, bovine, primate) could give faster advances. Indeed, PGCLCs have been successfully obtained from fetal porcine skin-derived iPSCs and were able to undergo imprint erasure and further differentiated into OLCs [61]. In vitro gametogenesis research from nonhuman primates' ESCs and iPSCs could also bring additional information on human GC derivation. There is no doubt there are similarities between the embryos and fetuses of nonhuman primates and humans [62]. Thus, Teramura et al. [62] differentiated nonhuman primate ESCs into PGCs, the fetal precursor stage of the germ lineage.

Gametogenesis success is not only connected to direct actions on concerned cells but also to the interaction of GCs with nearby somatic cells. Current studies focus particularly on gaining mature gametes. Targeted experimentation on somatic cells associated with gametes and its regulating factors remains underdeveloped. However, the establishment of the gonadotropic axis, its impact on somatic cells, and indirectly on gametes, is a decisive step in the accomplishment of gametogenesis. It is, therefore, critical to assess if gamete induction processes in vitro faithfully recapitulate normal GC development in vivo.

In one study in mice, an offspring obtained from ICSI experiments showed a limited life span, pointing out the existence of uncontrolled factors for a complete differentiation of the male lineage. If chromosomal sex of starting stem cell lineage has no influence on the male or female orientation, epigenetic factors largely unknown at present, but essential to the establishment of the imprint or to some differentiation stages, could be responsible for this deficiency.

Numerous genetic and epigenetic alterations concerning ESC and iPSC generation have been reported in the literature [63]. The hiPSCs and hESCs acquire several types of aberrations during in vitro culture. Indeed, it has been demonstrated that the acquisition of malignancy or tumorigenicity can occur with high similarities in adaptations, differences in inactivation status of the X chromosome according to lines, cultures and passages, mitochondrial mutations, genomic integrity and chromosomal abnormalities, culture adaptation phenomena, and frequent acquisition of aneuploidy during

long-term culture [63]. Therefore, the preservation of genomic integrity during GC in vitro culture is an absolute necessity before considering any clinical application.

## Conclusion

Recent advances in GC in vitro induction from pluripotent stem cells provide an unprecedented understanding of the mechanisms guiding PGC development and differentiation. Molecular marker and inductor knowledge required for GC induction allowed the development of in vitro gamete-like cells. Derivation of PGCs was for a long time considered a required first step toward realization of gametogenesis from pluripotent stem cells.

In the view of published works, the efficiency of the transition step to a primed epiblast-like state was demonstrated. It is now necessary to improve PGC formation in vitro. In addition, fertile spermatozoa and oocytes were generated from mESCs and miPSCs using a combined in vitro and in vivo induction system. Some obstacles remain, as in vivo maturation assays cannot be easily applied in humans. The main objective is to differentiate PGCs into mature and functional oocyte and sperm in vitro without any transplantation. It is, therefore, necessary to develop culture systems similar to the gonadal niche environment in humans. This also implies further understanding of the intrinsic regulators and interaction existing between GCs and their microenvironment.

However, in vitro reprogramming and differentiation processes are likely to raise deeper concerns, such as the appearance of abnormalities in epigenetic and imprinting status establishment in iPSCs. Regardless of this, GC research opens new therapeutic perspectives for reproductive medicine applications. Thus, infertility problems have hope of resolution in GC research aimed at generating patient-specific differentiated gametes from iPSCs.

## Acknowledgment

We thank all the coauthors for their help with this work.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

1. Bahamondes L and MY Makuch. (2014). Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings. *Reprod Biol Endocrinol* 12:87.
2. Hayashi Y, M Saitou and S Yamanaka. (2012). Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. *Fertil Steril* 97:1250–1259.
3. Desai N, P Rambhia and A Gishto. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod Biol Endocrinol* 13:9.
4. Takahashi K and S Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
5. Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.



6. Tosca L, AM Courtot, A Bennaceur-Griscelli and G Tachdjian. (2011). In vitro strategies for human gametes production from stem cells. *Med Sci (Paris)* 27:866–874.
7. Kota SK and R Feil. (2010). Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev cell* 19:675–686.
8. De Felici M. (2013). Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: *Oogenesis*. G Coticchio, DF Albertini and L De Santis, eds. Springer-Verlag, London, pp 19–37.
9. Clark AT, MS Bodnar, M Fox, RT Rodriguez, MJ Abeyta, MT Firpo and RA Pera. (2004). Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 13:727–739.
10. Li Y, X Wang, X Feng, S Liao, D Zhang, X Cui, F Gao and C Han. (2013). Generation of male germ cells from mouse induced pluripotent stem cells in vitro. *Stem Cell Res* 12:517–530.
11. Mikkola M, C Olsson, J Palgi, J Ustinov, T Palomaki, N Horelli-Kuitunen, S Knuutila, K Lundin, T Otonkoski and T Tuuri. (2006). Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Dev Biol* 6:40.
12. Bucay N, M Yebra, V Cirulli, I Afrikanova, T Kaido, A Hayek and AM Montgomery. (2009). A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:68–77.
13. Yabuta Y, K Kurimoto, Y Ohinata, Y Seki and M Saitou. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75:705–716.
14. Saunders PT, JM Turner, M Ruggiu, M Taggart, PS Burgoyne, D Elliott and HJ Cooke. (2003). Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reproduction* 126:589–597.
15. VanGompel MJ and EY Xu. (2010). A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule. *Hum Mol Genet* 19:2360–2369.
16. Kee K, V Angeles, M Flores, H Nguyen and RA Reijo Pera. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462:222–225.
17. Tilgner K, SP Atkinson, A Golebiewska, M Stojkovic, M Lako and L Armstrong. (2008). Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:3075–3085.
18. Park TS, Z Galic, AE Conway, A Lindgren, BJ van Handel, M Magnusson, L Richter, MA Teitell, HK Mikkola, et al. (2009). Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 27:783–795.
19. Lewellis SW and H Knaut. (2012). Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol* 23:333–340.
20. Payer B, SM Chuva de Sousa Lopes, SC Barton, C Lee, M Saitou and MA Surani. (2006). Generation of stella-GFP transgenic mice: a novel tool to study germ cell development. *Genesis* 44:75–83.
21. Irie N, L Weinberger, WW Tang, T Kobayashi, S Viukov, YS Manor, S Dietmann, JH Hanna and MA Surani. (2015). SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160:253–268.
22. Toyooka Y, N Tsunekawa, R Akasu and T Noce. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11457–11462.
23. Hübner K, G Fuhrmann, LK Christenson, J Kehler, R Reinbold, R De La Fuente, J Wood, JF Strauss, 3rd, M Boiani and HR Schöler. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251–1256.
24. Panula S, JV Medrano, K Kee, R Bergström, HN Nguyen, B Byers, KD Wilson, JC Wu, C Simon, O Hovatta and RA Reijo Pera. (2011). Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20:752–762.
25. West F, DW Machacek, NL Boyd, K Pandiyan, KR Robbins and SL Stice. (2008). Enrichment and differentiation of human germ-like cells mediated by feeder cells and basic fibroblast growth factor signaling. *Stem Cells* 26:2768–2776.
26. Imamura M, T Aoi, A Tokumasu, N Mise, K Abe, S Yamanaka and T Noce. (2010). Induction of primordial germ cells from mouse induced pluripotent stem cells derived from adult hepatocytes. *Mol Reprod Dev* 77:802–811.
27. Huleihel M and E Lunenfeld. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 6:259–268.
28. Oktem O and B Urman. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 25:2944–2954.
29. Caulfield T, K Kamenova, U Ogbogu, A Zarzeczny, J Baltz, S Benjaminy, PA Cassar, M Clark, R Isasi, et al. (2015). Research ethics and stem cells: is it time to re-think current approaches to oversight? *EMBO Rep* 16:2–6.
30. Medrano JV, C Ramathal, HN Nguyen, C Simon and RA Reijo Pera. (2012). Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro. *Stem Cells* 30:441–451.
31. Geijsen N, M Horoschak, K Kim, J Gribnau, K Eggan and GQ Daley. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427:148–154.
32. Nayernia K, J Nolte, HW Michelmann, JH Lee, K Rath-sack, N Drusenheimer, A Dev, G Wulf, IE Ehrmann, et al. (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11:125–132.
33. Silva C, JR Wood, L Salvador, Z Zhang, I Kostetskii, CJ Williams and JF Strauss, 3rd. (2009). Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. *Mol Reprod Dev* 76:11–21.
34. Kerkis A, SA Fonseca, RC Serafim, TM Lavagnoli, S Abdelmassih, R Abdelmassih and I Kerkis. (2007). In vitro differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* 9:535–548.
35. Aflatoonian B, L Ruban, M Jones, R Aflatoonian, A Fazeli and HD Moore. (2009). In vitro post-meiotic germ cell development from human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 24:3150–3159.
36. Easley CA, BT Phillips, MM McGuire, JM Barringer, H Valli, BP Hermann, CR Simerly, A Rajkovic, T Miki, KE Orwig and GP Schatten. (2012). Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep* 2:440–446.
37. Nicholas CR, KM Haston, AK Grewall, TA Longacre and RA Reijo Pera. (2009). Transplantation directs oocyte maturation from embryonic stem cells and provides a therapeutic strategy for female infertility. *Hum Mol Genet* 18:4376–4389.
38. Pesce M, X Wang, DJ Wolgemuth and H Schöler. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71:89–98.

39. Salvador LM, CP Silva, I Kostetskii, GL Radice and JF Strauss, 3rd. (2008). The promoter of the oocyte-specific gene, *Gdf9*, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype. *Methods* 45:172–181.
40. Lacham-Kaplan O, H Chy and A Trounson. (2006). Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 24:266–273.
41. Novak I, DA Lightfoot, H Wang, A Eriksson, E Mahdy and C Höög. (2006). Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 24:1931–1936.
42. Qing T, Y Shi, H Qin, X Ye, W Wei, H Liu, M Ding and H Deng. (2007). Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation* 75:902–911.
43. Wan Q, H Lu, LT Wu, X Liu and JB Xiang. (2014). Retinoic acid can induce mouse embryonic stem cell R1/E to differentiate toward female germ cells while oleanolic acid can induce R1/E to differentiate toward both types of germ cells. *Cell Biol Int* 38:1423–1429.
44. Hayashi K, S Ogushi, K Kurimoto, S Shimamoto, H Ohta and M Saitou. (2012). Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338:971–975.
45. Chen HF, HC Kuo, CL Chien, CT Shun, YL Yao, PL Ip, CY Chuang, CC Wang, YS Yang and HN Ho. (2007). Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Hum Reprod* 22:567–577.
46. Chen HF, PS Jan, HC Kuo, FC Wu, CW Lan, MC Huang, CL Chien and HN Ho. (2014). Granulosa cells and retinoic acid co-treatment enrich potential germ cells from manually selected Oct4-EGFP expressing human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 29:319–332.
47. Hayashi K, H Ohta, K Kurimoto, S Aramaki and M Saitou. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146:519–532.
48. Niu Z, Y Hu, Z Chu, M Yu, Y Bai, L Wang and J Hua. (2012). Germ-like cell differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Cell Biochem Funct* 31:12–19.
49. Yang S, J Bo, H Hu, X Guo, R Tian, C Sun, P Zhu, P Li, P Liu, et al. (2012). Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells in vitro and in reconstituted seminiferous tubules. *Cell Prolif* 45:91–100.
50. Zhu Y, HL Hu, P Li, S Yang, W Zhang, H Ding, RH Tian, Y Ning, LL Zhang, et al. (2012). Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian J Androl* 14:574–579.
51. Cai H, X Xia, L Wang, Y Liu, Z He, Q Guo and C Xu. (2013). In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 433:286–291.
52. Li P, H Hu, S Yang, R Tian, Z Zhang, W Zhang, M Ma, Y Zhu, X Guo, et al. (2013). Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction. *Biomed Res Int* 2013:608728.
53. Eguizabal C, N Montserrat, R Vassena, M Barragan, E Garreta, L Garcia-Quevedo, F Vidal, A Giorgetti, A Veiga and JC Izpisua Belmonte. (2011). Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29:1186–1195.
54. Hayama T, T Yamaguchi, M Kato-Itoh, S Hamanaka, M Kawarai, M Sanbo, C Tamura, YS Lee, A Yanagida, et al. (2014). Generation of mouse functional oocytes in rat by xeno-ectopic transplantation of primordial germ cells. *Biol Reprod* 91:89.
55. Leng L, Y Tan, F Gong, L Hu, Q Ouyang, Y Zhao, G Lu and G Lin. (2015). Differentiation of primordial germ cells from induced pluripotent stem cells of primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 30:737–748.
56. Anchan R, B Gerami-Naini, JS Lindsey, JW Ho, A Kiezun, S Lipskind, N Ng, JA LiCausi, CS Kim, et al. (2015). Efficient differentiation of steroidogenic and germ-like cells from epigenetically-related iPSCs derived from ovarian granulosa cells. *PLoS One* 10:e0119275.
57. Hayashi K and M Saitou. (2013). Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods Mol Biol* 1074:175–183.
58. Manzar N, B Manzar, N Hussain, MFA Hussain and S Raza. (2013). The ethical dilemma of embryonic stem cell research. *Sci Eng Ethics* 19:97–106.
59. Devolder K. (2010). Complicity in stem cell research: the case of induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* 25:2175–2180.
60. Ramathal C, J Durruthy-Durruthy, M Sukhwani, JE Arakaki, PJ Turek, KE Orwig and RA Reijo Pera. (2014). Fate of iPSCs derived from azoospermic and fertile men following xenotransplantation to murine seminiferous tubules. *Cell Rep* 7:1284–1297.
61. Linher K, P Dyce and J Li. (2009). Primordial germ cell-like cells differentiated in vitro from skin-derived stem cells. *PLoS One* 4:e8263.
62. Teramura T, T Takehara, N Kawata, N Fujinami, T Mitani, M Takenoshita, K Matsumoto, K Saeki, A Iritani, N Sagawa and Y Hosoi. (2007). Primate embryonic stem cells proceed to early gametogenesis in vitro. *Cloning Stem Cells* 9:144–156.
63. Nguyen HT, M Geens and C Spits. (2013). Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update* 19:187–205.

Address correspondence to:

Lucie Tosca, PhD  
 Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique  
 Hôpitaux Universitaires Paris-Sud  
 Site Antoine Béclère  
 157, rue de la Porte de Trivaux  
 Clamart 92140  
 France

E-mail: lucie.tosca@abc.aphp.fr

Received for publication July 8, 2015

Accepted after revision February 12, 2016

Prepublished on Liebert Instant Online February 12, 2016

## **OBJECTIFS**



Nous venons de voir dans cette introduction l'ensemble des processus par lesquels l'homme acquière sa fonction de reproduction ainsi que les aspects chromosomiques et génétiques qui contrôlent cette mise en place. Les examens génétiques de routine ne permettent pas toujours d'établir une étiologie. Nous avons vu que des anomalies génétiques ou chromosomiques peuvent causer une infertilité masculine en affectant différents niveaux : central (hypothalamus / hypophyse), testiculaire ou post-testiculaire (le transport du sperme).

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de modéliser l'infertilité masculine *in vitro* dans un contexte d'anomalie au caryotype (remaniement chromosomique complexe et désordre du développement sexuel). Pour cela, nous avons généré un modèle de cellules iPS à partir de cellules de sang (érythroblastes) de deux patients porteurs d'anomalie(s) au caryotype. Les lignées générées sont ainsi un modèle de choix pour l'étude de la méiose dans un contexte de d'altération génétique.

Nos connaissances des stades précoces de la formation des gamètes sont réduites dans l'espèce humaine. Reconstituer les premières étapes de la gamétogenèse *in vitro*, à partir de cellules iPS, fournirait un modèle approprié pour l'étude de la formation des gamètes et contribuerait de façon certaine à une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la spermatogenèse. L'établissement du protocole le plus approprié pour recréer *in vitro* le microenvironnement *in vivo* a été la première étape de ma démarche. Dans un deuxième temps, la fonctionnalité des cellules iPS générées a été testée par leur différenciation *in vitro* en cellules germinales. Nous avons obtenu le premier stade de différenciation germinale à savoir les cellules germinales primordiales.

Parmi toutes les études ou cohortes publiées sur le sujet de l'infertilité masculine, peu ont étudié les variations du nombre de copie des séquences d'ADN du génome par CGH-array. Dans ce contexte, le second axe de ce travail de thèse a consisté en la conception d'une puce à ADN de type CGH-array pangénomique et significativement enrichie au niveau d'un panel de 445 gènes en lien avec la fonction de reproduction et détermine le sexe. Une fois ce travail de design terminé, l'analyse chromosomique moléculaire d'une cohorte de 43 patients infertiles, dont l'origine de l'infertilité n'a pas pu être identifiée par les techniques classiques (caryotype standard normal et recherche de microdélétions du chromosome Y négative) ainsi que de 2 patients présentant un désordre du développement sexuel, a été entreprise afin de déterminer une cause chromosomique et d'identifier éventuellement de nouveaux gènes ou de nouvelles régions d'intérêt.



## **PATIENTS ET METHODES**





## **I. Patients, répartition et éléments cliniques**

### **A. Critères d'inclusion et d'exclusion**

Les hommes azoospermes et/ou cryptozoospermes (patient 1 et patients P1 à P43) inclus dans l'étude ont été recrutés sur une période de trois ans au sein du service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction de l'hôpital Antoine Bécclère par le Dr Vincent Izard. Ces patients sont venus consulter pour une infertilité de type azoospermie-non-obstructive et/ou cryptozoospermie suite à la réalisation de 2 spermogrammes à 3 mois d'intervalle. Les patients DSD inclus ont été recrutés dans le service d'Embryologie, Histologie et Cytogénétique de l'hôpital Antoine Bécclère par le Dr Sophie Brisset (patient 2) et le service d'Endocrinologie et Diabète de l'enfant de l'Hôpital Bicêtre par le Dr Claire Bouvattier (patient 3). Tous les patients ont reçu des informations éclairées (remise d'une notice sur l'analyse chromosomique sur puce à ADN ou ACPA, cf Annexe N°1) et ont signé un consentement écrit autorisant la réalisation d'analyses génétiques ainsi que des investigations moléculaires dans le cadre de la recherche (cf Annexe N°2). Les patients ont été répartis en trois groupes :

- 1 patient azoosperme présentant un caryotype standard anormal (Patient 1)
- 2 patients présentant un désordre du développement sexuel avec pour l'un des deux une discordance entre le sexe génétique et le sexe phénotypique (homme à caryotype 46,XX) (Patient 2). Le 2<sup>ème</sup> patient présente un caryotype standard masculin normal (Patient 3).
- 43 patients azoospermes-cryptozoospermes présentant un caryotype standard 46,XY normal (patients P1 à P43)

Dans le cadre de l'exploration des troubles de la reproduction, un caryotype ainsi qu'une recherche de microdélétions des régions AZF par PCR ont été entreprises. Nous avons choisi d'exclure dans cette étude les patients infertiles présentant des microdélétions des régions AZF, leur infertilité étant de ce fait expliquée. Une analyse par puce à ADN de type CGH-array avec design à façon, pangénomique et enrichie au niveau de gènes d'intérêt dans la fonction de reproduction et les processus de développement sexuel, a été entreprise pour chacun des patients. Les patients 1 et 2 ont fait l'objet d'une analyse par séquençage de type mate-pair (patient 1) ou génome entier (patient 2) et une CGH-array haute résolution a également été réalisée.

### **B. Patient azoosperme à caryotype anormal**

#### Patient 1

Le patient 1 est âgé de 38 ans et est d'origine sénégalaise. Il est venu consulter pour infertilité (rapports sexuels réguliers et non protégés) depuis deux ans. Dans le cadre du bilan d'infertilité, deux spermogrammes ont été réalisés après une période d'abstinence de cinq jours et ont révélés une

<b>Bilan</b>	<b>Patient</b>	<b>Norme</b>
FSH (UI/l)	<b>15,5</b>	1,4-10
LH (UI/l)	7,9	1,4-8
Testostérone (ng/ml)	4,3	3,5-8,5
Inhibine B (pg/ml)	<b>36</b>	80 - 270

Tableau 12 : Bilan hormonal du patient 1.

azoospermie. Le patient est le premier enfant d'un couple non apparenté, et a quatre frères et cinq sœurs dont la fertilité n'a pas pu être déterminée car non encore en âge de procréer.

L'examen clinique a exclu une obstruction des voies génitales mais a révélé une atrophie bilatérale des gonades, avec un volume testiculaire réduit à 7 cm<sup>3</sup> (norme: 15-30 cm<sup>3</sup>, OMS 2004). L'échographie doppler testiculaire et les échographies du tractus génital ont montré une hypervascularisation de la prostate avec calcification de la zone centrale, un léger épaissement différentiel de la zone des parois pelviennes mais sans obstruction, et des vésicules séminales non rétentionnelles.

Une biopsie testiculaire bilatérale a été réalisée. L'analyse histologique a montré un arrêt de maturation dans tous les tubes séminifères principalement au stade spermatocyte et plus rarement au stade spermatide (collaboration Charlotte Mussini, anathomopathologiste, hôpital Bicêtre). Ainsi, la méiose a été initiée mais n'a pas été achevée. En outre, une hyperplasie des cellules de Leydig a été observée. Dans le cadre du bilan génétique, un caryotype standard, une recherche des microdélétions du chromosome Y au niveau des régions AZF ainsi qu'une analyse par CGH-array plus résolutive (1M, Agilent) ont été réalisés. Des expériences d'hybridation *in situ* fluorescente ainsi qu'un séquençage de type mate-pair ont été réalisés en complément du caryotype. Les résultats relatifs aux bilans hormonaux sont résumés dans le tableau 12.

### C. Patients présentant un désordre du développement sexuel

#### Patient 2

Le patient 2 est âgé de 48 ans d'origine tunisienne. De phénotype masculin, il présente un désordre du développement sexuel comportant une malformation uro-génitale associée à une dysgénésie gonadique constatée à la naissance (testicules non descendus et de petite taille). Le patient est issu d'une famille consanguine, ses parents sont cousins germains. Comparé aux autres membres de sa famille (taille moyenne des frères 1m70), le patient a une petite taille (1m55) et est le seul à ne pas avoir eu d'enfant. L'analyse du caryotype montre un caryotype féminin 46,XX homogène. A la naissance, il présentait une malformation uro-génitale à type DSD (disorder of sexual development), nécessitant de très nombreuses interventions incluant un abaissement des gonades à 6 mois.

Une écho-doppler testiculaire a montré à gauche la présence d'un testicule de 2 cm<sup>3</sup> de volume (partie haute du néo-scrotum) (norme : 15-30 cm<sup>3</sup>, OMS 2004). L'épididyme n'a cependant pas été formellement identifié. A droite, une structure haute de 27 mm sur 9x6 mm d'épaisseur et de largeur pour un volume de 0,9 cm<sup>3</sup> est observée et correspondrait à une gonade. Une hypotrophie prostatique est également décrite (12 ml hypo-échogène), ainsi qu'une absence de vésicule séminale et d'ampoule déférentielle.

L'implantation du sinus urogénital sur la face postérieure de l'urètre est suspecté être à l'origine d'épisodes d'incontinence urinaire, d'infections urinaires récidivantes, de dysurie et de brûlures mictionnelles par infections. Ceci s'ajoute à un problème d'ordre sexuel avec anéjaculation ou

Bilan	Patient	Norme
FSH (UI/l)	<b>33</b>	1,4-10
LH (UI/l)	<b>50</b>	1,4-8
Testostérone (ng/ml)	<b>1,4</b>	3,5-8,5
Inhibine B (pg/ml)	NR	80 - 270

Tableau 13 : Bilan hormonal du patient 2.

Bilan	Patient	Norme
FSH (UI/l)	3,3	1-4,5
LH (UI/l)	1,2	1,0-5,0
Testostérone (ng/ml)	0,33	< 0,5
Dihydrotestostérone ou DHT (nmol/l)	<b>0,05</b>	0,17-0,69
Inhibine B (pg/ml)	<b>26</b>	71 - 204
AMH (pM/l)	<b>100</b>	360 - 650
Delta 4 Androstènedione (ng/ml)	0,22	< 1

Tableau 14 : Bilan hormonal du patient 3.

	Moyenne ± «écart-type (minimum-maximum)	Norme
Age [ans]	35,77±5,32 (25-46)	-
Volume testiculaire [cm <sup>3</sup> ]	6,65±2,06 (3-10,8)	≥ 12
LH [U/l]	7,66±4,44 (2,74-9)	1,4-8
FSH [U/l]	20,52±9,51 (7,1-26,1)	1,4-10
Testostérone [ng/ml]	4.72±1,48 (1,8-8,4)	3,5-8,5
Inhibine B [pg/ml]	33,47±23,15(<3-90)	80-270
Concentration en spermatozoïdes [10 <sup>6</sup> /ml]	0,03±1(0-0,45)	≥ 15 M/ml
Volume de l'éjaculat [ml]	3,59±1,60 (1,2-6,8)	1,5-6 ml

Tableau 15 : Moyenne des paramètres cliniques des patients de la cohorte de 43 patients azoospermes/cryptozoospermes.

éjaculation rétrograde. L'ablation de cette poche a donc été réalisée à l'âge de 32 ans. L'examen anatomopathologique de cette cavité retirée a révélé un revêtement malpighien régulier non kératinisé et la présence de glandes de type prostatique, une description correspondant à celle d'un épithélium de type vaginal. Le patient a subi de nombreuses uréthroplasties, réopérées à plusieurs reprises pour des mauvaises cicatrisations. Les résultats relatifs aux bilans hormonaux sont résumés dans le tableau 13.

### Patient 3

Le patient 3 est un garçon âgé de 6 ans. Il présente à la naissance un hypospade postérieur (verge totalement enfouie), opéré à 8 mois (uréthroplastie). Les bourses sont bien développées et apparaissent normalement fusionnées. Une hernie inguinale gauche ainsi que la présence du testicule droit en position inguinale sont constatées.

L'examen de génitographie a confirmé la présence d'une gonade à gauche qui ressemble à un testicule qui a été abaissé dans la bourse et d'une gonade droite dans le canal inguinal. L'abaissement de la gonade gauche a permis de mettre en évidence la présence dans le sac herniaire d'une structure solide pouvant correspondre à des structures müllériennes.

L'examen radiologique a révélé la présence d'une cavité liquidienne rétro-vésicale, paramédiane, discrètement déviée vers la gauche, mesurant 3 cm de hauteur sur 1,9 cm de largeur. Au-dessus, une deuxième cavité est visible, en situation paramédiane gauche, mesurant 1 cm environ de largeur et en position paramédiane droite, correspondant à un utérus, mesurant 2 cm de hauteur, avec une ligne de vacuité individualisable et un myomètre également bien individualisable. Par contre, aucun ovaire n'est visible. A gauche, un testicule est observé et mesure 1,3 cm dans son grand axe, avec de multiples micro-calcifications. A droite, le testicule n'a pas été vu.

L'ablation du reliquat müllérien sous coelioscopie a été entreprise confirmant la présence d'un volumineux reliquat müllérien en communication avec l'urètre postérieur (sans anomalie des voies rénales) : présence d'un vagin, d'un utérus avec à droite une trompe et une bandelette ovarienne. Les résultats relatifs aux bilans hormonaux sont résumés dans le tableau 14.

## **D. Patients à caryotype normal (cohorte de 43 patients)**

Les patients de la cohorte présentent un phénotype homogène de type azoospermie non-obstructive/cryptozoospermie (variation selon les spermogrammes). Les données cliniques recueillies pour l'ensemble des patients de la cohorte sont présentées dans le tableau 15.

## **II. Caractérisation par cytogénétique conventionnelle et moléculaire**

### **A. Caryotype standard**

Le caryotype est une analyse morphologique qui permet la visualisation des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase, phase où la condensation des chromosomes est maximale. Il



contribue à la mise en évidence de remaniements chromosomiques de grande taille équilibrés ou déséquilibrés, de nombre ou de structure des chromosomes. Sa résolution est celle d'une bande chromosomique, soit environ 5 à 10 Mb. La récolte des métaphases comprend plusieurs étapes : la culture cellulaire, le blocage des mitoses en métaphase, le choc hypotonique et la fixation des chromosomes.

Un volume de sang total (prélèvement sur héparine) a été mis en culture en présence d'un milieu approprié pendant 72h à 37°C. Une solution de colcémide (10 µg/µL) a été ajoutée à la culture cellulaire pendant 1h à 37°C. La colcémide inhibe la polymérisation des microtubules, et bloque ainsi la mitose en métaphase. Une solution de choc hypotonique de KCl à 2,8 g/L (37°C, 10 min) a ensuite été additionnée. Il s'agit d'une solution pauvre en sels qui provoque une augmentation du volume cellulaire et donc une fragilisation des membranes cellulaires par osmose. Les cellules ont ensuite été fixées à trois reprises dans du fixateur Carnoy (1 volume d'acide acétique pour 3 volumes de méthanol), permettant de préserver la morphologie de la cellule et de protéger les chromosomes de toute détérioration que les traitements successifs pourraient engendrer. Après avoir récolté les métaphases, l'étalement des chromosomes a été réalisé sur des lames de verre en déposant 1 à 2 gouttes de la préparation cellulaire dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, deux principales techniques de marquage en bandes complémentaires sont utilisées. Le marquage en bandes G (mise en évidence des régions riche en bases A et T) se fait par dénaturation enzymatique à la trypsine. Le marquage en bandes R (mise en évidence des régions riche en bases G et C) est obtenu après dénaturation par la chaleur (Earle 1X, pH 6,0 à 88°C). Après dénaturation, les chromosomes ont été colorés au Giemsa (colorant permanent de l'ADN). A l'issue du marquage, les chromosomes présentent une alternance de bandes claires et sombres. L'observation des chromosomes a été effectuée à l'aide d'un microscope optique couplé à un logiciel d'analyse d'image (Cytovision, Leica Biosystems).

## **B. Hybridation *in situ* Fluorescente (FISH)**

### **1. Le principe**

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire reposant sur l'utilisation de sondes d'ADN marquées par un fluorochrome et complémentaires d'une région chromosomique d'intérêt. Les chromosomes sont obtenus de la même façon que précédemment jusqu'à l'étape d'étalement. Les lames a été traitées dans des bains successifs de PBS (Phosphate Buffered Saline), de PBS/MgCl<sub>2</sub>-Formaldéhyde et de PBS, puis déshydratées dans une série de bains d'alcool de concentrations croissantes (70%, 85%, et 100%) et séchées. L'hybridation a été réalisée par dépôt au niveau de la zone d'hybridation d'un mélange de sondes (spécifique d'un locus, du centromère, d'un subtélomère ou du chromosome entier) puis recouvert par une lamelle de verre. Les lames ont ensuite été placées dans une chambre d'hybridation humide (Thermobrite). Les étapes suivantes ont été programmées comme suit : 50-75°C pour dénaturer l'ADN et les sondes, 37-45°C pour permettre aux sondes de s'hybrider spécifiquement (température fixée en fonction des sondes utilisées). Le





lendemain, les lames ont été lavées 2 min dans une solution de SSC (Saline sodium citrate buffer) (42°C) puis 30 secondes à température ambiante dans une solution de SCC et de Tween, un détergent qui va éliminer les sondes non hybridées ou faiblement liées à l'ADN. Le montage des lames a été réalisé par dépôt d'une goutte de DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole, colorant de l'ADN) sur chaque zone d'hybridation et recouverte par une lamelle. L'observation des signaux d'hybridation sur les chromosomes a été réalisée en microscopie à épifluorescence qui permet d'exciter les préparations chromosomiques hybridées aux différentes longueurs d'onde d'excitation de chaque fluorochrome utilisé.

## 2. Application

Pour le Patient 1, les sondes suivantes ont été utilisées, conformément aux recommandations du fabricant : sondes de peinture chromosomique (WCP) spécifiques des chromosomes 7 et 12 (Kreatech), sondes centromériques spécifiques des chromosomes 7 et 12 (Vysis) et sondes subtélomériques spécifiques des chromosomes 7 et 12 (Cambio). Des analyses FISH ont aussi été réalisées avec des sondes locus-spécifiques de type BAC (Bacterial Artificial Chromosome) pour le bras court (RP4-751H1, RP11-444J21, RP11-35C21 et RP11-346G18 dans la région 12p13.31; RP11-281L3 dans la région 12p13.2; RP11-180M15 dans la région 12p13.1; et RP11-459D22 dans la région à 12p12.3) et le bras long (RP11-282A3, RP11-35C21, RP11-351C21 et RP11-95K16 dans la région 12q12; RP11-474P2 et RP3-432E18 dans la région 12q13.11; RP11-1136G11 dans la région 12q13.13; RP11-290I21 dans la région 12q14.2; RP11-444B24 dans la région 12q15; RP11-228G3, RP11-54P10, RP11-11 M4 et RP11-147C4 dans la région 12q21.33; RP11-536G4 dans la région 12q22; RP11-155C14 et RP11-434E3 dans la région 12q23.1; RP11-321F8, RP11-210L7 et RP11-553C19 dans la région 12q23.2; RP11-205I24 et RP11-43D4 dans la région 12q23.3; RP11-457O10 dans la région 12q24.11; et RP1-315L5 dans la région 12q24.12) du chromosome 12; et le bras court du chromosome 7 (RP11-505D17, RP5-1008N9 et RP11-139O17 dans la région 7p21.3; RP11-79G16 et RP11-547G15 dans la région 7p21.2) (Bluegnome, Amplitech) (Annexe 4).

Pour le patient 2 des sondes spécifiques du gène *SRY* (Cytocell, Amplitech) et des centromères des chromosomes X et Y (Vysis) ont été utilisées pour confirmer le caryotype 46,XX et l'absence du locus *SRY*.

## C. Hybridation génomique comparative sur puce à ADN (technologie CGH-array)

### 1. Principe

La CGH-array est une analyse pangénomique résolutive permettant de déceler les variations du nombre de copie de l'ADN (CNV, copy number variation) et d'y associer une cartographie précise des gènes. Cette technique détecte les remaniements chromosomiques quantitatifs (terminaux ou intercalaires) tels que les pertes (délétion hétérozygote, délétion homozygote) et les gains (duplication, triplication, amplification) au sein du génome. Le mécanisme chromosomique du remaniement sous-jacent est déterminé par FISH. La CGH-array ne permet cependant pas

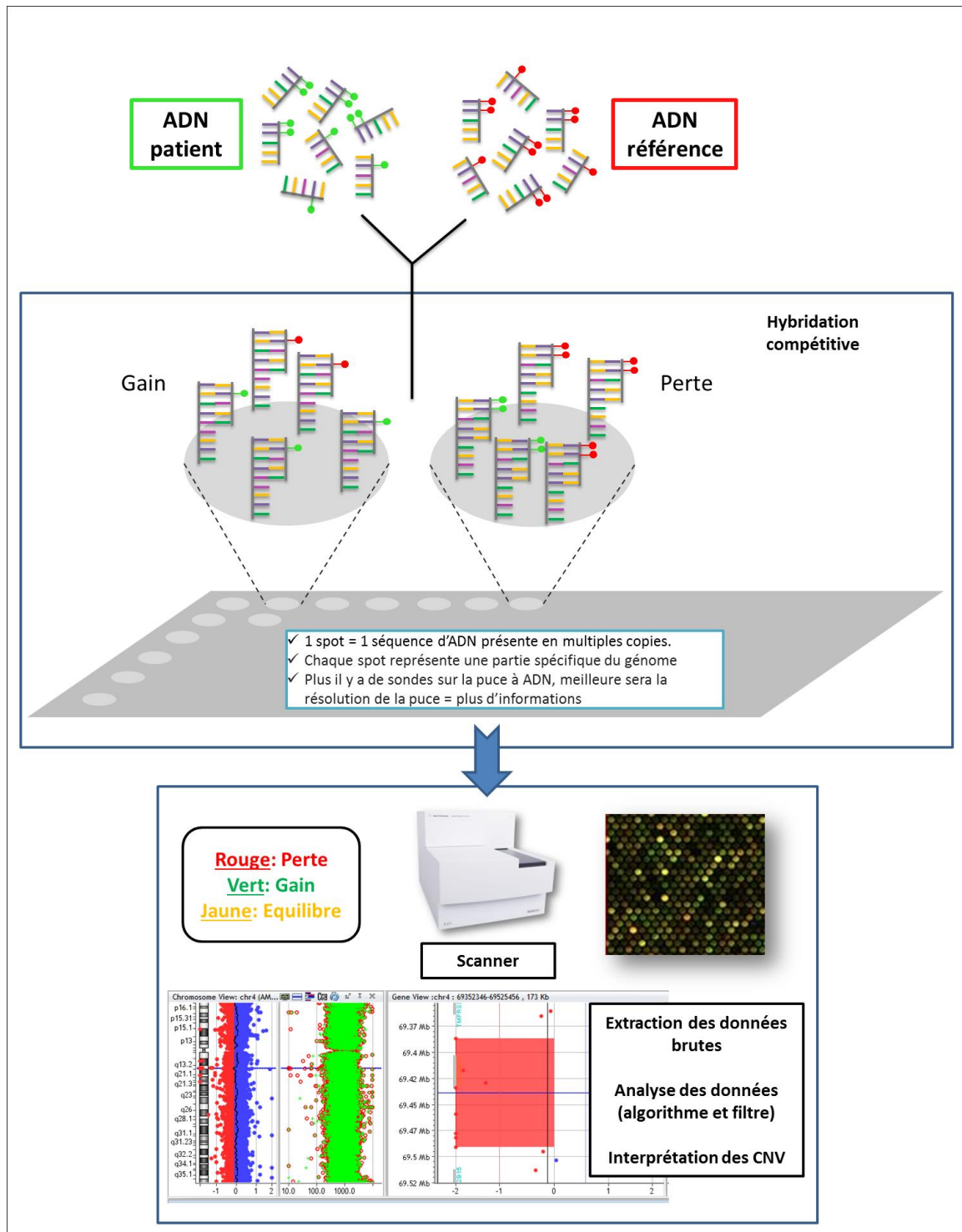


Figure 33 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur puce à ADN (CGH-array).

d'identifier une anomalie chromosomique de type équilibrée. Le principe repose sur la co-hybridation de l'ADN d'un patient et de l'ADN d'une référence normale de même sexe, en quantité égale, chacun marqué avec un fluorochrome différent (Figure 33). L'hybridation a été réalisée sur une lame de verre sur laquelle sont fixées des sondes oligonucléotidiques couvrant le génome. La résolution moyenne de la technique est déterminée par la densité des sondes et la distance qui les sépare. Pour cette étude, nous avons utilisé des puces haute résolution au format 1M (1 million de sondes) de 2,1 kb (patient 1 et 2) ainsi que des lames au format 400K personnalisées avec le design « infertilité et désordre du développement sexuel » (pour tous les patients). Une analyse par CGH-array au format 1M de sondes a été également réalisée dans le cadre de la génération des cellules iPS à partir de cellules sanguines des patients 1 et 2, dans le but de s'assurer de leur stabilité génomique.

## 2. Protocole expérimental (technologie Agilent)

L'ADN génomique a été isolé à partir du sang périphérique de tous les patients ainsi que des cellules iPS dérivées à partir des patients 1 et 2, avec le kit de purification d'ADN Maxwell® 16 Blood (Promega, Biotech). La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été évaluées avec un spectrophotomètre de type NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). L'ADN extrait a été utilisé pour la recherche des microdélétions des régions AZF du chromosome Y, l'analyse par CGH-array et le séquençage.

Des quantités de 0,5 µg de l'ADN du patient et de l'ADN de la référence ont été marquées séparément par random priming. L'ADN du patient a été marqué par la Cyanine 5 et celui de la référence par la Cyanine 3. Pour cela, un fragment de Klenow a été ajouté à la préparation ainsi que des nucléotides dont l'une des bases, la cytosine, est marquée par l'un des deux fluorochromes. Les ADN marqués ont été purifiés sur colonne. L'efficacité du marquage a été contrôlée par dosage des absorbances des Cyanines 3 et 5 au Nanodrop et par calcul des activités spécifiques. Les ADN du patient et de la référence ont alors été mélangés avec de l'ADN Cot-1 (ADN non-spécifique qui sature les séquences répétées du génome) pour limiter l'hybridation non-spécifique et ont été déposés sur la puce à ADN. La lame a été placée dans une chambre d'hybridation pendant 40 heures à 65°C. Les lames ont ensuite été démontées et lavées successivement dans du Buffer 1 à température ambiante sous agitation pendant 5 min, puis dans du Buffer 2 chauffé pendant 1 min à 37°C. La lecture des signaux d'intensité de fluorescence des ADN marqués a été réalisée grâce à un scanner automatisé (SureScan D, Agilent) dans lequel les Cyanines 3 et 5 sont excitées par un faisceau laser.

## 3. Confection d'une CGH-array à façon

Dans le cadre de l'analyse de la cohorte des patients, une puce à ADN pangénomique de format 400K, a été développée. La stratégie repose sur une couverture de l'ensemble du génome avec une résolution moyenne théorique de 5,3 kb et un enrichissement en sondes pour 445 gènes (358 gènes de l'infertilité masculine et 87 gènes DSD) sélectionnés pour avoir un rôle connu ou

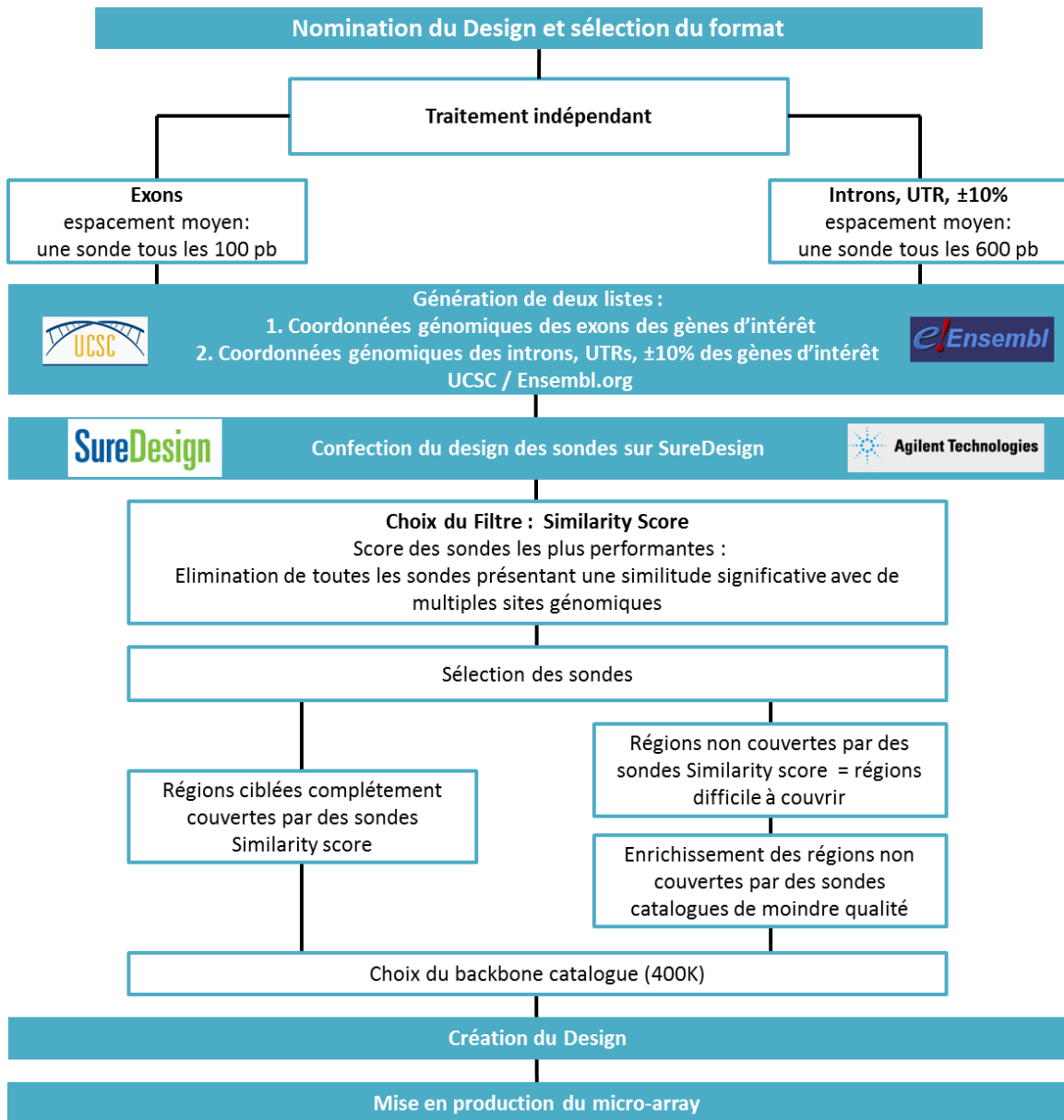


Figure 34 : Etapes de la mise au point du design CGH-array « infertilité masculine et désordre du développement sexuel ».

supposé (modèle animal) dans la fonction de reproduction et les troubles du développement sexuel (cf Annexe 3). Les coordonnées génomiques de chacun des gènes, régions UTR, exons et introns, ont été rassemblés. Pour chacun d'entre eux, 10% de la taille totale du gène a été rajouté aux extrémités, de sorte à inclure d'éventuelles régions régulatrices ou conservées.

L'étape suivante a été celle de la sélection des sondes. Le contenu d'une puce à façon se définit par l'assemblage de plusieurs groupes de sondes. La base de données Agilent HD-CGH, base de données de sondes pré-conçues de haute densité, fournit la possibilité de créer des modèles de micro-array personnalisés pour l'analyse des régions d'intérêt du génome à la résolution de notre choix. Plusieurs sondes conçues spécifiquement pour la fabrication de micro-array sont ainsi publiquement disponibles. Un filtre assurant la sélection des sondes les plus performantes (basé sur le  $T_m$  ou melting temperature, le contenu en GC, un  $\Delta G$  en épingle à cheveux, la complexité de la séquence et des mesures de l'homologie des séquences avec le reste du génome de référence) a été appliqué. Cette stratégie a permis d'enrichir la couverture de 445 gènes pour atteindre une résolution moyenne exonique de 0,1kb et intronique de 0,6kb. La stratégie du design est détaillée dans la Figure 34.

Certaines régions du génome ont été plus complexes à traiter car riche en GC ou en séquences répétées ou avec une  $T_m$  élevée. Ces régions ont constitué un autre sous-groupe et des sondes de moindre score (ou performance) ont été sélectionnées. A ces sondes s'ajoute un backbone pour garder une analyse pangénomique. A cela s'additionne également au design, des sondes catalogues de normalisation et des sondes reliquats, la conception d'une puce incluant toujours une sélection de séquences cibles de contrôle, qui seront utilisées pour estimer la performance du microarray ainsi que la qualité des hybridations.

Ce travail bioinformatique de design de la puce a fait l'objet de 6 mois de travail. Le design a été prêt pour fabrication en décembre 2016. La fabrication d'une puce à façon nécessitant le dépôt de chaque oligonucléotide sélectionné physiquement sur la lame, un délai de fabrication de 6 semaines a été nécessaire par le fabriquant. Les lames ont été livrées courant février 2017.

#### 4. Analyse et interprétation des données

Une analyse bioinformatique des données a été réalisée à l'aide du logiciel Feature Extraction. Il permet d'extraire à partir de l'image scannée les valeurs d'intensité de fluorescence verte et rouge pour l'ensemble des séquences d'ADN présentes sur la lame (valeurs normales entre 50 et 150). Une représentation graphique de ces rapports exprimés en échelle logarithmique ( $\log_2$  ratio) est établie. Les coordonnées génomiques de chaque sonde oligonucléotidique sont fournies grâce au fichier design correspondant au modèle de la puce à ADN utilisée. Ces valeurs sont alors normalisées en prenant en compte le rapport signal sur bruit de fond (valeurs normales entre 5 et 15), les rapports signal vert/bruit de fond et signal rouge/bruit de fond (valeurs normales entre 30 et 100), et la reproductibilité. La qualité de la puce a été estimée par calcul de la DLRS (Derivative Log Ratio Spread) qui évalue la cohérence de chaque spot par rapport au bruit de fond. Plus la DLRS est faible,



meilleure est la qualité des résultats (valeurs normales  $\leq 0,25$ ). Les données brutes ont ensuite été analysées par le logiciel Cytogenomics v4.0.3.12 qui fournit la liste des CNV (copy number variation) du patient et de la référence. Chaque signal correspond à une sonde sur la lame. Les spots ayant une déviation de log2 ratio à -1 correspondent à une délétion hétérozygote et ceux avec une déviation de log2 ratio à +0.56 correspondent à une duplication. Un CNV a été défini sur la base de 3 oligonucléotides consécutifs minimum déviés (perte ou gain). L'interprétation des CNV est effectuée grâce à plusieurs bases de données telles que la "Database of Genomic Variants" de Toronto (polymorphismes de séquences répertoriés), Decipher (duplications ou délétions de régions chromosomiques associées à un phénotype, une maladie ou un syndrome), Pubmed (publications et informations sur les gènes) et OMIM (gènes et phénotypes associés).

#### **D. Recherche de microdélétions du chromosome Y**

La recherche en biologie moléculaire des microdélétions du chromosome Y a été réalisée en systématique dans le cadre de l'exploration d'une infertilité masculine majeure (oligozoospermie sévère ou azoospermie). Cette analyse a été effectuée en amplifiant par PCR 19 marqueurs cibles ou STS (sequence-tagged site), répartis sur les trois régions AZFa, AZFb et AZFc: sY84, sY95, sY124, sY143, sY130, sY134, sY136, sY152, sY240, sY148, sY232, sY249, sY156, sY204, sY208, sY254, sY269, sY158 et sY160.

#### **E. Séquençage**

##### **1. Séquençage de type mate-pair (Patient 1)**

##### Préparation des bibliothèques et séquençage

L'ADN a été extrait du sang avec le kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. La concentration et la qualité de tous les échantillons d'ADN ont été quantifiées avant utilisation, à l'aide du NanoDrop. Les bibliothèques de mate-pair ont été préparées en suivant le guide de préparation « Nextera Mate-Pair Sample Preparation Guide », protocole sans gel (référence 15035209 Rev.C, Illumina) et en utilisant le Nextera Mate-Pair Sample Preparation kit (Illumina). Une quantité d'1  $\mu$ g d'ADN génomique a été fragmenté dans des inserts de 2 à 4 kb et marqué avec un adaptateur de jonction mate-pair biotinylé en utilisant une enzyme d'étiquetage de marquage nucléotidique terminal pour le mate-pair. Les fragments d'ADN ont ensuite été purifiés en utilisant des billes de type Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc.), suivies d'une circularisation des fragments d'ADN et d'une ligation enzymatique. Les grandes molécules circularisées ont été digérées par sonication en fragments de plus petite taille (~200-400 pb). Par la suite, des fragments d'ADN mate-pair biotinylés ont été isolés par liaison à des billes revêtues de streptavidine (Dynabeads 1M-280 Streptavidin - Invitrogen, Life Technologies). Un seul nucléotide 'A' a été ajouté aux extrémités 3' des fragments, qui a servi à ligaturer les adaptateurs Illumina TruSeq paired-end index Illumina TruSeq contenant un nucléotide 'T' complémentaire. Les bibliothèques





mate-pair ont été amplifiées par PCR et les produits d'amplification ont été purifiés avec des billes AMPure XP (Beckman Coulter Inc.). La concentration finale des bibliothèques mate-pair a été mesurée avec Quant-iT™ PicoGreen1 (Invitrogen) en suivant les procédures standards. Les bibliothèques MPS de chaque échantillon ont été diluées en conséquence et regroupées par groupes de quatre. Chaque groupe a été séquençé, en lectures d'extrémité paired-end de 100 pb, sur une seule ligne de flux avec le séquenceur HiSeq2500 (Illumina) suivant le protocole du fabricant.

#### Analyse des données du séquençage mate-pair

Les séquences d'adaptateurs biotinylées ont été éliminées avant l'alignement haute qualité des paires de lecture paired-end par rapport au génome de référence (GRCh37) en utilisant Burrows-Wheeler Aligner (BWA)-MEM avec les paramètres par défaut. Les paires de lecture ne s'alignant pas aussi bien que les duplicats PCR n'ont pas été analysés d'avantage. SVDetect a ensuite été utilisé pour identifier les translocations éventuelles, les inversions et les événements de grandes tailles de type délétions/insertions à partir de données paired-end discordantes s'alignant respectivement sur plusieurs chromosomes, avec une orientation inattendue du brin ou à distance de la longueur de l'insert prédéfini. Seules les prédictions SV confirmées par au moins cinq paires de lecture indépendantes ont été prises en considération pour une analyse plus approfondie. La visualisation des données MPS traitées a été réalisée avec Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute) et UCSC Génome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

#### 2. Séquençage génome entier (Patient 2)

Le séquençage complet du génome a été réalisé techniquement par le Centre National de Recherche en Génomique Humaine (Institut de Biologie François Jacob, CEA). Après un contrôle de qualité complet, l'ADN génomique (1,1 µg) a été utilisé pour préparer la librairie pour le séquençage, en utilisant le kit de préparation Illumina TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit, conformément aux instructions du fabricant. Après normalisation et contrôle de la qualité, les librairies ont été séquençées sur une plate-forme HiSeqX5 d'Illumina, en lectures de 150 pb en paired-end. Une cellule HiSeqX5 flow a été produite pour chaque échantillon, afin d'atteindre une profondeur de séquençage moyenne de 30X pour chaque échantillon. Les paramètres de qualité de séquence ont été évalués tout au long du cycle de séquençage et l'analyse standard bioinformatique des données de séquençage est basée sur le pipeline Illumina afin de générer le fichier FASTQ pour chaque échantillon.

Les traitements bioinformatiques suivants ont été effectués. Les séquences fastq ont été alignées à l'aide du programme bwa (mem + option par défaut, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) sur une version de génome issue de la référence humaine GRCh37. Un contrôle de la cohérence des nomenclatures du fichier .bam obtenu a été réalisé à l'aide des suites de programme PicardTools et Samtools (<http://picard.sourceforge.net/>, <http://samtools.sourceforge.net/>). Les duplicats ont ensuite été référencés et ajoutés dans les fichiers .bam à l'aide de la suite de programme Sambamba



(<http://lomereiter.github.io/sambamba/docs/sambamba-view.html>), une étape de réalignement des lectures a été réalisée à l'aide de la suite de programmes GATK. Les statistiques de notre contrôle qualité ont été réalisées à l'aide d'un pipeline « in-house » se basant sur les metrics générés par la suite de programme Bedtools (<http://code.google.com/p/bedtools/>) synthétisées à l'aide du logiciel R (Ross Lhaka & Robert). L'identification des variants a été réalisée à l'aide de 4 programmes de GATK : UnifiedGenotyper, HaplotypeCaller (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>), Platypus (<http://www.well.ox.ac.uk/platypus>) et Samtools. Les résultats de ces programmes ont été regroupés au sein d'un fichier .vcf dans 4 colonnes échantillons indépendantes (UnifiedGenotyper: sample.UG, HaplotypeCaller: sample.HC, Platypus: sample.PY; Samtools: sample.SB). L'annotation a été réalisée à l'aide des programmes snpEff et snpSift (<http://snpeff.sourceforge.net> et <http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html>) sur la base des données fournies par la base Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

### **III. Génération d'un modèle de cellules iPS à partir d'érythroblastes de patients**

Cette partie du travail a été réalisée dans le laboratoire « Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes » au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Fontenay-aux-Roses, Dr Leïla Maouche-Chrétien.

Deux patients présentant une particularité au caryotype (les seuls de la cohorte) ont été inclus dans cette partie de l'étude. Un consentement éclairé pour les analyses génétiques a été fourni à chacun des patients, conformément aux directives et aux règlements locaux en matière d'éthique (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris). Le protocole expérimental a été approuvé par l'Assistance Publique - Comité institutionnel Hôpitaux de Paris.

#### **A. Purification des cellules mononucléées du sang périphérique et expansion des érythroblastes**

Les PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) ont été isolées du sang périphérique des patients 1 et 2 par gradient de densité de Ficoll à l'aide de tubes fournis par le kit SepMate, selon les instructions du fabricant (SepMate™, StemCell Technologies). Un total de 150 000 PBMC ont été utilisées pour l'expansion des érythroblastes dans un milieu dédié « erythroid expansion medium » de Stemcell Technologies. Après huit à neuf jours, la population en érythroblastes a été estimée par cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD71 et anti-glyphorine-A spécifiques des érythroblastes (eBioscience).

#### **B. Reprogrammation non-intégrative des erythroblastes**

Une fois l'expansion de la population d'érythroblastes effectuée à partir des PBMC, un virus de type Sendai (Life Technologies) a été utilisé pour la reprogrammation cellulaire. Un total de 150 000 érythroblastes ont été introduit dans du milieu StemSpan contenant des cytokines érythroïdes pendant 24h. Des virus de Sendai codant pour les facteurs de pluripotence OCT3/4, SOX2, KLF4 et c-MYC ont été ajoutés, en présence de milieu StemSpan contenant des facteurs d'expansion



érythroïdes conformément aux instructions du fabricant. Deux jours plus tard, les cellules ont étéensemencées soit sur des cellules nourricières de type MEF (mouse embryonic fibroblasts) (avec un volume de milieu StemSpan en présence de cytokines érythroïdes et 2 volumes de milieu iPS complété par du bFGF), soit sur des plaques recouvertes d'une matrice artificielle de Matrigel avec un volume de milieu StemSpan en présence de cytokines érythroïdes et 2 volumes de ReproTeSR). Le milieu a été progressivement remplacé soit par un milieu 100% iPS complété par du bFGF (MEF), soit par un milieu 100% ReproTeSR (Matrigel). L'apparition des colonies iPS a été surveillée quotidiennement en observant les changements morphologiques. Les colonies sont apparues deux semaines après la transduction et ont été sélectionnées au cours des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaines.

### C. Pluripotence des cellules hiPS générées

La caractérisation de la pluripotence des cellules iPS s'assure par leur aspect phénotypique, moléculaire, et par la réalisation de tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* (tératomes chez l'animal).

#### RT-PCR

L'ARN total a été isolé des cellules iPS à l'aide du kit NucleoSpin RNA II kit (Macherey Nagel), conformément au protocole du fabricant. Une réverse transcription à partir d'1µg de chaque échantillon d'ARN a été réalisée afin d'obtenir de l'ADNc avec le kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). La RT-PCR a été programmée avec le kit GoTaq DNA Polymerase kit (Promega). Les produits de PCR générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, et analysés à l'aide du Gel Doc 2000 System (Bio-Rad). La RT-PCR pour la région codante 5' a été réalisée avec les amorces spécifiques du gène *OCT4* (amorces sens 5'-AGCGAACCAGTATCGAGAAC-3' et anti-sens 5'-TTACAGAACCACACTCGGAC-3'), *SOX2* (amorces sens 5'-AGCTACAGCATGATGCAGGA-3' et anti-sens 5'-GGTCATGGAGTTGTACTIONGCA-3'), *NANOG* (amorces sens 5'-TGAACCTCAGCTACAAACAG-3' et anti-sens 5'-TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG-3'), *TBP* (amorces sens 5'-CTCACAGGTCAAAGGTTTAC-3' et anti-sens 5'-GCTGAGGTTGCAGGAATTGA-3'), *REX1* (amorces sens 5'-CAGTCCAGCAGGTGTTTGC-3' et anti-sens 5'-GCATTCTATGTAACAGTCTGAGA-3').

#### Immunocytochimie

Pour les analyses d'immunofluorescence, les cellules ont été fixées par incubation dans 4% de paraformaldéhyde durant 30 min et bloquées par incubation avec 3% de BSA et 5% de sérum d'âne dans du PBS (Chemicon). Les cellules ont ensuite été incubées toute la nuit en présence des anticorps primaires dirigés contre OCT3/4 (1:100) (Abcam ab19857), SSEA-4-AF555 (1:50) (BD560218) et Tra-1-60-AF488 (1:100) (Miltenyi Biotec). Les cellules ont été lavées et l'anticorps anti-lapin d'âne IgG (Life Technologies) additionné pour la détection d'OCT3/4.



## Formation des tératomes

Des cellules iPS confluentes et non différenciées ont été soumises à un traitement d'1mg/ml de collagénase IV (Roche), re-suspendues dans un mélange de DMEM (PAA), Matrigel (Becton Dickinson) et collagène (Life Technologies) (2:1:1) et injectées par voie intra-musculaire à des souris immunodéficientes âgées de 7 à 10 semaines. Des tératomes se sont formés en 8 à 12 semaines. Ils ont été excisés et fixés. Une analyse histologique effectuée sur des coupes marquées à l'hématoxyline et à l'éosine a ensuite été réalisée. Tous les animaux ont été utilisés selon les protocoles approuvés par le comité consultatif local d'éthique animale, enregistrés auprès du ministère français de la recherche et conformément au règlement national français (Transposition nationale de la directive européenne 2010/63/CE). Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le CEA.

### **IV. Différenciation des cellules iPS en cellules de la lignée germinale**

Cette partie du travail a été réalisée au laboratoire de «Développement des Gonades» du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Fontenay-aux-Roses, Pr Gabriel Livera.

#### **A. Réversion de l'état amorcé vers l'état naïf de la pluripotence**

Les cellules hiPS à l'état amorcé ont été converties à l'état naïf de la pluripotence en les cultivant sur MEF dans du milieu knock-out DMEM (thermofisher) supplémenté avec 20% de KSR (thermofisher), 2 mM de L-Glutamine (thermofisher), 1X MEM NEAA (thermofisher) et 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoethanol (thermofisher), et additionné de basic fibroblast growth factor (b-FGF) (thermofisher), human leukemia inhibitory factor (LIF) (thermofisher), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ ) (TEBU-Bio), ainsi que 4 inhibiteurs (ou 4i : CHIR99021, PD0325901, SB203580 et SP600125) (R&D systems). Pour leur premier passage dans ce milieu, les cellules ont été repiquées en cellules individualisées par l'action de l'accutase. Pour chaque passage, 10  $\mu$ M d'inhibiteur ROCK (TEBU-Bio) ont été utilisés. Les cellules ont été maintenues dans le milieu 4i hiPS pendant deux semaines en remplaçant le milieu quotidiennement. Les cellules ont été maintenues dans ce milieu 4i hiPSC pendant deux semaines et les colonies croissantes de cellules hiPS à l'état naïf ont été récupérées et repiquées tous les 2-3 jours. Les cellules hiPS à l'état naïf, colonies en forme de dôme, ont été obtenues au bout de deux semaines après plusieurs passages.

#### **B. Différenciation des cellules hiPS à l'état naïf en cellules de la lignée germinale**

Les colonies de cellules iPS à l'état naïf ont été séparées en cellules individuelles à l'accutase puisensemencées (100 000 cellules/puit) dans des boîtes de culture 96 puits non adhérentes. Les cellules hiPS naïves ont été centrifugées pour induire la formation de corps embryonnaires (EB). Simultanément à la formation d'EB, la différenciation des cellules hiPS naïves en cellules germinales primordiales a été induite par la culture des EB en milieu GMEM (thermofisher) complété par 20% de





KSR (thermofisher), 2 mM de L-Glutamine (thermofisher), 1X MEM NEAA (thermofisher), 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma), 50 µM de mercaptoethanol (thermiculteur), 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (Sigma), 500 ng/ml de BMP2/4 (TEBU-Bio), 1 µg/ml de LIF (thermofisher), 100 ng/ml de SCF (TEBU-Bio), 50 ng/ml d'EGF (TEBU-Bio) et 10 µM d'inhibiteur ROCK ou ROCKi (TEBU-Bio). Après 4 jours, les EB ont été observés au centre de chaque puits. Trois à cinq EB ont été fixés au formaldéhyde et à la paraffine pour chaque clone étudié, puis des sections de paraffine des EB ont été utilisées pour des expériences d'immunohistochimie. Pour les analyses par qRT-PCR, 28 EB ont été utilisés pour chacun des clones.

### Immunohistochimie

La paraffine a été retirée des coupes puis ces dernières ont été réhydratées dans plusieurs bains de toluène, d'alcool (100° et 96°) et de l'eau. L'activité peroxydase endogène et la liaison protéique non-spécifique ont été bloquées en incubant les coupes dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis dans du sérum normal de cheval à 2,5%. Les sections ont été incubées avec un anticorps anti-AP2γ ou anti-D2-40 pendant 1 heure à 37°C. L'anticorps primaire a été détecté après incubation avec un anticorps secondaire anti-souris. Enfin, l'activité peroxydase a été mise en évidence par la DAB (diaminobenzidine). Les sections ont été rincées dans une solution de PBS entre chaque étape. Les analyses et les quantifications des cellules AP2γ+ ou D2-40+ ont été réalisées par le logiciel VisioLab.

### Extraction de l'ARN et réaction de transcription inverse

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit (Epicentre, USA) en suivant les instructions fournies par le fabricant. La transcription inverse a été effectuée à l'aide du kit SuperScript Vilo Master Mix (Thermofisher Scientific, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant. Un total de 500 ng d'ARN a été utilisé dans les réactions de transcription inverse. La synthèse d'ADNc dans 20 µl de volume total a été réalisée comme suit : 4 µl de 5X Super Script VILO Master Mix, 500 ng d'ARN total, complété à 20 µL par de l'eau-DEPC. Après avoir mélangé le contenu des tubes et incubé à 25°C pendant 10 min, la synthèse de l'ADNc a été effectuée à 42°C pendant 60 minutes puis à 85°C pendant 5 minutes pour l'inactivation de la transcriptase inverse. L'ADNc a ensuite été utilisé pour la qPCR.

### Real-Time PCR

Les amplifications par PCR ont été effectuées à l'aide du système Real-Time PCR Mini-Opticon System (Biorad) et du kit IQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad) selon le protocole du fabricant. Une quantité de 2 µl de l'ADNc du premier brin (1: 5) ont été utilisés pour l'amplification en triplicat dans une solution de réaction de 10 µL contenant du SYBR® Green et 10 pmol de chaque amorce. Le programme de PCR suivant a été utilisé : 95°C pendant 3 min, 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 10 s, 6°C pendant 30 s. Les dilutions en série de chaque transcription ont été utilisées pour déterminer l'efficacité d'amplification de chaque cible et du gène de ménage (*RPLP0*). Dans la

Gènes	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
<i>OCT3/4</i>	CTGCAGCAGATCAGCCACAT	CACATCCTTCTCGAGCCCAA
<i>NANOG</i>	TGGCCGAAGAATAGCAATGG	AGTCGGGTTACACCAGGCAT
<i>D2-40</i>	TGTGGTTATGCGFAAAAATGTCG	CCTTCAGCTCTTTAGGGCGAG
<i>CD-38</i>	GGCGCGATGCGTCAAGTACACTG	CCTAGCAGCGTGCCTCCAGGGTG
<i>NANOS3</i>	AGGAGCAGGTTTCAGAGGTGC	AGAGCAGGAGGGCGAAGG
<i>c-KIT</i>	TGAATCTACTTGGAGCCTGCAC	CTGTAATGACCAGGGTGGGC
<i>AP2<math>\gamma</math></i>	GTACGAAGAGGACTGCGAGGA	GGATTCCCATTGCTGCTCC
<i>DAZL</i>	TACTCCACCCTCTGGAAATGG	GCTTCGGTCCACAGATTTCTT
<i>VASA</i>	GCCTCTGGGCGGAATTTT	CGCTTATTACACTCACCAGCATG

Tableau 16 : Liste des amorces des gènes cibles.

présente étude, les données ont été obtenues par analyse avec le logiciel BioRad MFX Software 2.0 et ont été présentées comme une variation de l'expression du gène cible normalisé par rapport au gène de contrôle interne. Le cycle de seuil moyen (CT) a été calculé pour le gène cible et le gène *RPLP0*, et le  $\Delta CT$  a été déterminé comme suit : [moyenne des valeurs de CT triplées pour le gène cible] - [moyenne des valeurs de CT triplées pour RPLP0]. Le  $\Delta\Delta CT$  a représenté la différence entre les échantillons appariés, calculés selon la formule  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ de l'échantillon} - \Delta CT \text{ de contrôle})$ . L'analyse statistique a été effectuée avec le test ANOVA. Les amorces pour différents gènes cibles sont listées dans le tableau 16.



## **RESULTATS**



## I. Génération d'une lignée de cellules pluripotentes induites à partir d'érythroblastes d'un homme azoosperme porteur d'un remaniement chromosomique complexe : un modèle *in vitro* pour l'étude de l'infertilité masculine

La génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS) est une avancée technologique récente (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2007) (Yamanaka, prix Nobel de médecine 2012). Les cellules iPS sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes ou fœtales différenciées après transfert, dans ces cellules, de différents facteurs de transcription induisant la pluripotence. Les cellules iPS ont la capacité de se différencier en n'importe quelles cellules de l'organisme, y compris en gamètes, en réponse à un signal exogène. Cette propriété ouvre de nombreuses voies en matière de recherche sur les maladies et de mise au point de nouveaux traitements (Dimos *et al.*, 2008, Maherali *et al.*, 2007, Okita *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2008, Wernig *et al.*, 2007).

Dans cette étude, publiée dans le journal Scientific Reports (cf article 1), nous décrivons la caractérisation d'un remaniement chromosomique complexe (RCC) du patient 1, un homme âgé de 38 ans présentant une azoospermie non-obstructive, ainsi que la dérivation de cellules iPS à partir de ses érythroblastes. Le RCC a été investigué par la réalisation des techniques de caryotype, d'hybridation *in situ* fluorescente et de CGH-array (1M, Agilent). Ces analyses ont révélé un RCC survenu *de novo* impliquant cinq points de cassure suite à l'insertion d'un segment du bras long d'un chromosome 12 dans le bras court d'un chromosome 7, et l'inversion péricentrique du chromosome 12 structurellement réarrangé. Les analyses par FISH nous ont permis d'estimer la localisation des points de cassure. La cartographie en gènes de ces régions ont identifié un gène candidat, *SYCP3*, dont l'interruption pourrait être à l'origine de l'infertilité du patient. L'analyse par CGH-array n'a pas permis de mettre en évidence de déséquilibre chromosomique aux points de cassure ou ailleurs dans le génome.

L'anomalie chromosomique complexe ainsi mise en évidence chez le patient 1 a ensuite été dans un 2<sup>ème</sup> temps modélisée par la génération de cellules iPS. Des érythroblastes du patient ont été reprogrammés avec succès en cellules iPS en utilisant un virus Sendai, non intégratif, exprimant les facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC. La pluripotence des cellules iPS a été confirmée par l'évaluation de l'expression des marqueurs de la pluripotence (OCT3/4, SSEA1 et TRA-1-60) et par la formation de tératomes comportant des tissus différenciés issus des trois feuillets embryonnaires.

La génération de cellules iPS à partir de patients infertiles fournit un modèle de choix pour l'étude de la formation des gamètes dans un contexte de remaniement chromosomique. La lignée ainsi générée représente un nouveau système d'étude des défauts du développement des cellules germinales et des mécanismes régulant la spermatogenèse.





## **ARTICLE 1**

**Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal rearrangement as a genetic model for infertility studies**

Aurélie Mouka, Vincent Izard, Gérard Tachdjian, Sophie Brisset, Frank Yates, Anne Mayeur, Loïc Dré villon, Rafika Jarray, Philippe Leboulch, Leila Maouche-Chrétien et Lucie Tosca

Scientific Reports. 2017; 7:39760



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal rearrangement as a genetic model for infertility studies

Received: 13 September 2016

Accepted: 24 November 2016

Published: 03 January 2017

Aurélie Mouka<sup>1,2</sup>, Vincent Izard<sup>3</sup>, Gérard Tachdjian<sup>1,2</sup>, Sophie Brisset<sup>1,2</sup>, Frank Yates<sup>4</sup>, Anne Mayeur<sup>1</sup>, Loïc Drévilon<sup>1</sup>, Rafika Jarray<sup>4</sup>, Philippe Leboulch<sup>5</sup>, Leaila Maouche-Chrétien<sup>5,\*</sup> & Lucie Tosca<sup>1,2,\*</sup>

Despite progress in human reproductive biology, the cause of male infertility often remains unknown, due to the lack of appropriate and convenient *in vitro* models of meiosis. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from the cells of infertile patients could provide a gold standard model for generating primordial germ cells and studying their development and the process of spermatogenesis. We report the characterization of a complex chromosomal rearrangement (CCR) in an azoospermic patient, and the successful generation of specific-iPSCs from PBMC-derived erythroblasts. The CCR was characterized by karyotype, fluorescence *in situ* hybridization and oligonucleotide-based array-comparative genomic hybridization. The CCR included five breakpoints and was caused by the inverted insertion of a chromosome 12 segment into the short arm of one chromosome 7 and a pericentric inversion of the structurally rearranged chromosome 12. Gene mapping of the breakpoints led to the identification of a candidate gene, *SYCP3*. Erythroblasts from the patient were reprogrammed with Sendai virus vectors to generate iPSCs. We assessed iPSC pluripotency by RT-PCR, immunofluorescence staining and teratoma induction. The generation of specific-iPSCs from patients with a CCR provides a valuable *in vitro* genetic model for studying the mechanisms by which chromosomal abnormalities alter meiosis and germ cell development.

Infertility is a complex disorder affecting 10 to 15% of couples of reproductive age worldwide<sup>1,2</sup>. Male infertility is the cause in about half the affected couples, and in 20% of cases, abnormalities are found only in the man. Most commonly, male infertility is associated with a defect of sperm parameters in terms of quantity and mobility (oligoasthenozoospermia). At worst, there are no spermatozoa in semen, a condition known as azoospermia. Azoospermia may be obstructive due to anatomical problems, infectious disease or vasectomy, or non-obstructive due to genetic defects, hormonal imbalance and environmental factors. However, a large proportion of affected men have idiopathic infertility, reflecting our poor understanding of the basic mechanisms regulating spermatogenesis.

<sup>1</sup>AP-HP, Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Antoine Bécclère, 92140, Clamart, France. <sup>2</sup>Université Paris-Sud, 94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France. <sup>3</sup>AP-HP, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Antoine Bécclère, 92140, Clamart, France. <sup>4</sup>Sup'Biotech Villejuif 94800, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), SEPIA, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. <sup>5</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), 92265 Fontenay-aux-Roses; UMR-E 007, Université Paris-Saclay, 91400 Orsay; INSERM, 75013 Paris, France. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.T. (email: lucie.tosca@abc.aphp.fr)

Spermatogenesis is a complex process by which haploid gametes are formed through a specific type of cell division called meiosis. Meiotic abnormalities can occur at any stage of maturation and frequently contribute to reproductive failure. About 10% of infertile men display a major impairment of sperm production<sup>3</sup>.

Chromosomal abnormalities, including aneuploidies, deletions, microdeletions of the AZF region of the Y chromosome, duplications, small supernumerary marker chromosomes, translocations, insertions, and inversions, may be the underlying cause of the failure to complete meiosis<sup>4–16</sup>. Such chromosomal aberrations have been shown to affect meiotic synapsis and chromosome pairing<sup>17</sup>, resulting in both infertility and spontaneous abortions. However, despite the great insight into the genetics of infertility provided by conventional and molecular cytogenetic tools, our knowledge of the genetic causes of male infertility remains limited.

Various models have been developed to explain the relationship between chromosome mismatching during meiosis and spermatogenesis alterations<sup>18</sup>. A correlation between poor chromosome pairing or a complete absence of pairing and gametogenesis failure has been demonstrated in the *Drosophila* model<sup>18</sup>. Furthermore, changes in the expression of essential genes may account for spermatogenesis defects. Studies of male reproductive function in humans are hindered by the lack of human testicular specimens, which are not easy to obtain. Targeted mutagenesis in mice is the strategy most widely used for the modeling of meiosis abnormalities and for analyses of spermatogenesis failure and investigations of the causes of male infertility<sup>19</sup>. Studies of mouse models have led to the identification of 388 genes involved in spermatogenesis, but their relevance to human infertility remains to be demonstrated<sup>20</sup>.

Advances in cytogenetics and molecular biology have led to the identification of candidate genes in humans on the basis of the phenotype observed in knockout mouse models<sup>20</sup>. However, despite substantial efforts, the etiology and genetic causes of spermatogenic failure remain unexplained in a large proportion of infertile men.

Techniques for reprogramming adult cells to readopt a pluripotent state have paved the way for a new era of disease modeling<sup>21–26</sup>. Indeed, the induced pluripotent stem cell (iPSC) technology pioneered by Shinya Yamanaka in 2006 has potential for unlimited expansion and can generate the cells of all three germ layers<sup>27</sup>. This is an essential property for research on diverse diseases and adjustments to treatment, opening up many new treatment possibilities<sup>28,29</sup>. Patient-specific iPSCs, with the same genetic background as the donor cells, provide unprecedented human models for studying genetic disorders<sup>30</sup>. Induced pluripotent stem cells have recently been generated from the fibroblasts of azoospermic men carrying deletions in the AZF region<sup>31</sup> and from patients with Klinefelter syndrome (47, XXY)<sup>32,33</sup>.

We describe here the case of an azoospermic patient carrying a *de novo* complex chromosomal rearrangement (CCR). This patient was found to have a two-step CCR with five breakpoints due to the inverted insertion of a chromosome 12 segment into the short arm of one chromosome 7 and a pericentric inversion of the structurally rearranged chromosome 12. We identified SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) as a potential candidate gene responsible for his infertility. Through non-invasive primary cell collection and the use of non-integrative Sendai viruses expressing the human *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *C-MYC* genes, we generated patient-specific iPSC lines to model this CCR for future studies. The pluripotency of the iPSCs was confirmed by assessing the expression of pluripotency markers and teratoma formation after injection of the cells into immunodeficient mice. The iPSCs derived in this study constitute the first genetic model for *in vitro* studies of the mechanisms by which chromosomal aberrations affect spermatogenesis in humans ever described.

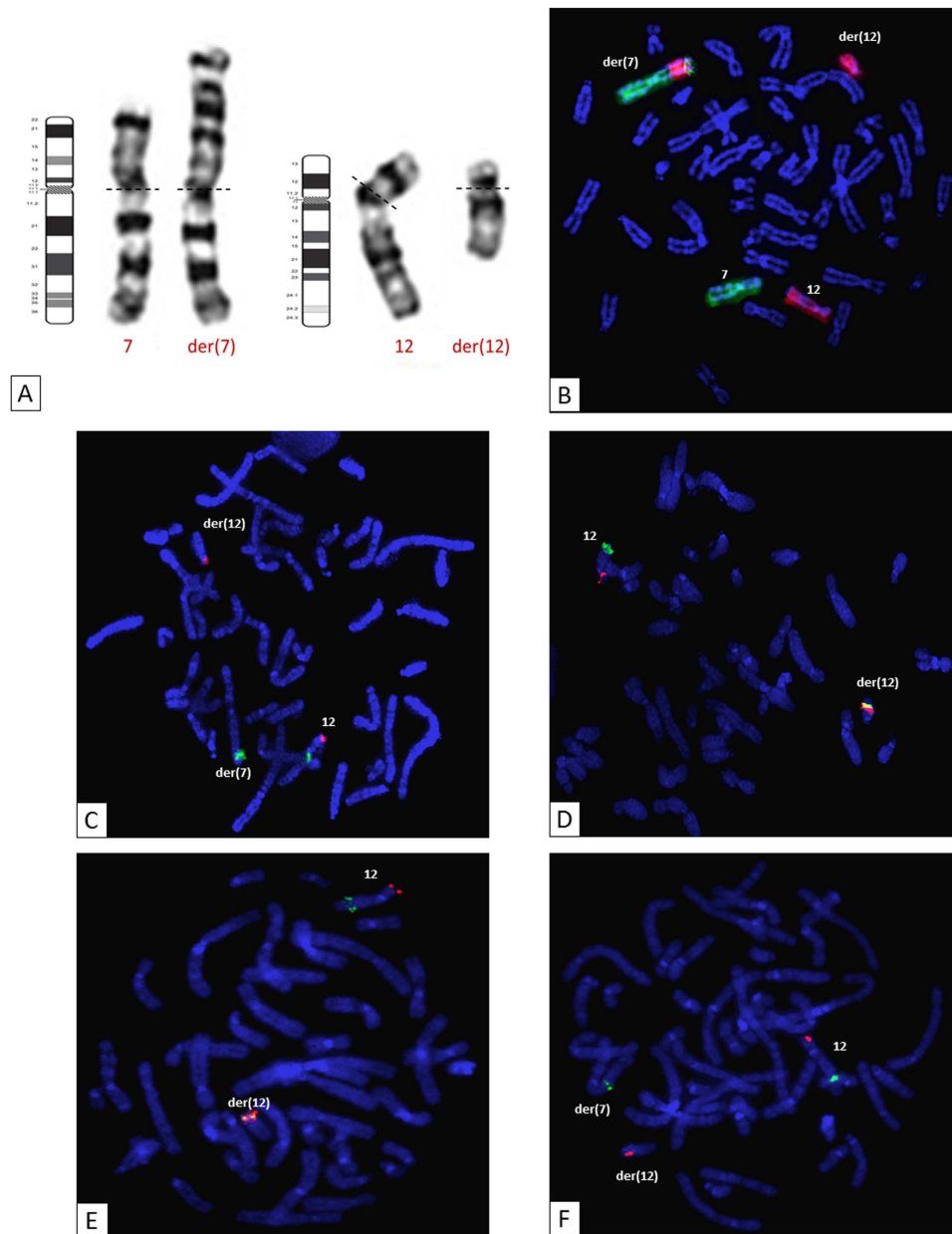
## Results

**Conventional and molecular characterization of the CCR.** Conventional cytogenetic analyses revealed a CCR involving structural abnormalities of chromosomes 7 and 12. The patient carried an abnormal chromosome 7, with an abnormally long short arm, and an abnormal chromosome 12, both arms of which were shortened (Fig. 1A).

We used whole chromosome-specific DNA probes for chromosomes 7 and 12 to characterize the chromosomal mechanism of the CCR (Fig. 1B). An analysis of the hybridization pattern observed revealed that a region of chromosome 12 had inserted into the short arm of one chromosome 7 (Fig. 1B). This insertion event was confirmed by the use of a probe binding to the 12q13.13 region (Fig. 1C). This probe hybridized to the long arm of the normal chromosome 12 and the short arm of the der(7) (derivative chromosome 7), confirming the insertion event (Fig. 1C). The insertion was shown to be inverted (Supplementary Table 1). In addition to the rearrangement mentioned above, chromosome 12 displayed aberrant G banding and had a short arm that was abnormally short (Fig. 1A). All the subtelomeric ends were in their usual positions on chromosomes 7 and 12 and their derivatives (data not shown). FISH analysis was performed with two probes, one binding to the short arm of chromosome 12 in the 12p13.1 region and the other binding to the long arm of chromosome 12 in the 12q24.11 region: the 12q24.11 probe signal was detected in its normal position on the normal and der(12) (derivative chromosome 12), whereas the 12p13.1 probe signal was located on the long arm of chromosome 12 (Fig. 1D). These results indicate that a pericentric inversion of the der(12) had occurred in addition to the insertion event.

Two breakpoints were predicted in the 12q23.2 region, rather than a common breakpoint for the two events (Fig. 2). Using a probe binding to the chromosome 12:101, 652, 072–101, 831, 070 interval of the 12q23.2 region, we detected two distinct signals for these probes on metaphases (Fig. 1E,F and Supplementary Table 1). These results ruled out the existence of a common breakpoint, instead suggesting that there was a fifth breakpoint.

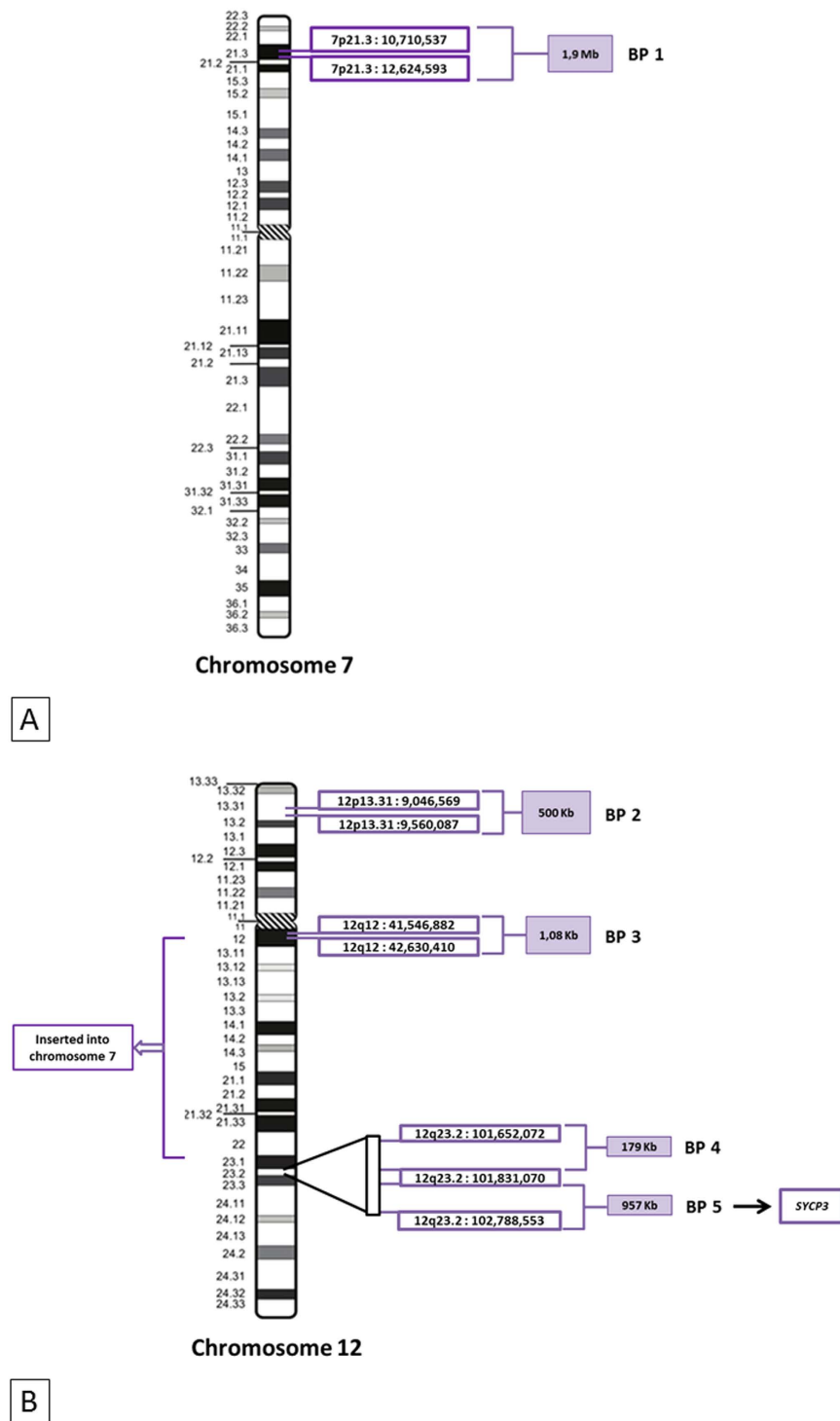
We used a molecular cytogenetic approach based on FISH to define the location of the breakpoints involved in the CCR. The results and the BAC probes used for these experiments are listed in Supplementary Table I. In total, five breakpoints were implicated in this CCR (Fig. 2A and B). We identified three breakpoints for the insertion event on der(7) and der(12): one breakpoint on the short arm of der(7), corresponding to the 7p21.3 chromosome band (chr7:10, 710, 537–12, 624, 593), and two breakpoints on the long arm of der(12), at 12q12 (chr12:41, 546, 882–42, 630, 410) and 12q23.2 (chr12:101, 652, 072–101, 831, 070) (Supplementary Table 1 and Fig. 2). The inversion gave rise to two other breakpoints on der(12), in regions 12p13.31 (chr12:9, 046, 569–9, 560, 087) and



**Figure 1. Conventional cytogenetic analysis.** (A) Chromosome 7 and 12 G-banded karyotype and ideogram representation, showing structural abnormalities on chromosomes 7 and 12 [der(7) and der(12), respectively]. (B) Whole-chromosome painting probes for chromosomes 7 (green) and 12 (red) demonstrated the insertion of part of chromosome 12 into the short arm of chromosome 7. (C) Insertion event: FISH with BAC probes specific for the 12p13.31 (RP4-751H1; red) and 12q13.13 (RP11-1136G11; green) regions. (D) Inversion event: FISH with BAC probes specific for the 12p13.1 (RP11-180M15; red) and 12q24.11 (RP11-457O10; green) regions. (E,F) The fifth breakpoint: FISH with BAC probes specific for the 12p13.31 (RP11-444J21; red) and 12q23.2 (RP11-321F8; green) regions.

12q23.2 (chr12:101,830,070–102,788,553) (Supplementary Table 1). The chromosomal formula (ISCN 2013) was: 46, XY, inv(12)(p13.31q23.2), ins(7;12)(p21.3;q23.2q12). Gene mapping in these regions identified a candidate gene in the 12q23.2 region: *SYCP3*, an essential structural component of the synaptonemal complex involved in the synapsis, recombination and segregation of meiotic chromosomes.

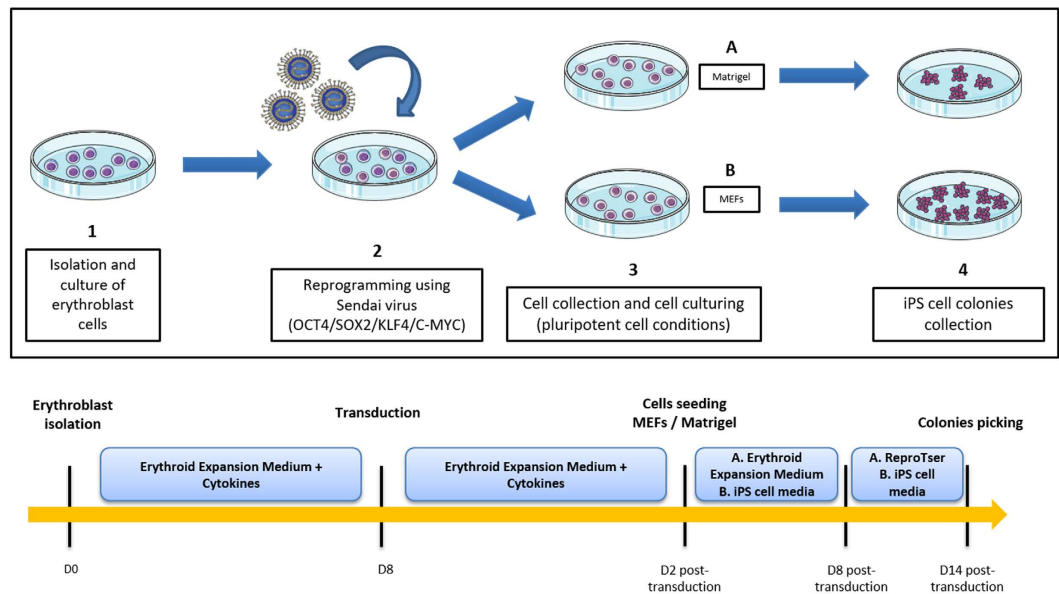
Array-CGH was performed to assess the presence of cryptic imbalance at the CCR breakpoints or elsewhere in the genome. This analysis revealed no relevant DNA copy number variation that might account for the azoospermia phenotype. Thus, the patient carried a balanced complex chromosomal rearrangement. The karyotypes of his parents were normal, so the chromosomal rearrangement observed in the patient had occurred *de novo*. Furthermore, molecular analysis revealed the absence of a microdeletion in the AZF a/b/c regions.



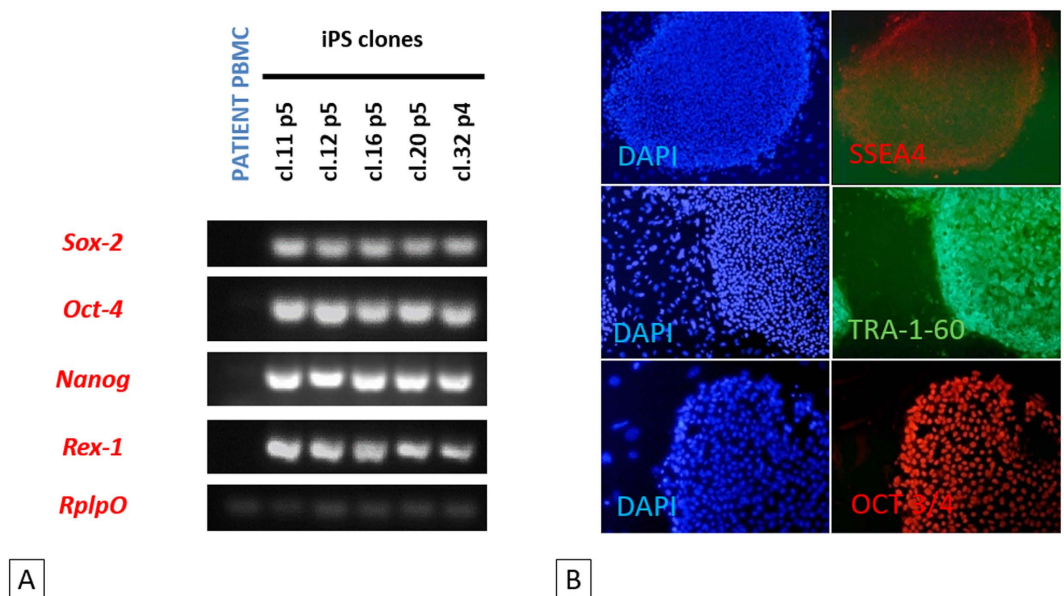
**Figure 2. Location of the complex chromosomal rearrangement breakpoints.** Ideograms for chromosome 7 (A) and chromosome 12 (B), showing the five breakpoints identified by successive FISH hybridizations (see Supplementary Table1). BP5 contained the *SYCP3* gene. BP: breakpoint.

### Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from the patient's erythroblasts.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from blood collected from the patient, and cultured in specific medium to induce erythroblast differentiation. After nine days of expansion, FACS analysis with antibodies known to bind erythroid cell surface markers revealed that about 60% of the cells were CD71<sup>+</sup> and GpA<sup>+</sup> erythroblasts. We generated patient-specific iPSCs, by transducing erythroblasts with Sendai viruses expressing the four reprogramming factors and culturing them on mouse embryonic fibroblast feeder cells or a Matrigel-coated plate. The cells began to adopt an iPSC-like morphology 15 days after transduction. Colonies were collected and expanded. Larger numbers of iPSC colonies were generated from culture on MEFs than in



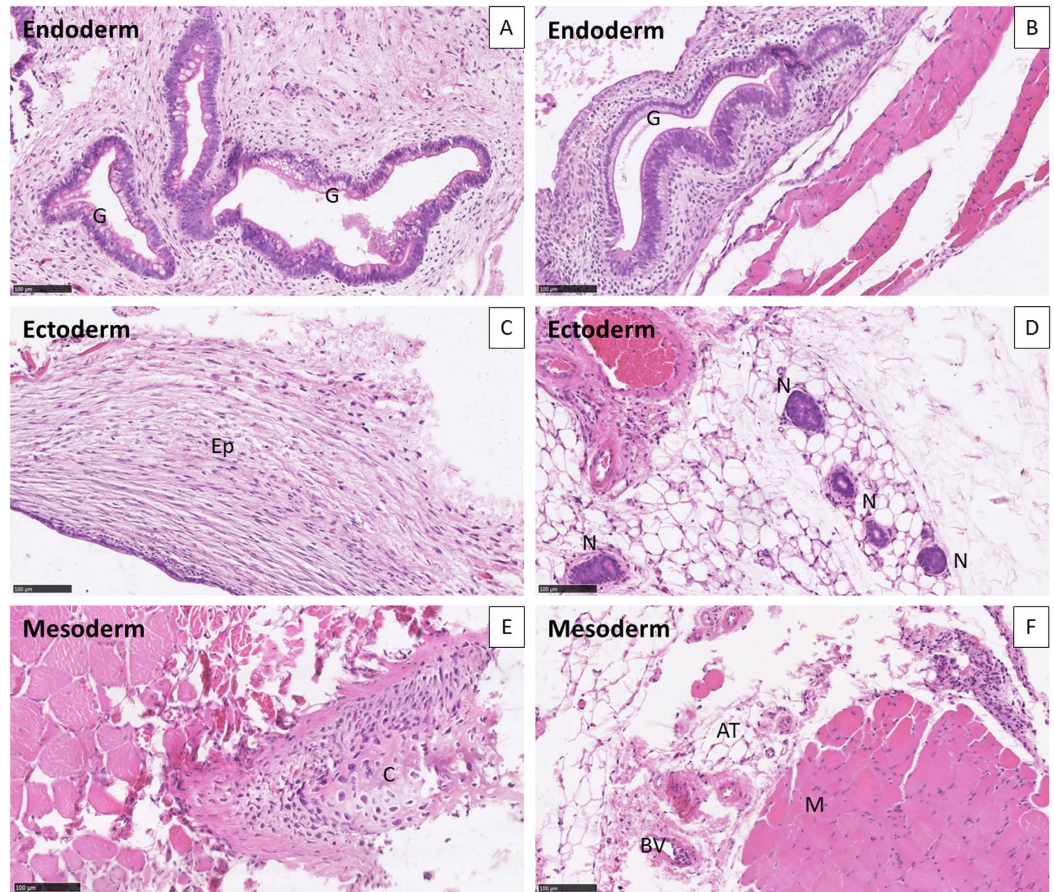
**Figure 3. Timeline and result of *in vitro* generation of human induced pluripotent stem cells on MEFs and Matrigel.** C-Myc: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; D: day; iPSCs: induced pluripotent stem cells; KLF4: Kruppel-like factor 4 (gut); MEF: mouse embryonic fibroblast; OCT4 (also called POU5F1): POU class 5 homeobox 1; SOX2: SRY-box 2. The figure was produced, in part, by using Servier Medical Art, ([www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)).



**Figure 4. Endogenous expression of pluripotency-related markers by iPSCs. (A)** RT-PCR analysis for detection of the pluripotency markers *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* and *REX-1*. All the patient iPSC clones tested expressed these genes. See full-length gels in Supplementary Figure 2. **(B)** Immunofluorescence staining of three stem cell proteins (SSEA4, TRA-1-60 and OCT3/4) in patient iPSC clones 12 and 32. Both clones 12 and 32, at passages 5 and 4, respectively, expressed the three pluripotency markers used.

Matrigel conditions. Moreover, in the long term, growth on MEF feeder cells resulted in more stable iPSC lines. Five clones were evaluated for pluripotency. The protocol is summarized in Fig. 3.

**Pluripotency marker expression.** We investigated the pluripotency of the five selected iPSC clones, by analyzing the expression of the endogenous pluripotency marker genes *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* and *REX-1* by RT-PCR. *RPLP0* gene expression was used as an internal control for this assay. The pluripotency markers were strongly expressed in all five iPSC clones but not in the primary cells (PBMCs) from the patient (Fig. 4A) We also performed immunofluorescence assays, in which we observed the specific staining of SSEA4, TR-1-60 and



**Figure 5. Germ cell layer components within teratomas.** The differentiation, at passage 6, of iPSCs into ectoderm, endoderm and mesoderm was evaluated on whole sections stained with hematoxylin and eosin, for iPS clones 12 (A,C,E) and 32 (B,D,F). Both clones displayed structures representing the three lineages: (A,B) endoderm. (C,D) ectoderm. (E,F) mesoderm. Hematoxylin and eosin stain,  $\times 20$ . AT, adipose tissue; BV, blood vessel; C, cartilage; G, gut epithelial tissue; Ep, keratin-containing epidermal tissue; M, striated muscle; N, neural tissue.

OCT3/4 pluripotency markers in iPSC colonies (Fig. 4B). Thus, the iPSC-like clones derived from the infertile patient expressed conventional pluripotency markers, indicating that they had been successfully reprogrammed.

**Evaluation of pluripotency and of the differentiation potential of patient-specific iPS clones.** We explored the teratoma-forming potential of two patient-specific iPS clones (cl-12 and cl-32), and carried out a histological analyses of tumors derived from these clones. These teratoma assays provided a clear evaluation of the impact on differentiation and proliferation of patient iPSCs *in vivo* over a period of several weeks. For the teratoma assay, colonies were picked during early passages (p6) and injected into muscle. Patient-specific iPS clones 12 and 32 produced teratomas (Fig. 5).

Histological analysis of the tumors produced showed that these cells had differentiated into endodermal (a, b), ectodermal (c, d) and mesodermal (e, f) tissues, in the form of glandular gut-like epithelium (G), epidermal tissue (Ep), neural tissue (N), large cartilaginous areas (C), muscle (M), adipocyte tissue (AT) and blood vessels (BV) (Fig. 5). The tissues were well-differentiated, without malignancy, in all the structures observed.

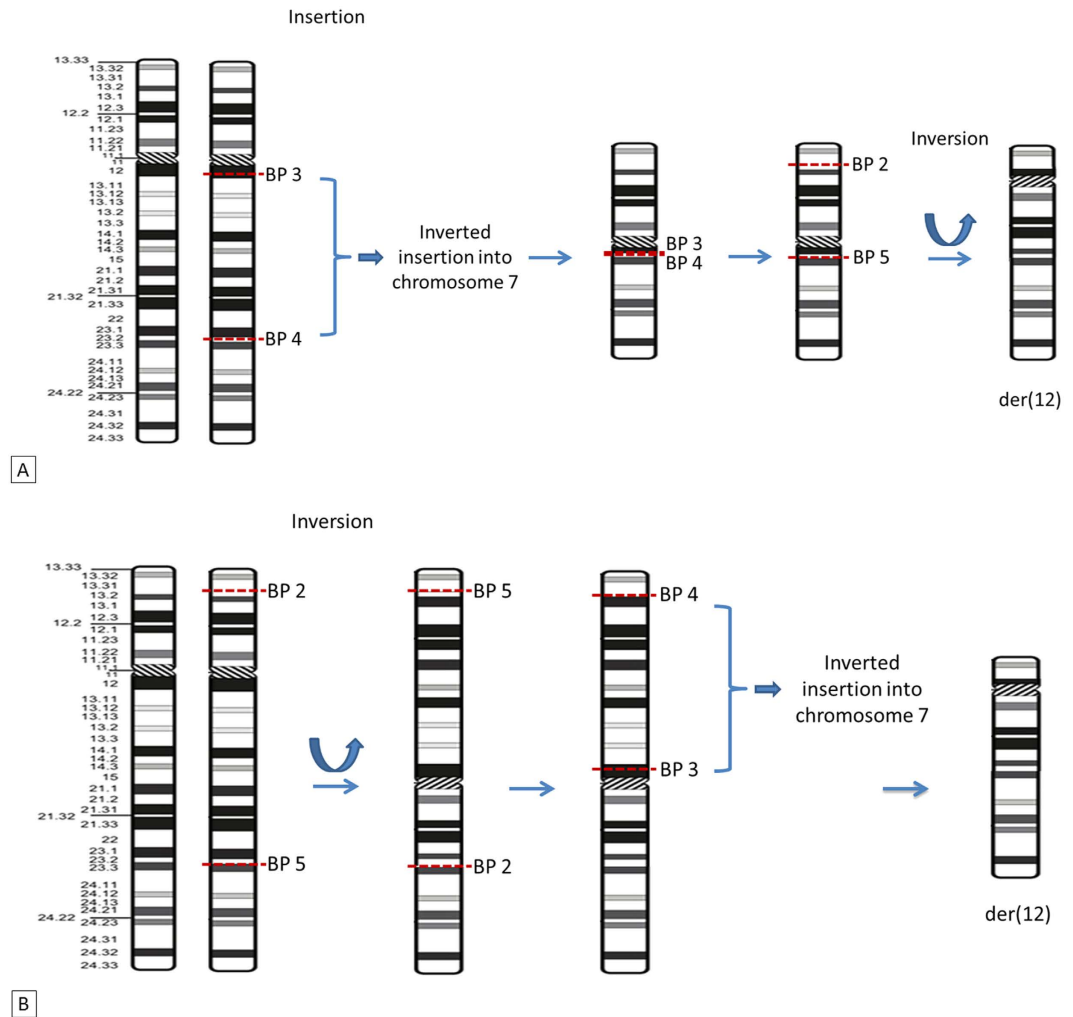
**Patient-specific iPSC karyotype and array-CGH.** The karyotypes of iPSC cl-12 and cl-32 were realized at passages 11 and 12 respectively, to assess the stability of the rearrangement involving chromosomes 7 and 12 in the genome of the patient. The same CCR was identified, indicating that the primary cells of the patient had not undergone additional chromosomal alterations during the reprogramming protocol (Supplementary Fig. 1).

We evaluated the genomic stability of iPSCs further, by performing 1 M array-CGH analyses in parallel on cl-12 (p11) and cl-32 (p12), and on lymphocytes from the patient. These analyses provided no evidence of additional pathogenic genomic losses or gains.

## Discussion

The patient described here had non-obstructive azoospermia and, therefore displayed an abnormal progression of the succession of spermatogenetic stages. First, conventional cytogenetics studies identified a CCR, which was characterized by fluorescence *in situ* hybridization and array-CGH. The complex rearrangement involved





**Figure 6.** Two hypothetical chromosomal mechanisms accounting for the complex chromosomal rearrangement in the patient. (A) With the inversion event occurring first. (B) With the insertion event occurring first. BP: breakpoint.

chromosomes 7 and 12, with five breakpoints (7p13.3, 12p13.31, 12q12, 12q23 and 12q23). The short arm of der(7) contained inserted inverted material from the long arm of der(12), and a pericentric inversion had occurred in the resulting der(12). Second, we successfully generated patient-specific iPSCs from erythroblasts in a context of chromosomal abnormalities. *In vitro* tests on the iPSCs demonstrated the expression of endogenous pluripotency markers and teratoma assays confirmed the pluripotency of the stem cells *in vivo*.

Instead of a common breakpoint for the two events, the 12q23.2 region contained two breakpoints. Using a probe binding to the 12q23.2 region, we identified a fifth breakpoint, explaining the mechanism underlying the CCR (Fig. 1E and F). If the insertion and inversion events had a common breakpoint in the 12q23.2 region, located between 101,652,072–101,831,070 (RP11-321F8), then two signals would have been obtained, either on the long arm of der(12) or on the short arm of der(7). A representation of the rearranged chromosomes and a proposed sequence of events that may have led to this abnormal karyotype are shown in Fig. 6.

Chromosomal abnormalities leading to oligozoospermia or azoospermia are among the most common causes of male infertility. Abnormalities associated with chromosome 7 and 12 have been reported before in patients with non-obstructive azoospermia, including a paracentric inversion of chromosome 7 and a pericentric inversion of chromosome 12<sup>34,35</sup>, and translocations involving chromosome 12<sup>36</sup>. However, none of these previously reported cases had breakpoints [inv(12)(p12q12); inv(7)(q22-31)] in common with our patient [inv(12)(p13.31q23.2), ins(7;12)(p21.3;q23.2q12)]. CCRs, including translocations, inversions, insertions, and other structural chromosomal abnormalities, can have important consequences for the pairing of meiotic chromosomes during pachytene. In mammals, this process is essential for progression through meiosis, and is achieved through a recombination mechanism initiated by DNA double-strand breaks (DSBs)<sup>37</sup>. These breaks are essential for normal male gametogenesis<sup>37</sup>.

Normal chromosomes form bivalents during this stage. The presence of a rearrangement may lead to multivalent formation and the mechanical disruption of chromosome pairing. In this configuration, some or all of

the chromosomes remain unpaired, and, therefore, unsynapsed<sup>37</sup>. The repair of meiotic DSBs requires homologous synapsis. Asynapsis results in the persistence of DSBs, silencing genes in the unsynapsed chromosomal segment, potentially resulting in spermatogenic failure if the genes silenced are involved in this process<sup>37–39</sup>. Indeed, infertility may result from chromosomal defects leading to pachytene asynapsis or the disruption of genes involved in spermatogenesis.

Not all structural rearrangements of chromosomes impair sperm production or function and are associated with infertility or subfertility phenotypes<sup>40</sup>. A few exceptional cases of the male inheritance of CCRs have been documented<sup>40,41</sup>. Thus, in exceptional cases, the CCRs in male carriers may be able to form appropriate pachytene configurations during meiosis. The mechanism underlying asynapsis-related male-specific meiotic arrest is not fully understood. CCR rearrangements are frequently associated with reproductive failure, with a high risk of chromosomal abnormalities in offspring, recurrent spontaneous abortions and infertility<sup>42,43</sup>. Thus, chromosomal rearrangements do not necessarily lead to meiotic arrest due to synapsis problems. Disruptions of essential meiotic genes may, therefore, also result in infertility.

The locations of the breakpoints in the rearrangement are also thought to affect the fertility of the carrier. The sequences of genes involved in male gametogenesis and residing in these chromosomal breakpoint regions, and those of their regulatory elements, may be disrupted or deregulated. The generation of fusion transcripts by chromosome rearrangement may also contribute to azoospermia. Large numbers of genes have been associated with infertility<sup>8,20</sup>. Many of these genes were characterized in mouse models<sup>8</sup>. Meiotic genes are highly conserved in the evolution of species and their disruption has provided strong evidence of their negative impact on fertility. In our case, breakpoint mapping for the balanced CCR identified a candidate gene, *SYCP3*. This gene encodes a structural component of the axial and lateral parts of the synaptonemal complex. The synaptonemal complex mediates the pairing and synapsis of homologous chromosomes at the pachytene stage, and several reports have shown mutations of this gene to be associated with azoospermia in man and susceptibility to pregnancy loss<sup>44–46</sup>. Thus, the interruption of *SYCP3* may have altered expression of the protein, leading to synaptonemal complex dysfunction. As a result, meiosis was initiated but not completed as suggested by the testicular biopsy. Indeed, histological analysis showed that germline cells in seminiferous tubules were mostly at the spermatocyte stage, with only a few reaching the spermatid stage. As a consequence, no sperm was found in the ejaculate.

Cytogenetic and molecular analysis, Y-chromosome microdeletion screening, FISH techniques and other genetic methods, such as array-CGH and next-generation sequencing, have provided considerable insight into the genetics of infertility<sup>12,47,48</sup>. However, our understanding of the genetic causes of male infertility remains limited. With the emergence of iPSC technology, cells from patients can be easily reprogrammed, and then directed to differentiate into the desired lineage. These iPSCs contain the genetic heritage of the patient and, thus, constitute an excellent model for exploring specific diseases in humans<sup>49</sup>.

In this study, we used non-integrative Sendai viruses producing defined factors to reprogram erythroblasts from our azoospermic patient to obtain pluripotent cells. The iPSC colonies obtained had a typical embryonic stem cell (ESC)-like morphology and expressed pluripotency markers. These iPSCs formed teratomas with all three germ layers, demonstrating their pluripotency *in vivo*. These results provide a reliable demonstration of the generation of fully pluripotent iPSCs from cells carrying a complex chromosomal rearrangement.

In recent years, some laboratories have managed to impose a germline fate on ESCs and iPSCs, mostly in mice<sup>28</sup>. Since 2011, the differentiation of human iPSCs into haploid male germ cells has been achieved<sup>50–53</sup>. Several studies have also demonstrated extensive expression of the synaptonemal complex. Ramathal and his team recently demonstrated the capacity of human-derived AZF-deficient iPSCs to differentiate into primordial germ-like cells *in vitro*<sup>31</sup>. This finding highlights the potential and progress of *in vitro* gametogenesis research.

The patient-specific iPSCs derived in this report are the first *in vitro* genetic model to be described for studies of the mechanisms by which chromosomal aberrations affect spermatogenesis in humans.

The ability of these cells to differentiate into germ cells will be assessed based on published protocols<sup>31,53,54</sup>. For *in vitro* strategies, patient-iPSC lines stably carrying a *VASA-GFP reporter* construct may be useful for monitoring the generation of PG-like cells during embryonic body differentiation or monolayer differentiation approaches. The expression of specific germ cell genes such as *VASA*, *DAZL*, *BLIMP1*, *NANOS3*, *STRA8* and of genes associated with more advanced differentiation, such as *SCPI* (meiotic prophase), *ACR* (spermatid to spermatozoa), and *PRM1* (post-meiotic), will be evaluated by RT-qPCR. The results of these studies will help to determine the stage at which the blockade occurs within the patient's cells<sup>28,31,53,54</sup>. In the case of our patient, if *SYCP3* is the only gene responsible for infertility, then the xenotransplantation of patient-specific iPSCs into mouse testis should induce PGC-like development<sup>31</sup>. An appropriate *in vitro* protocol, reproducing the development of human germ cells *in vivo*, has also been shown to lead to the differentiation into PGC-like, and the transduction of iPSCs with a lentiviral vector carrying the *SYCP3* gene might be able to repair the defect.

The successful derivation of infertile patient-specific iPSCs reported here highlights the real potential of this approach for the *in vitro* modeling of gametogenesis in the context of a complex chromosomal rearrangement. Further analyses should demonstrate the utility of these cells for deciphering the molecular mechanisms underlying genetically driven male infertility.

## Materials and Methods

**Patient.** The patient was 38 years old and consulted for infertility after he and his partner had been trying to conceive for two years. The patient was the first child of unrelated parents, and he had four brothers and five sisters whose fertility status could not be determined because of their personal situations (they were younger and not actively trying to procreate). Clinical examination excluded obstruction of the genital tract but revealed marked bilateral atrophy of the gonads, with a testicular volume of only 7 cm<sup>3</sup> (normal range: 20–25 cm<sup>3</sup>). Semen was collected after a requested five-day period of abstinence. Two spermograms performed eight months apart revealed azoospermia. Testicular doppler ultrasound and ultrasound scans of the deep genital tract showed

hypervascularization of the prostate, with calcification of the central zone, slight differential thickening of the pelvic walls, but without obstruction, and non-retentive vesicles. Laboratory tests revealed hormonal dysregulation, with a low serum concentration of inhibin B (36 pg/mL; normal range: 80–270 pg/mL) and a high serum concentration of FSH (15.5 IU/L; normal range: 1.4–10 IU/L). The serum concentration of LH was normal (7.9 IU/L; normal range: 1.4–8 IU/L). Bilateral testicular biopsy was performed and histological analysis showed maturation arrest in all the seminiferous tubules mostly at the spermatocyte stage and more rarely at the spermatid stage. Thus, meiosis was initiated but not completed. In addition, testicular Leydig's cell hyperplasia was observed. Genetic analyses, including karyotype, fluorescence *in situ* hybridization, Y chromosome microdeletion and array-CGH, were required to determine the cause of the infertility. Informed consent for genetic analyses was obtained from the patient, in accordance with local ethics guidelines and regulations (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris). The patient provided written, informed consent in accordance with the guidelines and regulations of French law (Code Civil, Article 16–10). All methods were performed in accordance with French law (Décret n°2008-31 du 4 avril 2008). The experimental protocol was approved by the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris institutional committee.

**Conventional cytogenetic analysis.** Standard chromosomal analyses were performed on cultured peripheral lymphocytes from the patient and his parents and on derived iPSC clones, by standard procedures [G-banding with trypsin using Giemsa (GTG); R-banding after heat denaturation and Giemsa (RHG)].

**Fluorescence *in situ* hybridization (FISH).** FISH analyses were performed on metaphase spreads of lymphocytes from the patient. The following probes were used, in accordance with the manufacturer's recommendations: whole-chromosome painting (WCP) probes specific for chromosomes 7 and 12 (Kreatech), centromeric probes specific for chromosomes 7 and 12 (Vysis) and subtelomeric probes specific for chromosomes 7 and 12 (Cambio). Bacterial artificial chromosome (BAC) clones specific for the chromosome 12 short arm (RP4-751H1, RP11-444J21, RP11-35C21 and RP11-346G18 located at 12p13.31; RP11-281L3 located at 12p13.2; RP11-180M15 located at 12p13.1; and RP11-459D22 located at 12p12.3), long arm (RP11-282A3, RP11-35C21, RP11-351C21 and RP11-95K16 located at 12q12; RP11-474P2 and RP3-432E18 located at 12q13.11; RP11-1136G11 located at 12q13.13; RP11-290I21 located at 12q14.2; RP11-444B24 located at 12q15; RP11-228G3, RP11-54P10, RP11-11 M4 and RP11-147C4 located at 12q21.33; RP11-536G4 located at 12q22; RP11-155C14 and RP11-434E3 located at 12q23.1; RP11-321F8, RP11-210L7 and RP11-553C19 located at 12q23.2; RP11-205I24 and RP11-43D4 located at 12q23.3; RP11-457O10 located at 12q24.11; and RP1-315L5 located at 12q24.12); and the chromosome 7 short arm (RP11-505D17, RP5-1008N9 and RP11-139O17 located at 7p21.3; RP11-79G16 and RP11-547G15 located at 7p21.2) were used (Bluegenome).

**DNA extraction.** Genomic DNA was isolated from the patient's peripheral blood and from derived iPSCs, with the Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Biotech). The concentration and quality of the extracted DNA were evaluated with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The extracted DNA was used for Y-chromosome AZF microdeletion and array-CGH analysis.

**Y-chromosome AZF region screening.** Y-chromosome microdeletions in the AZFa, AZFb, and AZFc regions were analyzed through routine molecular diagnosis of Y chromosome abnormalities in accordance with the EAA/EMQN Guidelines. We used a sequence-tagged site (STS)–PCR approach to analyze microdeletions of the Y chromosome. We selected 28 STS, corresponding to the three different AZF loci, for the analysis. The STS tested were sY84 for AZFa, sY95, sY97, sY169, sY102, sY105, sY109 for the interval between AZFa and AZFb, sY113, sY115, sY117, sY124, sY130, sY134, sY136, sY143, sY142 for AZFb, sY152, sY232, sY156, sY240, sY148, sY249, sY204, sY208, sY254, sY269, sY158 for AZFc, and sY160 for the heterochromatic distal Yq region.

**Oligonucleotide-based array-comparative genomic hybridization (array-CGH).** The genomic imbalances in lymphocytes from the patient and in derived iPSC clones 12 and 32 at passages p11 and p12, respectively, were investigated by array-CGH with 1M oligonucleotide arrays (Agilent Technologies). Array hybridization was performed according to the manufacturer's instructions. In brief, 0.5 µg of genomic DNA was fluorescently labeled with the Agilent Genomic DNA labeling kit PLUS (Agilent Technologies). Male human genomic DNA was used as a reference. Cy5-dUTP patient DNA and sex-matched reference DNA labeled with Cy3-dUTP were denatured and preannealed with Cot-1 DNA and Agilent blocking reagent before hybridization for 40 h, with rotation at 20 rpm, at 65 °C in a rotating hybridization oven (Agilent Technologies). The slides were then washed and scanned on an Agilent Microarray Scanner. The captured images were processed with Feature Extraction 10.7.3.1 software and data analysis was performed with Cytogenomics 3.0.1.1 software. Copy number variations (CNVs) were considered significant if they were defined by three or more contiguous oligonucleotides spanning at least 2 kb and were not identified in the Database of Genomic Variants. The Genome Browser used to analyze gene content was hg19, Build37 (<http://genome.ucsc.edu/>).

**PCR analysis of gene expression.** Total RNA was isolated from iPSCs with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey Nagel), in accordance with the manufacturer's protocol. We reverse-transcribed 1 µg of each RNA sample to generate cDNA, with an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). RT-PCR was performed with the GoTaq DNA Polymerase kit (Promega). PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, and analyzed with the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad). RT-PCR for the 5' coding region was performed with primers specific for *OCT4* (sense primer 5'-AGCGAACCAGTATCGAGAAC-3' and reverse primer 5'-TTACAGAACCACACTCGGAC-3'), *SOX2* (sense primer 5'-AGCTACAGC ATGATGCAGGA-3' and reverse primer 5'-GGTCATGGAGTTGTACTGCA-3'), *NANOG* (sense primer 5'-TGAA CCTCAGCTACAAACAG -3' and reverse primer 5'-TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG-3'), *TBP* (sense primer

5'-CTCACAGGTCAAAGGTTTAC-3' and reverse primer 5'-GCTGAGGTTGCAGGAATTGA-3'), *REX1* (sense primer 5'-CAGTCCAGCAGGTGTTTGC-3' and reverse primer 5'-GCATTCTATGTAACAGTCTGAGA-3').

**Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) purification and erythroblast expansion.** PBMCs were isolated from whole blood by Ficoll density gradient separation, with SepMate kit tubes, according to the manufacturer's instructions (SepMate™, StemCell Technologies). We used 150,000 PBMCs in total for erythroblast expansion in a serum-free erythroid expansion medium from Stemcell Technologies. After eight to nine days, the size of the erythroblast population was estimated by flow cytometry with anti-CD71 and erythroid-specific anti-glyphorin-A antibodies, both from e-Biosciences (eBioscience).

**Induced pluripotent stem cell (iPSC) generation by Sendai virus-mediated gene transfer.** Once the erythroblast population had been expanded from the patient's PBMCs, we used a Sendai virus (Life Technologies) for cell reprogramming.

In brief, we incubated 150,000 erythroblasts in StemSpan containing erythroid cytokines for 24 h. Sendai viruses encoding OCT3/4, SOX2, KLF4, and C-MYC pluripotency factors were added, in accordance with the manufacturer's instructions, in the presence of StemSpan medium containing erythroid expansion factors. Two days later, the cells were used to seed cultures on MEF feeder cells in the presence of one volume of StemSpan medium with erythroid cytokines and 2 volumes of iPS medium supplemented with bFGF, or to seed one volume of StemSpan medium with erythroid cytokines and 2 volumes of ReproTeSR in Matrigel-coated plates. The medium was progressively replaced, ending with 100% iPS medium supplemented with bFGF, or 100% ReproTeSR medium for cells on Matrigel. The generation of iPSC colonies was monitored daily, by checking for morphological changes. Colonies began to appear two weeks after transduction and were picked during the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> weeks.

**Immunostaining and immunofluorescence microscopy.** For immunofluorescence assays, cells were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, permeabilized by incubation in 0.2% Triton X-100 for 30 minutes and blocked by incubation with 3% BSA and 5% donkey serum in PBS (Chemicon). The cells were then incubated overnight with antibodies directed against OCT3/4 (1/100) (Abcam ab19857), SSEA-4-AF555 (1:50) (BD 560218) and Tra-1-60-AF488 (1:100) (Miltenyi Biotec). The cells were washed and Alexa Fluor 555-conjugated (1:500) donkey anti-rabbit IgG (Life Technologies) was added for the detection of Oct3/4.

**Teratoma formation.** Confluent undifferentiated iPSCs were treated with 1 mg/ml collagenase IV (Roche), resuspended in a mixture (2:1:1) of DMEM (PAA), Matrigel (Becton Dickinson) and collagen (Life Technologies) and injected intramuscularly into seven- to 10-week-old immunodeficient mice. Teratomas formed within eight to 12 weeks. They were excised and fixed. Histological analysis was performed on sections stained with hematoxylin-eosin. All animals were used according to protocols approved by the local animal ethics advisory committee, registered with the French research ministry and in accordance with French national regulation (national transposition of European directive 2010/63/CE). All animal experiments were approved by the Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

## References

- Hull, M. G. *et al.* Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *British medical journal (Clinical research ed.)* **291**, 1693–1697 (1985).
- Sun, F. *et al.* Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility* **87** (2007).
- Cocuzza, M., Alvarenga, C. & Pagani, R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* **68** Suppl 1, 15–26 (2013).
- Nakamura, Y. *et al.* Chromosomal variants among 1790 infertile men. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association* **8**, 49–52 (2001).
- Dong, Y. *et al.* Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. *Genetics and molecular research: GMR* **14**, 16041–16049, doi: 10.4238/2015.December.7.17 (2015).
- Marquet, V. *et al.* Double deletion of a chromosome 21 inserted in a chromosome 22 in an azoospermic patient. *Clinical case reports* **3**, 757–761, doi: 10.1002/ccr.3.13 (2015).
- Egozcue, S. *et al.* Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* **6**, 93–105 (2000).
- Matzuk, M. M. & Lamb, D. J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature medicine* **14**, 1197–1213, doi: 10.1038/nm.f.1895 (2008).
- Manvelyan, M. *et al.* Forty-eight new cases with infertility due to balanced chromosomal rearrangements: detailed molecular cytogenetic analysis of the 90 involved breakpoints. *Int J Mol Med* **19**, 855–864 (2007).
- Wang, L. *et al.* Abnormal meiotic recombination with complex chromosomal rearrangement in an azoospermic man. *Reprod Biomed Online* **30**, 651–658, doi: 10.1016/j.rbmo.2015.02.015 (2015).
- Liu, X. G., Hu, H. Y., Guo, Y. H. & Sun, Y. P. Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genetics and molecular research: GMR* **15**, doi: 10.4238/gmr.15028426 (2016).
- Guediche, N. *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of small supernumerary marker chromosomes in human infertility. *Reprod Biomed Online* **24**, 72–82, doi: 10.1016/j.rbmo.2011.08.014 (2012).
- Armanet, N., Tosca, L., Brisset, S., Liehr, T. & Tachdjian, G. Small Supernumerary Marker Chromosomes in Human Infertility. *Cytogenetic and genome research* **146**, 100–108, doi: 10.1159/000438718 (2015).
- Brisset, S. *et al.* Cytogenetic, molecular and testicular tissue studies in an infertile 45, X male carrying an unbalanced (Y;22) translocation: case report. *Hum Reprod* **20**, 2168–2172, doi: 10.1093/humrep/dei034 (2005).
- Martin, R. H. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* **14**, 379–390, doi: 10.1093/humupd/dmn017 (2008).
- Song, S. H., Chiba, K., Ramasamy, R. & Lamb, D. J. Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian J Androl* **18**, 350–355, doi: 10.4103/1008-682x.178857 (2016).
- Mahadevaiah, S. K., Setterfield, L. A. & Mittwoch, U. Pachytene pairing and sperm counts in mice with single Robertsonian translocations and monobrachial compounds. *Cytogenetics and cell genetics* **53**, 26–31 (1990).
- Miklos, G. L. Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenetics and cell genetics* **13**, 558–577 (1974).
- Cooke, H. J. & Saunders, P. T. Mouse models of male infertility. *Nature reviews. Genetics* **3**, 790–801, doi: 10.1038/nrg911 (2002).

20. Massart, A., Lissens, W., Tournaye, H. & Stouffs, K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl* **14**, 40–48, doi: 10.1038/aja.2011.67 (2012).
21. Wernig, M. *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318–324 (2007).
22. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).
23. Maherali, N. *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* **1**, 55–70 (2007).
24. Dimos, J. T. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science New York, N.Y.* **321**, 1218–1221 (2008).
25. Park, I. H. *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**, 877–886 (2008).
26. Siller, R., Greenhough, S., Park, I. H. & Sullivan, G. J. Modelling human disease with pluripotent stem cells. *Current gene therapy* **13**, 99–110 (2013).
27. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
28. Mouka, A., Tachdjian, G., Dupont, J., Drevillon, L. & Tosca, L. *In Vitro* Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility. *Stem Cells Dev* **25**, 509–521, doi: 10.1089/scd.2015.0230 (2016).
29. Abed, S. *et al.* Transplantation of Macaca cynomolgus iPSC-derived hematopoietic cells in NSG immunodeficient mice. *Haematologica* **100**, e428–431, doi: 10.3324/haematol.2015.127373 (2015).
30. Sternecker, J. L., Reinhardt, P. & Scholer, H. R. Investigating human disease using stem cell models. *Nature reviews. Genetics* **15**, 625–639, doi: 10.1038/nrg3764 (2014).
31. Ramathal, C. *et al.* Fate of iPSCs Derived from Azoospermic and Fertile Men following Xenotransplantation to Murine Seminiferous Tubules. *Cell Reports* **7**, 1284–1297 (2014).
32. Ma, Y. *et al.* Aberrant gene expression profiles in pluripotent stem cells induced from fibroblasts of a Klinefelter syndrome patient. *J Biol Chem* **287**, 38970–38979, doi: 10.1074/jbc.M112.380204 (2012).
33. Shimizu, T. *et al.* Derivation of integration-free iPSCs from a Klinefelter syndrome patient. *Reproductive medicine and biology* **15**, 35–43, doi: 10.1007/s12522-015-0213-9 (2016).
34. Ghorbel, M. *et al.* Pericentric inversion of chromosome 12 [Inv (12) (p12q12)] associated with idiopathic azoospermia in one infertile Tunisian man. *Biochem Biophys Res Commun* **432**, 472–474, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.110 (2013).
35. Ichioka, K., Yoshimura, K., Honda, T., Takahashi, A. & Terai, A. Paracentric inversion of chromosome 7(q22-31) associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* **83**, 455–456, doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.06.070 (2005).
36. Li, L. *et al.* Mapping breakpoints of a familial chromosome insertion (18, 7) (q22.1; q36.2q21.11) to DPP6 and CACNA2D1 genes in an azoospermic male. *Gene* **547**, 43–49, doi: 10.1016/j.gene.2014.06.007 (2014).
37. Homolka, D., Jansa, P. & Forejt, J. Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma* **121**, 91–104, doi: 10.1007/s00412-011-0346-5 (2012).
38. Schoenmakers, S. *et al.* Increased frequency of asynapsis and associated meiotic silencing of heterologous chromatin in the presence of irradiation-induced extra DNA double strand breaks. *Dev Biol* **317**, 270–281, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.027 (2008).
39. Burgoyne, P. S. & Baker, T. G. Meiotic pairing and gametogenic failure. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **38**, 349–362 (1984).
40. Cai, T. *et al.* A de novo complex chromosomal rearrangement with a translocation 7;9 and 8q insertion in a male carrier with no infertility. *Human Reproduction* **16**, 59–62 (2001).
41. Grasshoff, U. *et al.* A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q13->q24.1 and partial monosomy 4q27->q28 [corrected]. *Cytogenetic and genome research* **103**, 17–23, doi: 10.1007/s00412-011-0346-5 (2012).
42. Pellestor, F. *et al.* Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertil Steril* **95**, 2433 e2417–2422, doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.159 (2011).
43. Madan, K., Nieuwint, A. W. & van Bever, Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Human genetics* **99**, 806–815 (1997).
44. 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* **45**, 92–100, doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01317.x (2013).
45. Miyamoto, T. *et al.* Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet (London, England)* **362**, 1714–1719, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14845-3 (2003).
46. Stouffs, K., Lissens, W., Tournaye, H., Van Steirteghem, A. & Liebaers, I. SYCP3 mutations are uncommon in patients with azoospermia. *Fertil Steril* **84**, 1019–1020, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.04.033 (2005).
47. Hofherr, S. E., Wiktor, A. E., Kipp, B. R., Dawson, D. B. & Van Dyke, D. L. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience. *J Assist Reprod Genet* **28**, 1091–1098, doi: 10.1007/s10815-011-9633-6 (2011).
48. Dada, R., Gupta, N. P. & Kucheria, K. Cytogenetic and molecular analysis of male infertility: Y chromosome deletion during nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Cell biochemistry and biophysics* **44**, 171–177, doi: 10.1385/cbb.44:1:171 (2006).
49. Trounson, A., Shepard, K. A. & DeWitt, N. D. Human disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 509–516, doi: 10.1016/j.gde.2012.07.004 (2012).
50. Panula, S. *et al.* Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics* **20**, 752–762 (2011).
51. Medrano, J. V., Ramathala, C., Nguyena, H. N., Simon, C. & Reijo Pera, R. A. Divergent RNA-Binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived *In Vitro*. *Stem Cells* **30**, 441–451 (2012).
52. Easley, C. A. *et al.* Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep* **2**, 440–446, doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.015 (2012).
53. Eguizabal, C. *et al.* Complete Meiosis from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **29**, 1186–1195 (2011).
54. Zhou, G. B., Meng, Q. G. & Li, N. *In vitro* derivation of germ cells from embryonic stem cells in mammals. *Molecular reproduction and development* **77**, 586–594, doi: 10.1002/mrd.21187 (2010).

## Acknowledgements

We thank all the co-authors for their contributions to this work and all members of the technical team of the cytogenetic service of Antoine Bécélère Hospital and the anatomical pathology service of Kremlin Bicêtre Hospital.

## Author Contributions

L.T., G.T. and L.M.-C. conceived and designed experiments. Aurélie M., L.M.-C., J.R. performed experiments. F.Y. and L.M.-C. provided iPSC reprogramming tools. S.B., Anne M. and V.I. received the patient at consultation and/or collected blood samples from the patient. Aurélie M., L.M.-C., G.T., L.D., L.T. analyzed the data. Aurélie M. L.T., G.T. and L.M.-C. wrote the paper. Aurélie M., V.I., G.T., S.B., F.Y., Anne M., L.D., J.R., P.L., L.M.-C. and L.T. approved the final version of the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Mouka, 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.* 7, 39760; doi: 10.1038/srep39760 (2017).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

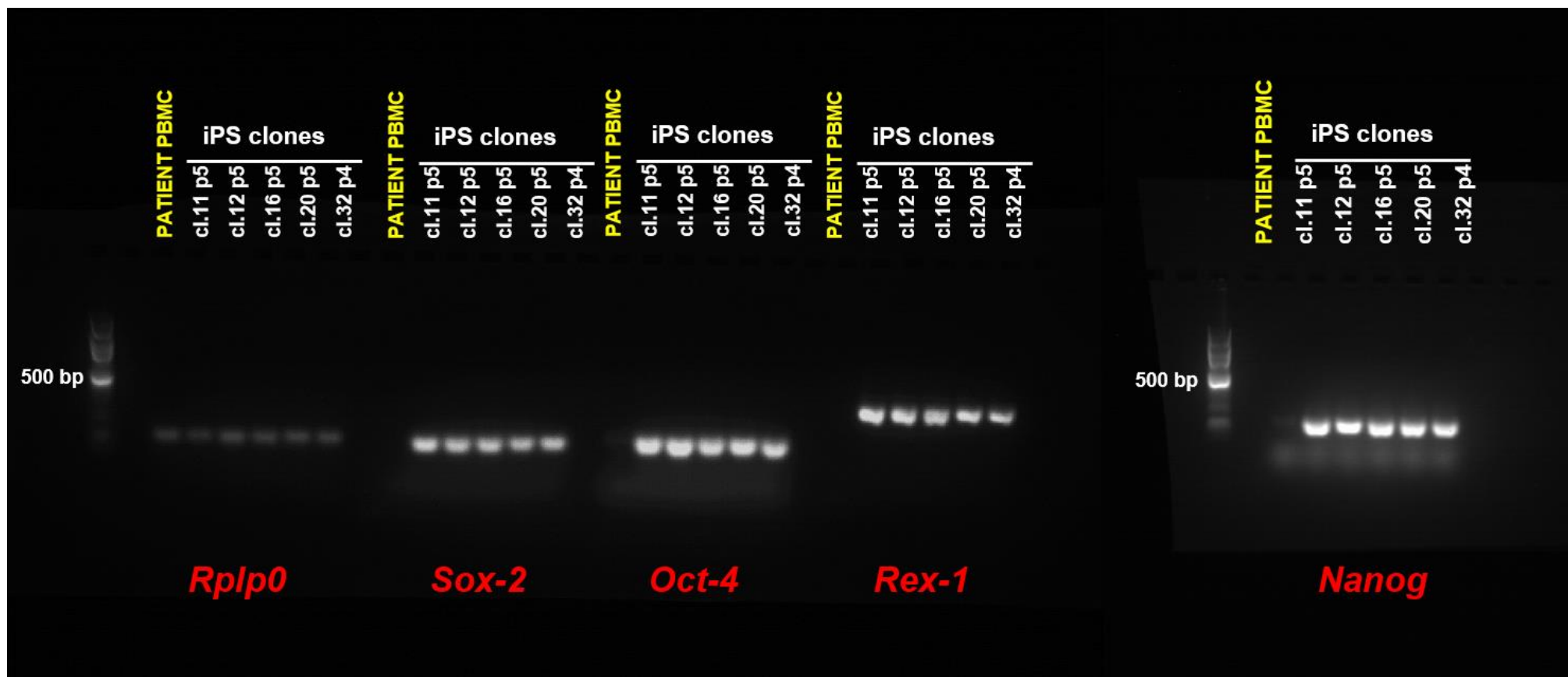
© The Author(s) 2017





Supplementary Figure 1





Supplementary Figure 2

Bluegnome Probe ID	Cytoband	Start (hg19)	Stop (hg19)	Observed localization
<b>Insertion event breakpoint on der(7) short arm: BP 1</b>				
RP11-505D17	7p21.3	7,981,234	8,159,394	In place on der(7) distal to the inserted fragment
RP5-1008N9	7p21.3	10,538,372	10,710,537	
RP11-139O17	7p21.3	12,624,593	12,789,972	In place on der(7) proximal to the inserted fragment
RP11-79G16	7p21.2	13,819,281	13,969,290	
RP11-547G15	7p21.2	14,896,877	15,089,802	
<b>Inversion event breakpoint on der(12) short arm: BP 2</b>				
RP4-751H1	12p13.31	6,023,233	6,158,569	In place on der(12)
RP11-444J21	12p13.31	7,716,948	7,889,198	
RP11-35C21	12p13.31	8,893,328	9,046,569	
RP11-346G18	12p13.31	9,560,087	9,739,128	Located on der(12) long arm
RP11-281L3	12p13.2	10,077,711	10,252,598	
RP11-180M15	12p13.1	12,723,966	12,880,857	
RP11-459D22	12p12.3	18,464,044	18,666,277	
<b>Insertion event breakpoint on der(12) long arm: BP 3</b>				
RP11-282A3	12q12	40,163,328	40,355,100	Located on der(12) long arm
RP11-35C21	12q12	41,375,116	41,546,882	
RP11-351C21	12q12	42,630,410	42,786,155	Located on der(7) short arm
RP11-95K16	12q12	44,243,419	44,412,355	
RP11-474P2	12q13.11	46,591,227	46,813,901	
RP3-432E18	12q13.11	47,871,644	48,012,712	
RP11-1136G11	12q13.13	53,460,231	53,616,994	
RP11-290I21	12q14.2	64,567,977	64,719,641	
RP11-444B24	12q15	68,454,646	68,645,525	
RP11-228G3	12q21.31	84,782,677	84,869,464	
RP11-54P10	12q21.33	89,008,495	89,169,334	
RP11-11M4	12q21.33	89,568,301	89,744,451	
RP11-147C4	12q21.33	92,488,040	92,638,222	
RP11-536G4	12q22	96,082,538	96,288,903	
RP11-155C14	12q23.1	99,999,685	100,153,237	
<b>Insertion event breakpoint on der(12) long arm: BP 4 and BP 5</b>				
RP11-434E3	12q23.1	100,567,515	100,763,514	Located on de(7) short arm
RP11-321F8	12q23.2	101,652,072	101,831,070	Located on der(7) short arm and on der(12) short arm
RP11-210L7	12q23.2	102,788,553	102,958,357	In place on der(12)
RP11-553C19	12q23.2	103,585,618	103,758,359	
RP11-205I24	12q23.3	103,966,166	104,123,564	
RP11-43D4	12q23.3	104,775,247	104,954,152	
RP11-457O10	12q24.11	108,982,119	109,165,140	
RP1-315L5	12q24.12	111,856,680	112,010,700	

Supplementary Table 1

## II. Modélisation *in vitro* de l'infertilité masculine : différenciation germinale à partir de cellules iPS humaines naïves issues de deux patients infertiles

La production continue de spermatozoïdes est un processus biologique finement régulé (cf introduction, chapitre 1). L'azoospermie est la forme la plus extrême de l'infertilité masculine et est définie comme l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Les facteurs génétiques, incluant les anomalies chromosomiques, sont responsables d'environ un tiers des cas d'azoospermie (Hamada *et al.*, 2013). Les anomalies du développement sexuel représentent un autre aspect de l'infertilité masculine. En effet, la détermination du sexe est un processus complexe, contrôlé génétiquement, responsable de l'établissement du sexe gonadique, testicule ou ovaire (cf introduction, chapitre 1). Le trouble du développement sexuel (DSD) se caractérise par une discordance complète ou partielle entre le sexe génétique, gonadique et phénotypique (Sutton *et al.*, 2011). De nombreux gènes sont impliqués à la fois dans la différenciation sexuelle normale et dans la genèse de DSD. Malgré nos connaissances dans le domaine de la génétique de l'infertilité, les mécanismes sous-jacents aux défauts de la spermatogenèse ou du développement sexuel restent incertains en raison du manque de modèles expérimentaux adéquats.

L'objectif de l'étude (cf article 2, en préparation) a consisté en la poursuite de la caractérisation du RCC du patient 1 (séquençage mate-pair), la caractérisation génétique du patient 2 (caryotype, FISH, CGH-array et séquençage génome entier), la génération de cellules iPS du patient 2 et la différenciation en cellules germinales primordiales (CGP) à partir des lignées hiPS de deux hommes azoospermes porteurs soit d'un RCC (patient 1), soit d'un caryotype 46,XX *SRY*-négatif dans un contexte de DSD (patient 2).

La première étape vers une différenciation germinale a été l'obtention de l'état naïf de la pluripotence *in vitro* à partir de cellules iPS à l'état amorcé de la pluripotence. Cet état naïf offre une capacité de différenciation plus efficace que l'état amorcé. Ensuite, les cellules hiPS naïfs ont été différenciées avec succès en cellules germinales primordiales par la formation de corps embryonnaires et l'ajout des facteurs clés de la différenciation germinale BMP2/4. Les CGP obtenues expriment les marqueurs de la pluripotence (*OCT3/4*, *NANOG*) et les marqueurs de CGP précoces (pre-migratoires) (*SOX17*, *CD-38*, *NANOS3*, *c-KIT*, *AP2γ* et *D2-40*). L'analyse par immunohistochimie, a démontré que les CGP expriment les protéines AP2γ et D2-40.

Reconstituer les premières étapes de la gamétogenèse *in vitro*, à partir de cellules iPS de patients infertiles, fournit un modèle de choix pour l'étude des premiers stades du développement embryonnaire et de la formation de cellules germinales. De tels modèles pourraient ainsi permettre l'identification des points de blocage à l'origine de l'infertilité mais aussi permettre l'étude de l'expression et des modifications épigénétiques précoces des gènes dans l'espoir de découvrir de nouvelles causes génétique à l'origine des DSD.



## **ARTICLE 2**

**Primordial germ cells differentiation from human induced pluripotent stem cells  
of infertile men carrying genetic abnormalities**

Aurélie Mouka, Brahim Arkoun, Loïc Drévilion, Rafika Jarray, Sophie Brisset, Anne Mayeur, Lusine Nazaryan-Petersen, Mana M. Mehrjouy, Niels Tommerup, Anne Boland-Auge, Jean-François Deleuze, Frank Yates, Gabriel Livera, Gérard Tachdjian, Leila Maouche-Chrétien et Lucie Tosca

(en préparation)



**Primordial germ cells differentiation from human induced pluripotent stem cells  
of infertile men carrying genetic abnormalities**

Aurélie Mouka<sup>1,2</sup>, Brahim Arkoun<sup>3</sup>, Loïc Drévilon<sup>1</sup>, Rafika Jarray<sup>7</sup>, Sophie Brisset<sup>1,2</sup>, Anne Mayeur<sup>1</sup>,  
Lusine Nazaryan-Petersen<sup>5</sup>, Mana M. Mehrjouy<sup>5</sup>, Niels Tommerup<sup>5</sup>, Anne Boland-Auge<sup>6</sup>, Jean-  
François Deleuze<sup>6</sup>, Frank Yates<sup>7</sup>, Gabriel Livera<sup>3</sup>, Gérard Tachdjian<sup>1,2</sup>, Leila Maouche-Chrétien<sup>4\*</sup>,  
Lucie Tosca<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> AP-HP, Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Antoine Bécclère, 92140, Clamart, France

<sup>2</sup> Université Paris-Sud, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Développement des Gonades, UMR 967 « Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations », Commissariat à l'Energie Atomique et aux Énergies Alternatives, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>4</sup> Commissariat à l'Energie Atomique et aux Énergies Alternatives, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), 92265 Fontenay-aux-Roses; UMR-E 007, Université Paris-Saclay, 91400 Orsay; INSERM, 75013 Paris, France

<sup>5</sup> Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research Department of Cellular and Molecular Medicine (ICMM) University of Copenhagen Blegdamsvej 3B, DK-2200 Copenhagen, Denmark

<sup>6</sup> Institut de Génomique, Centre National de Génotypage, 91000 Evry, France

<sup>7</sup> Sup'Biotech Villejuif 94800, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Énergies Alternatives, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), SEPIA, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

\*These authors contributed equally to this work.

**Corresponding author :**

Lucie Tosca, PhD

Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique

Hôpitaux Universitaires Paris-Sud - Hôpital Antoine Bécclère

157, rue de la Porte de Trivaux

92140 Clamart, France

e-mail: lucie.tosca@abc.aphp.fr

Tel: 33(0)1 45 37 49 23

Fax: 33(0)1 45 37 49 20

**ABSTRACT**

Chromosomal defects may have major consequences on male fertility and may be responsible of both testicular dysfunction and disorder of sex development. Despite the great insight into the genetics of infertility, involved mechanisms remain unclear due to the lack of adequate and convenient experimental models. Recently, the generation of patient-specific cellular models of diseases has been possible by means of the emerging technology of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). The hiPSCs represent a new system offering unique advantages for therapy and *in vitro* disease modeling helping understanding the molecular basis of developmental processes.

We report molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in an azoospermic patient and a case of *SRY*-negative 46,XX man with male phenotype, genital ambiguities and infertility. Patients' genetic abnormalities were characterized by standard karyotype, fluorescence *in situ* hybridization, oligonucleotide-based array-CGH, mate-pair sequencing and whole genome sequencing. Erythroblasts from both patients were reprogrammed with Sendai virus in order to generate hiPSCs. Patients-specific hiPSCs lines were first converted to a naive-like state of pluripotency then successfully differentiated toward primordial germ cells (PGCs) fate through embryoid body formation and BMP induction. Maintained expression of pluripotency stem cell markers (*OCT3/4*, *NANOG*) as well as expression of early-PGC markers genes (*SOX17*, *CD-38*, *NANOS3*, *c-KIT*, *AP2γ* and *D2-40*) confirmed likely progression of the early germline stage.

Our results indicate that PGC-like cells can be differentiated from genetically abnormal-iPSCs of infertile men with non-obstructive azoospermia and developmental sex disorder. The availability of infertile men-iPSC lines and their use for *in vitro* disease modeling will accelerate our understanding and treatment of male infertility.

**KEY WORDS:** human induced pluripotent stem cells, germ cells, differentiation, male infertility, genetic disorder



## INTRODUCTION

The World Health Organization defines infertility as the inability of a couple to conceive after two years of unprotected intercourse. It is generally agreed that about 10-15% of couples experience infertility problems, with a male component in almost half of the cases (Sharlip *et al.*, 2002, Ferlin *et al.*, 2007). Thus, infertility represents a real public health problem. Assisted Reproductive Technologies allows in some cases to overcome fertility issues and obstacles for conception. Azoospermia is the most extreme form of male infertility and is defined as the complete absence of spermatozoa in the ejaculate. Genetic factors, including chromosomal abnormalities, single gene disorders and phenotypes with multifactorial inheritance, are responsible for approximately 1/3 of cases of azoospermia (Hamada *et al.*, 2013). However, the underlying cause of male infertility remains unknown for 30 % of cases (Coutton *et al.*, 2012). Male sexual dysfunction represents another aspect of male infertility. Indeed, sex determination is a complex process, under genetic controls, in which the identity of the gonad emerges to become either a testis or an ovary. Disorder of sex development (DSD) is characterized by a complete or partial mismatch between genetic sex and phenotypic sex (Sutton *et al.*, 2011). Many genes are involved in both normal sexual differentiation and in the genesis of DSD. SRY gene translocation onto the pseudoautosomal region PAR1 of one X chromosome represent the major cause of testicular disorder in individuals with 46,XX DSD (Vorona *et al.*, 2007). Despite advances in understanding the mechanisms of mammalian gonad formation, the underlying genetic cause of most cases of 46,XX-SRY-negative DSD remains unknown.

In mammals, primordial germ cells (PGCs) are the precursors of germline lineage that give rise to gametes. Their development ensures fertility and transmission of genetic information to the offspring. The precursors of PGCs appear initially in the epiblast beside the extra-embryonic ectoderm. Then, PGC specification occurs at the base of the allantoids and from where PGCs start their migration to the genital ridges. In mice and humans, germ cell specification is regulated by genetic and epigenetic processes that depend on external signals produced by the cellular environment (Irie *et al.*, 2014, De Felici, 2013). In mice, signals from the proximal extra-embryonic ectoderm (BMP4 and BMP8b) and the visceral endoderm (BMP2) play an essential role in the induction of PGCs (De Felici, 2013). Thereafter, PGCs survival and localization would also be under the control of BMP4 produced by extra-embryonic mesoderm (Fujiwara *et al.*, 2001). PGCs migration to genital ridges is a complex process, regulated spatially and temporally by defined molecular inducers (Mouka *et al.*, 2016). Our knowledge of the early stages of germ cells formation is reduced in the human species.

In the field of stem cell research, the emerging technology of induced pluripotent stem cells (iPSCs) offers great opportunities for *in vitro* disease modeling. Indeed, these cells have similar properties as embryonic stem cells (ESCs) i.e. self-renewal, ability to differentiate into different types of specialized cells. Furthermore, iPSCs have the advantage to not require embryos destruction and cells may be derived from patient's own somatic cells. This makes possible to reproduce *in vitro* pathological processes and to open new avenues to understand the pathological states at a molecular level. The iPSCs are actually derived from skin, blood or other somatic cells and are reprogrammed by

means of transduction with specific pluripotency factors: Yamanaka factors OCT4/SOX2/KLF4/C-MYC (Takahashi *et al.*, 2007) or Thomson factors OCT4/SOX2/NANOG/LIN28 (Thomson *et al.*, 1998). Thus, the iPSCs and their strong differentiation potential could have major implications in both regenerative and therapeutic medicine. This is a real hope for infertility research area in particular for a deeper understanding of spermatogenic process.

Pluripotent stem cells exist in naive or primed states, initially represented respectively by mouse ESCs and the developmentally more advanced epiblast stem cells (EpiSCs) (Nichols, 2009). The hiPSCs are morphologically and epigenetically more similar to EpiSCs as their derivation was supported by activation of the same signalizations, ActivinA/TFG $\beta$  and FGF2. This stage of pluripotency is called primed pluripotent stem cell corresponding to a post-implantation epiblast state. Derivation of human naive pluripotent stem cells from already established primed human ES cells was successfully reported (Gafni *et al.*, 2013). This state is related to pre-implantation epiblast identity in the embryo and is mainly influence by LIF-Stat3 and WNT/ $\beta$ -catenin signaling, in contrast to primed-PGC (Weinberger *et al.*, 2016). Base-line level pluripotency of iPSCs was reported as being improved when converted into the so-called “naive” state (or ground state). Indeed, naive-like conversion of iPSCs endows them with a higher differentiation capacity compared to primed iPSCs (Irie *et al.*, 2015).

Reconstituting early stages of gametogenesis *in vitro* from human iPSCs would provide a strong model for the study of gametes formation and would also contribute to a better understanding of the mechanisms regulating spermatogenesis. During the last years, several studies tried to establish a germline destiny to pluripotent stem cells. Recent breakthroughs on male PGC derivation from human ESCs and iPSCs have been reported (Clark *et al.*, 2004, West *et al.*, 2008, Aflatoonian *et al.*, 2009, Bucay *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009, Eguizabal *et al.*, 2011, Panula *et al.*, 2011, Medrano *et al.*, 2012, Irie *et al.*, 2015). Generating patient specific-hiPSCs in a context of infertility has not been widely explored. Patient-specific iPSCs, with the same genetic background as the donor cells, provide unprecedented human models for studying genetic disorders. Especially since karyotype abnormalities were reported in 2%–14% of males presenting infertility (Shi & Martin, 2000). Using human iPSCs, only one recent study reported the generation of germ cell-like cells from azoospermic men carrying microdeletions in the AZF region (Ramathal *et al.*, 2014).

The present study aimed to develop *in vitro* genetic models of male infertility by differentiating PGC-like cells (PGCLCs) from iPSCs derived from two azoospermic men carrying either a complex chromosomal rearrangement or a SRY-negative 46,XX karyotype in a context of a disorder of sex development. First, primed-state iPSCs of the patients were generated, then converted into a naive-like state, for a more competent and efficient capacity of differentiation. The naive-hiPSCs were then successfully differentiated into primordial germ cells through embryoid bodies strategy and in the presence of bone morphogenic proteins (BMP2/4). Quantitative RT-PCR revealed that pbaining cells express pluripotency (OCT3/4, NANOG) and early PGC markers (SOX17, CD-38, NANOS3, c-KIT, AP2 $\gamma$  and D2-40). Using immunohistochemistry approach, we demonstrated that the resulting PGCLCs express AP2 $\gamma$  and D2-40 proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

The patient 1 was 38 years old and consulted for infertility after he and his partner had been trying to conceive for two years. The patient was the first child of unrelated parents, and he had four brothers and five sisters whose fertility status could not be determined because of their personal situations (they were younger and not actively trying to procreate). Clinical examination excluded obstruction of the genital tract but revealed marked bilateral atrophy of the gonads, with a testicular volume of only 7 cm<sup>3</sup> (normal range: 20–25 cm<sup>3</sup>). Semen was collected after a requested five-day period of abstinence. Two spermograms performed eight months apart revealed azoospermia. Testicular doppler ultrasound and ultrasound scans of the deep genital tract showed hypervascularization of the prostate, with calcification of the central zone, slight differential thickening of the pelvic walls, but without obstruction, and non-retentive vesicles. Laboratory tests revealed hormonal dysregulation, with a low serum concentration of inhibin B (36 pg/mL; normal range: 80–270 pg/mL) and a high serum concentration of FSH (15.5 IU/L; normal range: 1.4–10 IU/L). The serum concentration of LH was normal (7.9 IU/L; normal range: 1.4–8 IU/L). Bilateral testicular biopsy was performed and histological analysis showed maturation arrest in all the seminiferous tubules mostly at the spermatocyte stage and more rarely at the spermatid stage. Thus, meiosis was initiated but not completed. In addition, testicular Leydig's cell hyperplasia was observed.

The patient 2 was 44 years old and belongs to a consanguineous family as his parents were first cousins. Compared to other members of his family the patient has a smaller size. At birth, he presented an uro-genital malformation associated with persistence of a large vaginal cavity (4 to 5 cm deep) implanted in the posterior urethra below the sphincter, requiring many surgical interventions. At the age of 21, the examination showed a small size with a male-oriented phenotype, a small rod (6 cm long), two atrophic gonads with a scrotal position about 1cm high. Radiological and endoscopic explorations were carried out, revealing the persistence of the vaginal cavity of uro-genital sinus type, implanted in the posterior urethra below the sphincter. Hormonal examination was performed, revealing high FSH (33UI/L; normal range: 1.4–10 IU/L) and LH (56 UI/L; normal range: 1.4–8 IU/L) values, and a low serum testosterone concentrations (1.4 ng/ml; normal range: 2.50-9.50 ng/dL). The implantation of the urogenital sinus on the posterior side of the urethra has been shown to cause episodes of urinary incontinence, recurrent urinary infections, dysuria and burning urination by infections. In addition, the patient had sexual problem with retrograde ejaculation. The ablation of this müllerian residue was therefore carried out at the age of 33 years old.

Informed consent for genetic analyses was obtained from both patients, in accordance with local ethics guidelines and regulations (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). Patients provided written, informed consent in accordance with the guidelines and regulations of French law (Code Civil, Article 16–10). All methods were performed in accordance with French law (Décret n°2008-31 du 4 avril 2008).

## Conventional and molecular cytogenetic analysis

Standard chromosomal analyses were performed on cultured peripheral lymphocytes from both patients and on derived iPSC clones, by standard procedures [G-banding with trypsin using Giemsa (GTG); R-banding after heat denaturation and Giemsa (RHG)].

FISH analyses were performed on metaphase spreads of lymphocytes from the patient 2. The following probes were used, in accordance with the manufacturer's recommendations: centromeric probes specific for chromosomes 18, X and Y (Vysis) and SRY probes [The probe mix also contains control probes for the X centromere (DXZ1), and for chromosome Y (DYZ1, the heterochromatic block at Yq12)] (Cytocell).

Genomic DNA was isolated from the patient's peripheral blood and from derived iPSCs, with the Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Biotech). The concentration and quality of the extracted DNA were evaluated with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Genomic imbalances from patient 1 and 2 were analyzed by oligonucleotide based array-comparative genomic hybridization analysis (array-CGH). A 1M catalog microarray and a 400K custom microarray were used for each patient (Agilent Technologies, Massy, France). The 1M microarray covered whole genome with an intragenic resolution of 1.8 kb. The custom design had a whole genome coverage with a 5 kb resolution and was strongly enriched in 363 genes with an exonic resolution of 0.1 kb and an intronic resolution of 0.6 kb. These genes of interest were selected because of their certain or potential involvement in reproductive function and sexual development in both humans and mice. Hybridization was performed according to the manufacturer's protocol. Images processing and data analysis were performed with CytoGenomics software (4.0.3.12) (Agilent Technologies). The ADM2 algorithm was used for statistical analysis. Copy number variations were considered significant if they were defined by three or more oligonucleotides and were not identified in the Database of Genomic Variants as a polymorphism (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg19>).

## Mate-pair sequencing

Mate-pair libraries were prepared by following the Nextera Mate-Pair Sample Preparation Guide, gel-free protocol (Part #15035209 Rev.C) obtained from Illumina's webpage (<http://www.illumina.com/>) and using the Nextera Mate-Pair Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). In brief, 1 µg of genomic DNA was fragmented into 2-4kb inserts and tagged with a biotinylated mate-pair junction adaptor using a mate-pair tagment enzyme. The short single-stranded sequencing gaps left from the tagmentation reaction were filled using a strand displacement polymerase. The DNA fragments were then purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) followed by DNA fragment circularization and bluntend ligation using a circularization ligase enzyme. The large circularized molecules were digested by sonication into smaller-sized fragments of ~200-400bp. Following that, biotinylated mate-pair DNA fragments were isolated by binding to streptavidin-coated beads (Dynabeads 1M-280 StreptavidinDInvitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and endrepaired to convert overhangs into blunt ends. A single 'A'

nucleotide was added to the 3'ends of the fragments, which served to ligate Illumina TruSeq paired-end index adapters containing a complimentary `T' nucleotide overhang. The mate-pair libraries were PCR amplified and the amplified products were purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc.). The final concentration of the mate-pair libraries was measured with Quant-iT™ PicoGreen1 (Invitrogen) by following standard procedures. MPS libraries from each sample were diluted accordingly in water to 10nM and pooled into groups of four. Each pool was sequenced, as 100-bp paired-end reads, on a single flow-cell lane of the Illumina HiSeq2500 (Illumina) following the manufacturer's protocol.

Analysis of Mate-Pair Sequencing Data Biotinylated adapter sequences were removed prior to alignment of high quality paired-end reads to the human reference genome GRCh37/hg19 using Burrows-Wheeler Aligner (BWA)-MEM with default parameters. Reads not aligning uniquely as well as PCR duplicates were not analysed further. SVDetect was then used to identify potential translocations, inversions and large deletions/insertions from discordant paired-end data aligning on different chromosomes, with unexpected strand orientation and at a distance deviating from the predefined insert length, respectively. Only SV predictions supported by at least five independent read-pairs were taken into consideration for further analysis. Visualization of the processed MPS data was performed using Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute) and the UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

### **Whole genome sequencing**

Whole genome sequencing was performed for patient with DSD by the Centre National de Recherche en Génomique Humaine (Institut de biologie François Jacob, CEA). After a complete quality control, genomic DNA (1.1µg) has been used to prepare a library for whole genome sequencing, using the Illumina TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit, according to the manufacturer's instructions. After normalisation and quality control, qualified libraries have been sequenced on a HiSeqX5 platform from Illumina (Illumina Inc., CA, USA), as paired-end 150 bp reads. 1 lane of HiSeqX5 flow cell has been produced for each sample, in order to reach an average sequencing depth of 30 x for each sample. Sequence quality parameters have been assessed throughout the sequencing run and standard bioinformatics analysis of sequencing data was based on the Illumina pipeline to generate FASTQ file for each sample.

The following bioinformatics treatments were carried out. Fastq sequences were aligned using bwa program (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) on human Genome Reference HG37. Nomenclatures consistency control of .bam file generated was realized using PicardTools and Samtools programs ((<http://picard.sourceforge.net/>, <http://samtools.sourceforge.net/>). Duplicates were then referenced and flagged in .bam file using Sambamba program (<http://lomereiter.github.io/sambamba/docs/sambamba-view.html>), a reads realignment step was achieved using GATK programs. Quality control statistics were performed using pipeline « in-house » based on metrics generated using Bedtools program (<http://code.google.com/p/bedtools/>) synthesized by R. software. Variants identification was realized by GATK programs [UnifiedGenotyper et HaplotypeCaller

(<http://www.broadinstitute.org/gatk/>), Platypus (<http://www.well.ox.ac.uk/platypus>) and Samtools]. Programs results are gathered within a .vcf file in four independent sample column (UnifiedGenotyper: sample.UG, HaplotypeCaller: sample.HC, Platypus: sample.PY; Samtools: sample.SB). Annotation was achieved using snpEff and snpSift programs (<http://snpeff.sourceforge.net> et <http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html>) on database provide by Ensembl baseline data (<http://www.ensembl.org/index.html>).

### **Patients-derived iPSCs generation and pluripotency characterization**

Patient 2 specific iPSCs were generated by reprogramming his erythroblasts using Sendai virus-mediated gene transfer. Procedures are similar to those used for patient 1 specific iPSCs derivation previously published (Mouka *et al.*, 2017). PCR and immunofluorescence analysis were assayed to assess endogenous expression of pluripotency marker genes in patient 2 specific iPSCs. *In vivo* assessment of pluripotency was performed by teratoma formation and histological analysis.

### ***In vitro* derivation of naïve hiPSCs from conventional hiPSCs**

Primed-hiPSCs of both patients were maintained on irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in DMEM/F12 GlutaMAX supplemented with 20% KSR (thermofisher), 1X nonessential amino acids, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (thermofisher), and 10 ng/ml of bFGF (thermofisher). Media were replaced every day. Cells were passaged as clumps every 4 to 6 days using trypsin and 10 $\mu$ M of ROCK inhibitor (TEBU-Bio). Primed-like hiPSCs were converted into a naive state by cultivating them on MEFs feeders cells in knock-out DMEM medium (thermofisher) supplemented with 20% KSR (thermofisher), 2 mM L-Glutamine (thermofisher), 1X MEM NEAA (thermofisher) and 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (thermofisher) and containing basic fibroblast growth factor (b-FGF) (thermofisher), human leukemia inhibitory factor (LIF) (thermofisher), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ ) (TEBU-Bio), and four small inhibitory molecules (4i), 3  $\mu$ M CHIR99021 (R&D systems), 1  $\mu$ M PD0325901 (R&D systems), 5  $\mu$ M SB203580 (R&D systems), and 5  $\mu$ M SP600125 (R&D systems) (Gafni *et al.*, 2013). Cells were maintained in 4i hiPSC medium for two weeks replacing daily with fresh medium. The growing naive-hiPSCs colonies were picked up and passaged every 2-3 days as single cells with accutase. For each passage, 10  $\mu$ M of ROCK inhibitor (TEBU-Bio) were used.

### ***In vitro* induction of PGCLC from hiPSCs**

Naive-hiPSCs colonies were separated as single cells with accutase and seeded in 96 well low adherence plate (UGAP). Then naive-hiPSCs were centrifugated for embryoid bodies (EBs) formation. Simultaneously of EBs formation, naive-hiPSCS differentiation into PGC was induced by culturing EBs in GMEM medium (thermofisher) supplemented with 20% KSR (thermofisher), 2 mM L-Glutamine (thermofisher), 1X MEM NEAA (thermofisher), 1mM sodium pyruvate (Sigma), 50  $\mu$ M mercaptoethanol (thermofisher), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Sigma), 500 ng/ml BMP2/4 (TEBU-

Bio), 1 µg/ml LIF (thermofisher), 100 ng/ml SCF (TEBU-Bio), 50 ng/ml EGF (TEBU-Bio) and 10 µM ROCK inhibitor (TEBU-Bio). After 4 days, EBs were observed in the center of each well. Three to five EBs were formaldehyde-fixed and paraffin-embedded for each clones studied, then paraffin sections of EBs were used for immunohistochemistry experiments.

### **Immunohistochemical staining for AP2γ and D2-40**

Four to five sections from each EBs clone were mounted on slides. The paraffin was removed and sections were rehydrated in several baths of toluene, ethanol 100°, ethanol 96°, H<sub>2</sub>O and finally stained with hematoxylin-eosin. Endogenous peroxidase activity and non-specific protein binding were blocked by incubating the sections in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by normal horse serum 2.5%. The sections were then incubated with AP2γ or D2-40 mouse primary antibodies for 1h at 37°C. Primary antibody was detected by incubation with anti-mouse secondary antibody. Finally, peroxidase activity was detected with DAB. Sections were rinsed in PBS between each step. Analyses and quantification were performed with VisioLab Analysis software.

### **RNA extraction and Reverse transcription reaction**

Total RNA was extracted using ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit (Epicentre, USA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription was carried out using SuperScript Vilo Master Mix (Thermofisher Scientific, USA) following the instructions provided by the manufacturer. A total of 500 ng of RNA was used in RT reactions. cDNA synthesis in 20 µl of total volume was as follows: 4 µl of 5X Super Script VIL0 Master Mix, 500 ng of total RNA, completed by DEPC-water to 20 µL. After gently mixing tube contents and incubating at 25 °C for 10 min, the cDNA synthesis was performed at 42 °C for 60 min followed by 85 °C for 5 min for inactivation of reverse-transcriptase. Diluted or undiluted cDNA was used in qPCR immediately, or stored at -20 °C until use.

### **Real-Time PCR**

PCR amplifications were performed using the Real-Time PCR Mini-Opticon System (Biorad, USA) and the IQ™ SYBR® Green Supermix kit (Biorad, USA) according to the manufacturer's protocol. Two microlitres of the first strand cDNA (1:5 diluted) were used for amplification in triplicate in a 10 µL reaction solution contained SYBR® Green and 10 pmol of each primer. The following PCR program was used: 95 °C for 3 min, 40 amplification cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s. Serial dilutions of each studied transcript were used to determine the amplification efficiency of each target and housekeeping gene (*RPLP0*). In the present study, data are obtained by analysis with BioRad MFX Software 2.0 and are presented as the fold-change in target gene expression normalized to the internal control gene. The average threshold cycle (CT) was calculated for both the target gene and *RPLP0*, and  $\Delta$ CT was determined as [the mean of the triplicate CT values for the target gene]-[the

mean of the triplicate CT values for RPLPO].  $\Delta\Delta CT$  represented the difference between the paired samples, as calculated by the formula  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ of sample} - \Delta CT \text{ of control})$ . The statistical analysis was carried out with the ANOVA test.

The primers for different target genes are listed in table below :

Gene	Sens primer (5'-3')	Anti-sens primer (5'-3')
<i>OCT3/4</i>	CTGCAGCAGATCAGCCACAT	CACATCCTTCTCGAGCCCAA
<i>NANOG</i>	TGGCCGAAGAATAGCAATGG	AGTCGGGTTCCACCAGGCAT
<i>D2-40</i>	TGTGGTTATGCGFAAAAATGTCG	CCTTCAGCTCTTTAGGGCGAG
<i>CD-38</i>	GGCGCGATGCGTCAAGTACACTG	CCTAGCAGCGTGTCTCCAGGGTG
<i>NANOS3</i>	AGGAGCAGGTTTCAGAGGTGC	AGAGCAGGAGGGCGAAGG
<i>c-KIT</i>	TGAATCTACTTGGAGCCTGCAC	CTGTAATGACCAGGGTGGGC
<i>AP2<math>\gamma</math></i>	GTACGAAGAGGACTGCGAGGA	GGATTCCCATTGCTGCTCC
<i>DAZL</i>	TACTCCACCCTCTGGAAATGG	GCTTCGGTCCACAGATTTCTT
<i>VASA</i>	GCCTCTGGGCGGAATTTT	CGCTTATTACACTCACCAGCATG



## RESULTS

### Conventional and molecular cytogenetic analysis

Patient 1 carried a complex chromosomal rearrangement involving chromosome 7 and chromosome 12 (Mouka *et al.*, 2017). Additional results using Mate-pair sequencing allowed the identification of a total of 7 breakpoints and two deletions (Fig. 1). Four breakpoints occurred within *THSSDA4*, *UTP20* and *ARL1* genes, but none of them are related to reproductive function (Fig.1). These breakpoints were associated with two events: an insertion of a part of the long arm of the chromosome 12 (12q12q23.2) in the short arm of the chromosome 7 (7p21.3) and a pericentric inversion of the chromosome 12 involving the 12p13.31q23.2 segment. In 12q23.2 region additional breakpoints were identified. The two deletions identified do not involved genes of interest. The chromosome 12 breakpoints mapping allowed the identification of a candidate gene, *SYCP3*, compound of the synaptonemal complex essential for chromosomal pairing during prophase of Meiosis I, located at 300 kb from chr12:101441000-101441001 breakpoint (Fig.1). Array-CGH 1M as well as custom design CGH-array failed to identify significant DNA copy number variation that might account for non-obstructive azoospermia.

Patient 2 conventional analysis revealed a karyotype 46,XX (Fig. 2A). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) performed on lymphocytes and on buccal swap using probes of chromosome X and Y confirmed sex chromosome formulae (Fig. 2B). *SRY* gene was absent as demonstrated by FISH (Fig. 2C) and by PCR (data not shown). Array-CGH 1M as well as custom design CGH-array failed to identify significant DNA copy number variation that might account for DSD phenotype. Five variants were identified in *AMH* genes. Two of the five SNPs were correlated with missense variants in *AMH* (2249477G>T: rs10407022 and 2251817T>C: rs10417628), and two others were correlated with intron variant in *AMH* (2250528G>A: rs8112524, 2249112G>A: rs10406324). The last variant was characterized as a rare variant at chr19:2250720 not classified in any database.

### Primed-iPSCs generation and characterization

Primed-hiPSCs from both patients were generated from erythroblasts following the protocol described for patient 1 (Mouka *et al.*, 2017). For patient 2 derived primed-hiPSCs, we investigated the pluripotency of the five selected iPSC clones, by analyzing the expression of the endogenous pluripotency marker genes *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* and *REX-1* by RT-PCR. *RPLPO* gene expression was used as an internal control for this assay. The pluripotency markers were strongly expressed in all five iPSC clones but not in the primary cells (PBMCs) from the patient (Fig. 3A) We also performed immunofluorescence assays, in which we observed the specific staining of SSEA4, TR-1-60 and OCT3/4 pluripotency markers in iPSC colonies (Fig. 3B). Thus, the iPSC clones derived from the infertile patient expressed conventional pluripotency markers, indicating that they were successfully reprogrammed.

We explored the teratoma-forming potential for two iPSC clones. Patient 1 cl.12, cl.32 : were described previously (Mouka *et al.*, 2017); for patient 2: cl.15, cl.20 were picked during early passages (p7 and p8) and injected into muscle to develop teratomas (Fig. 4). Histological analysis of the tumors produced showed that these cells had differentiated into endodermal (A, B), ectodermal (C, D) and mesodermal (E, F) tissues, in the form of glandular gut-like epithelium, neural tissue, large cartilaginous areas, adipocyte tissue and blood vessels (Fig. 4). The tissues were well-differentiated, without malignancy, in all the structures observed.

### **Conversion of primed-hiPSCS into a naive state of pluripotency**

Pluripotent stem cells exist in naive or primed states, respectively represented by pre-implantation epiblast stem cells and developmentally more advanced post-implantation epiblast stem cells (EpiSCs). Protocol for naïve human iPSCs derivation was performed as reported by Gafni *et al.* 2013. As primed state is considered to represent a more advanced “differentiated” state of pluripotency than the naive state, we first focused on converting primed-hiPSCs into a naive state as described in Figure 5. Three clones of patient 1-hiPSC and two clones of patient 2-hiPSC were subjected to conversion by providing exogenous stimulation with bFGF, LIF, TGF $\beta$  and small molecule inhibitor of GSK3, MEK, MAPK and JNK, called “4i” medium, for the induction and maintenance of human naive stem cell pluripotency. After 2 weeks of culture and maintenance through single-cell dissociation passages, naive state conversion generated cells exhibiting naive-like iPSC characteristics as they change from a flat morphology to a domed morphology.

### **Embryoid body formation and PGC differentiation**

Pluripotent stem cells aggregated to form EBs in 96 well low adherence plate in the presence of BMP2/4, LIF, SCF and EGF to induce hPGCLCs differentiation (Fig. 5). BMP2/4 are known to promote PGC differentiation from PSCs in EB cultures. When transferred into PGC medium, they rapidly, within 4 days, differentiated into PGC-like cells.

qRT-PCR performed on patient 1-EBs.cl32 and patient 2-EBs cl.15, demonstrated the expression of the pluripotency markers *OCT4* and *NANOG* as well as early-PGC markers *SOX17*, *CD-38*, *NANOS3*, *KIT*, *AP2 $\gamma$*  and *D2-40*. We also evaluated the expression of late-PGC markers to certify the early-PGC state of generated PGCs. As shown on Figure 6, qRT-PCR analysis demonstrated expression of the endogenous pluripotency gene marker *OCT4* and *NANOG* for each iPSC-derived PGC-like. We show that *SOX17*, the critical specifier of human PGCLCs, was significantly upregulated in each patient-specific EBs lines (Fig. 6). Moreover, these cells also exhibit *CD38* cell surface marker, *NANOS3*, *KIT*, *AP2 $\gamma$*  and *D2-40* expression, which are shared by cells with PGC characteristics. PGC-like cells were not able to show late PGC gene markers such as *DAZL* but surprisingly *VASA* up-regulation was observed in some EBs in both patient-specific PGCLCs indicating the presence of more mature stage in some EBs. Using immunohistochemical analysis with *AP2 $\gamma$*  and *D2-40*

antibodies, we evaluated PGC differentiation within EBs from patient-specific hiPSCs. AP2 $\gamma$ <sup>+</sup> and D2-40<sup>+</sup> cells population were estimated separately. For all clones tested, AP2 $\gamma$ <sup>+</sup> cells and D2-40<sup>+</sup> cells were detected within EBs (Fig. 7A and 7B). The experiment was performed three times for patient 1-iPSCs and twice for patient 2-iPSCs. We estimated the percentage of PGC-like cells obtained; for patient 1-EBs, we detected 27.7%, 6% then 28.44% AP2 $\gamma$ <sup>+</sup> or D2-40<sup>+</sup> positive cells. For patient 2-EBs, we detected 2.8% then 24.7% of AP2 $\gamma$ <sup>+</sup> or D2-40<sup>+</sup> positive cells (Fig. 7A and B).

## DISCUSSION

We generated iPSC from erythroblasts of two infertile men with genetic abnormalities (a CCR and a 46,XX karyotype background) and converted them from primed to naïve state before differentiating them into PGC-like cells.

With the discovery of the state of naive human pluripotency we overcome several problems encountered by conventional primed human pluripotent stem cells. This include variable differentiation capability, difficult single-cell passaging, and low gene editing efficiency (Dodsworth *et al.*, 2015). Numerous studies have demonstrated the possibility to reprogram epiblast cells into a naive state of pluripotency. Culture conditions and especially growth factors used, determine the pluripotency state that PGC reached. Thus, the differentiation process was first initiated by the conversion of hiPSCs from a primed to a naive state. The conversion method used provides exogenous stimulation with 4i/LIF, bFGF and TGF $\beta$ . LIF-stimulated JAK/STAT3 signaling is known to be indispensable for the naive state of pluripotent stem cells. In the mouse system, FGF and TGF $\beta$  stimulate primed pluripotency (Weinberger *et al.*, 2016). Surprisingly, addition of FGF and TGF $\beta$  seems to contribute to growth and self-renewal of naive iPSCs (Gafni *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2015). Inhibition combination of GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) by CHIR99021 and MEK (Mitogen-activated protein kinase) by PD0325901, which activates WNT signalization and inhibits ERK (extracellular signal-regulated kinase pathway respectively, maintains the cells in an early naive state (Ying *et al.*, 2008, Marks *et al.*, 2012, Gafni *et al.*, 2013). In addition, inhibition of MAPK (Mitogen-activated protein kinase) by SB203580 and JNK (c-Jun N-terminal kinase) by SP600125 together with GSKi and MEKi has also been reported to support naive pluripotency (Gafni *et al.*, 2013). The use of inhibitors cocktail have proved their capacity to effectively improve naive like iPSC reprogramming process (Gafni *et al.*, 2013, Chan *et al.*, 2013, Ware *et al.*, 2014, Valamehr *et al.*, 2014, Theunissen *et al.*, 2014).

Naive-hiPSCs differentiation into PGC-like cells was achieved through EBs formation and by culturing the cells with BMP2/4 (the most important cytokine for PGC induction), LIF, EGF and SCF which together promote cell survival and proliferation. This experimental strategy has already proved its efficiency in mouse (Hayashi *et al.*, 2011). PGC-like cells determination was assessed by the upregulated expression of pluripotency and early-PGC associated markers. immunohistochemical analysis confirmed that PGCLS differentiation coincided with day 4 EBs as they were able to express AP2 $\gamma$  and D2-40 marker proteins. Remarkably, RT-qPCR revealed that SOX17, the human, but not mouse, key regulator of PGCLC specification was significantly upregulated within EBs (Kanai-Azuma *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2009, Irie *et al.*, 2015). Thus, BMP2 /4 (with LIF, SCF, and EGF) were effective in inducing hPGCLC in both patient specific iPSCs.

Interestingly, we noticed a significant upregulation of VASA expression within an EB of patient 1. VASA gene represents a post-migratory PGC marker which is expressed in PGCs upon colonization of gonads *in vivo* but not expressed in PGCs in earlier stages of development. Thus, we can assume that within this particular EB, the germ cells are most likely in a more mature differentiation state, more closely resembling to late PGCLCs rather than nascent germ cells. PGC

differentiation approach was reproducible even if the percentage of positive germ cells within EBs was more or less comparable :indeed, in all our experiments, iPSCs achieved the PGC fate.

Forced expression of specific genes and/or the introduction of specific factors into the medium are the two strategies used to induce male germs cells *in vitro*. The differentiation of male hiPSCs into germ cells has succeeded to generate several stage such as PGCs (Park *et al.*, 2009, Medrano *et al.*, 2012, Panula *et al.*, 2011), gonocytes (Ramathal *et al.*, 2014), SSCs (Easley *et al.*, 2012), germ cells-like cells initiating meiosis (Ge *et al.*, 2015), spermatocytes (Easley *et al.*, 2012, Eguizabal *et al.*, 2011), and haploid (Medrano *et al.*, 2016), round spermatid-like cells (Panula *et al.*, 2011, Easley *et al.*, 2012, Eguizabal *et al.*, 2011). Each time, the PGC stage is carefully and specifically reached before further differentiation and so represents an indispensable intermediate stage for *in vitro* germs cells development. But so far, none has generated germ cells in a context of karyotype abnormalities. Subsequently, directing the PGCs to undergo meiosis would be the next step to produce a meaningful *in vitro* genetic model of meiosis.

Checkpoint mechanisms occur during the meiosis process. Failure in chromosome synapsis can be one of surveillance process target leading almost always in spermatogenic arrest at the mid-pachytene stage of the meiotic prophase or at the metaphase stage of the first meiotic division, resulting in subfertility or infertility in males. Otherwise, if surveillance failed to detect such abnormality in chromosome paring, it can lead to aneuploidy, one of the major causes of embryonic loss. The patient 1 carry a CCR that could alone explained azoospermia as such structure might disrupt chromosome paring of pachytene stage during meiosis process. However, testicular biopsy revealed the presence of spermatocytes and some rare spermatids, attesting that despite CCR presence the first and even the second division of meiosis can occur. Driving germinal differentiation further would provide answer for the underlying cause for meiosis arrest and especially to a better understanding of CCR pairing and checkpoint mechanism behavior during meiosis. As mentioned before, one breakpoint occurred 300kb near the *SYCP3* gene and hypothetically could have interrupted regulatory elements of the gene. *SYCP3* protein is a compound of the synaptonemal complex that binds homologous chromosomes together at pachytene (synapsie). Thus, allowing achievement of key processes such as recombination and meiotic chromosomes segregation. Patients heterozygous for a mutation in *SYCP3* have been reported associated with azoospermia (Miyamoto *et al.*, 2003, Stouffs *et al.*, 2005). Proximity to the site of a breakpoint event can change the activity of a gene. Chromosomal rearrangements have been shown to interrupt occasionally the regulatory regions or configuration of genes close to the breakpoint, leading to changes in expression. Heterozygote mutations in *SYCP3* were reported to be associated to azoospermia as such mutations affect meiotic synapsis and block spermatogenesis. *SYCP3* gene is only expressed in germline cells and specifically during meiosis. Thus, only further differentiation of patient-specific PGC through meiosis could allow estimated *SYCP3* expression and confirm whether or not this gene is responsible for the meiosis failure.

An important aspect of hiPSCs is that they can recapitulate early stages of embryonic development as they differentiate *in vitro*. As such, hiPSCs and PGCLCs generated from 46,XX-SRY-negative man represent an invaluable resource for studying particular aspects in

embryo development such as early sexual development. The resulting PGCLCs could be employed as an *in vitro* model system to study early genes expression and epigenetic modification hoping to discover new causes for DSD. *In vivo*, PGCs differentiate into gonocytes (or prospermatogonia) once they have reached the genital ridges. Then, prospermatogonia begin a mitotic activity phase and initiate differentiation into spermatogonia. In XX sex-reversed males, XX germ cells enter the first phase of spermatogenesis as they become prospermatogonia, but they are then eliminated since they are unable to complete spermatogonial proliferation and differentiation (Taketo, 2015). The XX germ cells thus fail to enter meiosis. The Y chromosome plays a major role in male fertility. In men, deletions of specific regions of the Y chromosome have been linked to an early failure of spermatogenesis and consequent infertility (McElreavey *et al.*, 2006, Navarro-Costa *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2016). The microdeletions of AZF (Azoospermia Factor) regions carried by the long arm of the Y chromosome (Yq11) represent one of the most frequent genetic causes of azoospermia or severe oligospermia (Coutton *et al.*, 2012). The resulting SRY-negative 46,XX PGCs generated from a sex-reversed men would probably be unable to go through meiosis without Y chromosome. Thus, it remains to be evaluated whether the PGC-like cells derived from patient 2 could differentiate through the meiosis process into more mature male germ cells if specific Y genes from AZF regions were added.

In conclusion, using iPSC strategy, we were able to show that infertile men with non-obstructive azoospermia or developmental sex disorder can produce PGC-like cells. The availability of infertile men-iPSC lines and their use for *in vitro* disease modeling will accelerate our understanding and treatment of male infertility.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank all the co-authors for their contributions to this work and all members of the technical team of the cytogenetic service of Antoine Bécélère Hospital, Dr Vincent Izard for patient recruitment, the anatomical pathology service of Kremlin Bicêtre Hospital, and both patients and their family.

## **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

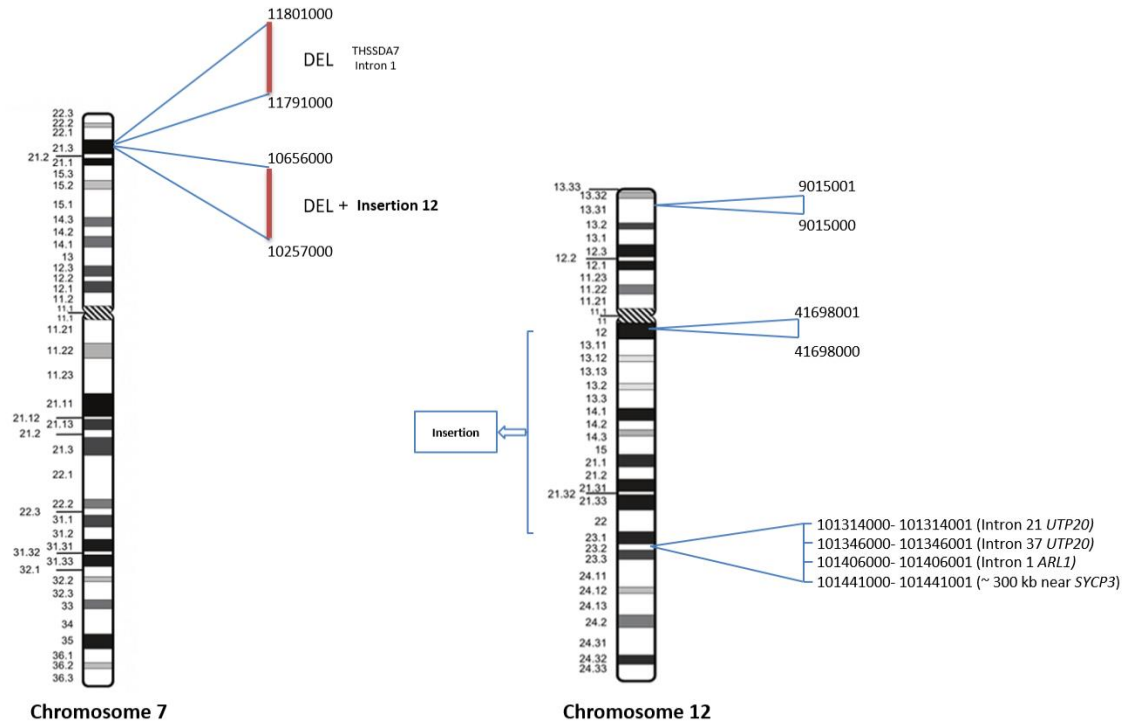
- Aflatoonian, B., L. Ruban, M. Jones, R. Aflatoonian, A. Fazeli and H. D. Moore, 2009: In vitro post-meiotic germ cell development from human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, 24, 3150-3159.
- Bucay, N., M. Yebra, V. Cirulli, I. Afrikanova, T. Kaido, A. Hayek and A. M. Montgomery, 2009: A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27, 68-77.
- Chan, Y. S., J. Goke, J. H. Ng, X. Lu, K. A. Gonzales, C. P. Tan, W. Q. Tng, Z. Z. Hong, Y. S. Lim and H. H. Ng, 2013: Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell*, 13, 663-675.
- Clark, A. T., M. S. Bodnar, M. Fox, R. T. Rodriguez, M. J. Abeyta, M. T. Firpo and R. A. Pera, 2004: Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*, 13, 727-739.
- Coutton, C., V. Satre, C. Arnoult and P. Ray, 2012: Génétique de l'infertilité masculine: Les nouveaux acteurs. *médecine/sciences*, 28, 513-518.
- De Felici, M., 2013: Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. *Oogenesis*, 19-37.
- Dodsworth, B. T., R. Flynn and S. A. Cowley, 2015: The Current State of Naive Human Pluripotency. *Stem Cells*, 33, 3181-3186.
- Easley, C. A. t., B. T. Phillips, M. M. McGuire, J. M. Barringer, H. Valli, B. P. Hermann, C. R. Simerly, A. Rajkovic, T. Miki, K. E. Orwig and G. P. Schatten, 2012: Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep*, 2, 440-446.
- Eguizabal, C., N. Montserrat, R. Vassena, M. Barragan, E. Garreta, L. Garcia-Quevedo, F. Vidal, A. Giorgetti, A. Veiga and J. C. Izpisua Belmonte, 2011: Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 29, 1186-1195.
- Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka and C. Foresta, 2007: Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online*, 14, 734-745.
- Fujiwara, T., N. R. Dunn and B. L. Hogan, 2001: Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13739-13744.
- Gafni, O., L. Weinberger, A. A. Mansour, Y. S. Manor, E. Chomsky, D. Ben-Yosef, Y. Kalma, S. Viukov, I. Maza, A. Zviran, Y. Rais, Z. Shipony, Z. Mukamel, V. Krupalnik, M. Zerbib, S. Geula, I. Caspi, D. Schneir, T. Shwartz, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, S. Benjamin, I. Amit, A. Tanay, R. Massarwa, N. Novershtern and J. H. Hanna, 2013: Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504, 282-286.
- Ge, W., H. G. Ma, S. F. Cheng, Y. C. Sun, L. L. Sun, X. F. Sun, L. Li, P. Dyce, J. Li, Q. H. Shi and W. Shen, 2015: Differentiation of early germ cells from human skin-derived stem cells without exogenous gene integration. *Sci Rep*, 5, 13822.
- Hamada, A. J., S. C. Esteves and A. Agarwal, 2013: A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1, 39-60.

- Hara, K., M. Kanai-Azuma, M. Uemura, H. Shitara, C. Taya, H. Yonekawa, H. Kawakami, N. Tsunekawa, M. Kurohmaru and Y. Kanai, 2009: Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev Biol*, 330, 427-439.
- Hayashi, K., H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki and M. Saitou, 2011: Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519-532.
- Huang, G., S. Ye, X. Zhou, D. Liu and Q. L. Ying, 2015: Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72, 1741-1757.
- Irie, N., W. W. Tang and M. Azim Surani, 2014: Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. *Reproductive medicine and biology*, 13, 203-215.
- Irie, N., L. Weinberger, W. W. Tang, T. Kobayashi, S. Viukov, Y. S. Manor, S. Dietmann, J. H. Hanna and M. A. Surani, 2015: SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell*, 160, 253-268.
- Kanai-Azuma, M., Y. Kanai, J. M. Gad, Y. Tajima, C. Taya, M. Kurohmaru, Y. Sanai, H. Yonekawa, K. Yazaki, P. P. Tam and Y. Hayashi, 2002: Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*, 129, 2367-2379.
- Liu, X. G., H. Y. Hu, Y. H. Guo and Y. P. Sun, 2016: Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genetics and molecular research : GMR*, 15.
- Marks, H., T. Kalkan, R. Menafrá, S. Denissov, K. Jones, H. Hofemeister, J. Nichols, A. Kranz, A. F. Stewart, A. Smith and H. G. Stunnenberg, 2012: The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*, 149, 590-604.
- McElreavey, K., C. Ravel, S. Chantot-Bastaraud and J. P. Siffroi, 2006: Y chromosome variants and male reproductive function. *International journal of andrology*, 29, 298-303; discussion 304-296.
- Medrano, J. V., A. M. Martínez-Arroyo, J. M. Miguez, I. Moreno, S. Martínez, A. Quinonero, P. Díaz-Gimeno, A. I. Marques-Mari, A. Pellicer, J. Remohi and C. Simon, 2016: Human somatic cells subjected to genetic induction with six germ line-related factors display meiotic germ cell-like features. *Sci Rep*, 6, 24956.
- Medrano, J. V., C. Ramathal, H. N. Nguyen, C. Simon and R. A. Reijo Pera, 2012: Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro. *Stem Cells*, 30, 441-451.
- Miyamoto, T., S. Hasuike, L. Yogev, M. R. Maduro, M. Ishikawa, H. Westphal and D. J. Lamb, 2003: Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet (London, England)*, 362, 1714-1719.
- Mouka, A., V. Izard, G. Tachdjian, S. Brisset, F. Yates, A. Mayeur, L. Drevillon, R. Jarray, P. Leboulch, L. Maouche-Chretien and L. Tosca, 2017: Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal rearrangement as a genetic model for infertility studies. *Sci Rep*, 7, 39760.



- Mouka, A., G. Tachdjian, J. Dupont, L. Drevillon and L. Tosca, 2016: In Vitro Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility. *Stem Cells Dev*, 25, 509-521.
- Navarro-Costa, P., C. E. Plancha and J. Goncalves, 2010: Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 936569.
- Panula, S., J. V. Medrano, K. Kee, R. Bergstrom, H. N. Nguyen, B. Byers, K. D. Wilson, J. C. Wu, C. Simon, O. Hovatta and R. A. Reijo Pera, 2011: Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, 20, 752-762.
- Park, T. S., Z. Galic, A. E. Conway, A. Lindgren, B. J. van Handel, M. Magnusson, L. Richter, M. A. Teitell, H. K. A. Mikkola, W. E. Lowry, K. Plath and A. T. Clark, 2009: Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *Stem Cells*, 27, 783-795.
- Ramathal, C., J. Durruthy-Durruthy, M. Sukhwani, J. E. Arakaki, P. J. Turek, K. E. Orwig and R. A. Reijo Pera, 2014: Fate of iPSCs derived from azoospermic and fertile men following xenotransplantation to murine seminiferous tubules. *Cell Rep*, 7, 1284-1297.
- Sharlip, I. D., J. P. Jarow, A. M. Belker, L. I. Lipshultz, M. Sigman, A. J. Thomas, P. N. Schlegel, S. S. Howards, A. Nehra, M. D. Damewood, J. W. Overstreet and R. Sadovsky, 2002: Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*, 77, 873-882.
- Shi, Q. and R. H. Martin, 2000: Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenetics and cell genetics*, 90, 219-226.
- Stouffs, K., W. Lissens, H. Tournaye, A. Van Steirteghem and I. Liebaers, 2005: SYCP3 mutations are uncommon in patients with azoospermia. *Fertil Steril*, 84, 1019-1020.
- Sutton, E., J. Hughes, S. White, R. Sekido, J. Tan, V. Arboleda, N. Rogers, K. Knowler, L. Rowley, H. Eyre, K. Rizzoti, D. McAninch, J. Goncalves, J. Slee, E. Turbitt, D. Bruno, H. Bengtsson, V. Harley, E. Vilain, A. Sinclair, R. Lovell-Badge and P. Thomas, 2011: Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest*, 121, 328-341.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, 2007: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-872.
- Taketo, T., 2015: The role of sex chromosomes in mammalian germ cell differentiation: can the germ cells carrying X and Y chromosomes differentiate into fertile oocytes? *Asian J Androl*, 17, 360-366.
- Theunissen, T. W., B. E. Powell, H. Wang, M. Mitalipova, D. A. Faddah, J. Reddy, Z. P. Fan, D. Maetzel, K. Ganz, L. Shi, T. Lungjangwa, S. Imsoonthornruksa, Y. Stelzer, S. Rangarajan, A. D'Alessio, J. Zhang, Q. Gao, M. M. Dawlaty, R. A. Young, N. S. Gray and R. Jaenisch, 2014: Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, 15, 471-487.

- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones, 1998: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Valamehr, B., M. Robinson, R. Abujarour, B. Reznier, F. Vranceanu, T. Le, A. Medcalf, T. T. Lee, M. Fitch, D. Robbins and P. Flynn, 2014: Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2, 366-381.
- Vorona, E., M. Zitzmann, J. Gromoll, A. N. Schuring and E. Nieschlag, 2007: Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92, 3458-3465.
- Ware, C. B., A. M. Nelson, B. Mecham, J. Hesson, W. Zhou, E. C. Jonlin, A. J. Jimenez-Caliani, X. Deng, C. Cavanaugh, S. Cook, P. J. Tesar, J. Okada, L. Margaretha, H. Sperber, M. Choi, C. A. Blau, P. M. Treuting, R. D. Hawkins, V. Cirulli and H. Ruohola-Baker, 2014: Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4484-4489.
- Weinberger, L., M. Ayyash, N. Novershtern and J. H. Hanna, 2016: Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17, 155-169.
- West, F. D., D. W. Machacek, N. L. Boyd, K. Pandiyan, K. R. Robbins and S. L. Stice, 2008: Enrichment and differentiation of human germ-like cells mediated by feeder cells and basic fibroblast growth factor signaling. *Stem Cells*, 26, 2768-2776.
- Ying, Q. L., J. Wray, J. Nichols, L. Battle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen and A. Smith, 2008: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453, 519-523.



**Figure 1** : Mate-pair sequencing results of patient 1.

The CCR involved 7 breakpoints: one on the short arm of the derivative chromosome 7 7p21.3 region along with two deletions (chr7:11,801,000-11,791,000 and chr7:10,257,000-10,656,000), one on the short arm of the derivative chromosome 12 12p13.31 region(chr12:9,015,000-9,015,001) and the remaining 5 breakpoints on the long arm of the derivative chromosome 12 (chr12:41,698,000-41,698,001 proximal 12q12 breakpoint; chr12:101,314,000-101,314,001, chr12:101,346,000-101,346,001, chr12:101,406,000-101,406,001, chr12:101,441,000-101,441,001 distal 12q23.2 breakpoints). Genomic positions are described according to the hg38 genome assembly.

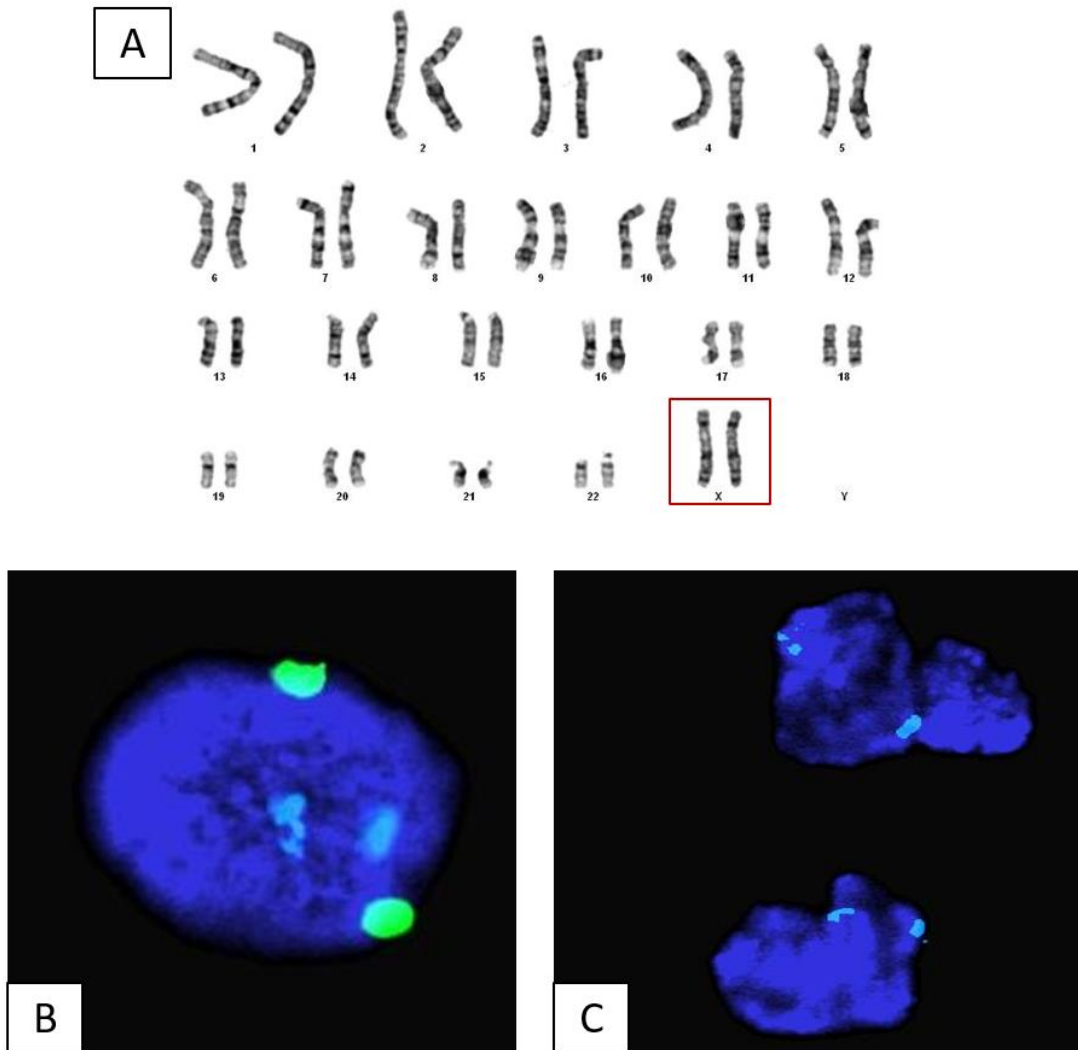
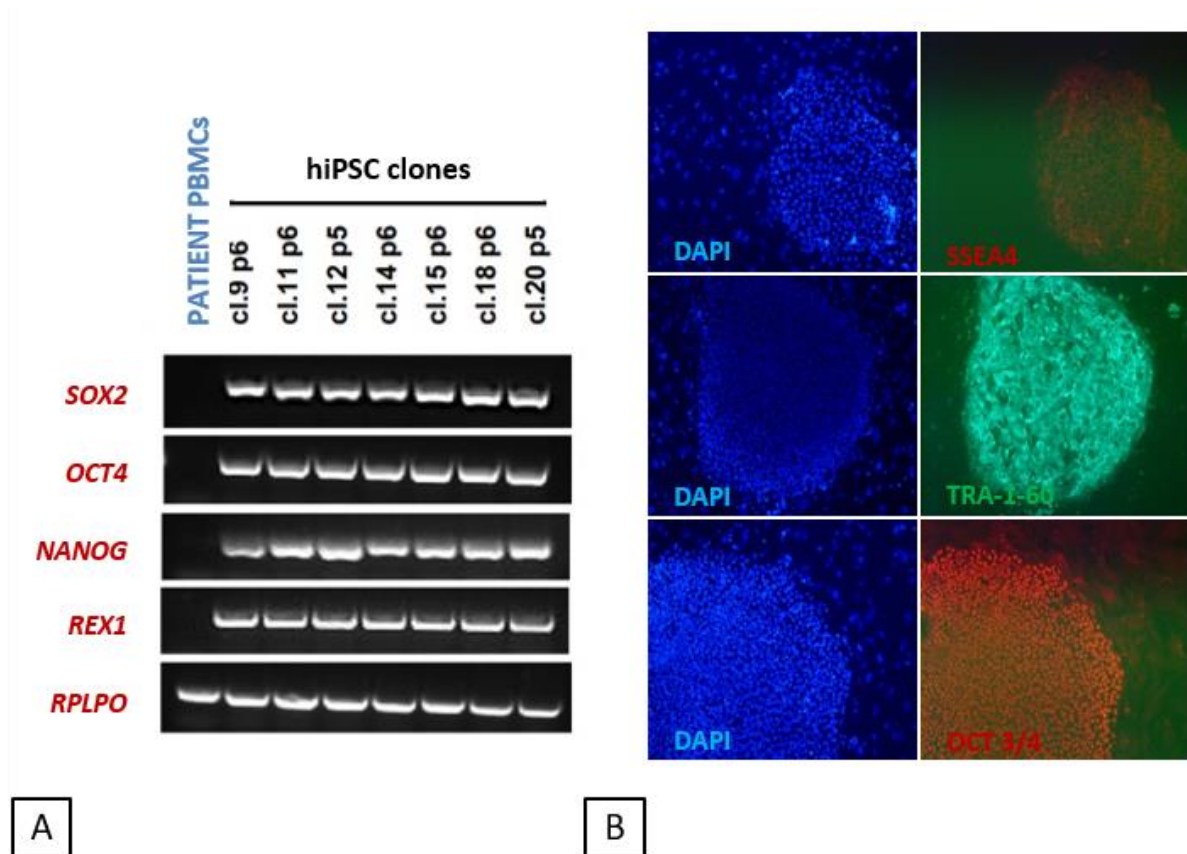


Figure 2 : Conventional and molecular cytogenetic analysis for patient 2.

(A) G-banded standard karyotype designated as 46,XX.

(B) FISH analysis on buccal swab using centromeric probe for chromosome 18 (blue), chromosomes X (green) and chromosome Y (red).

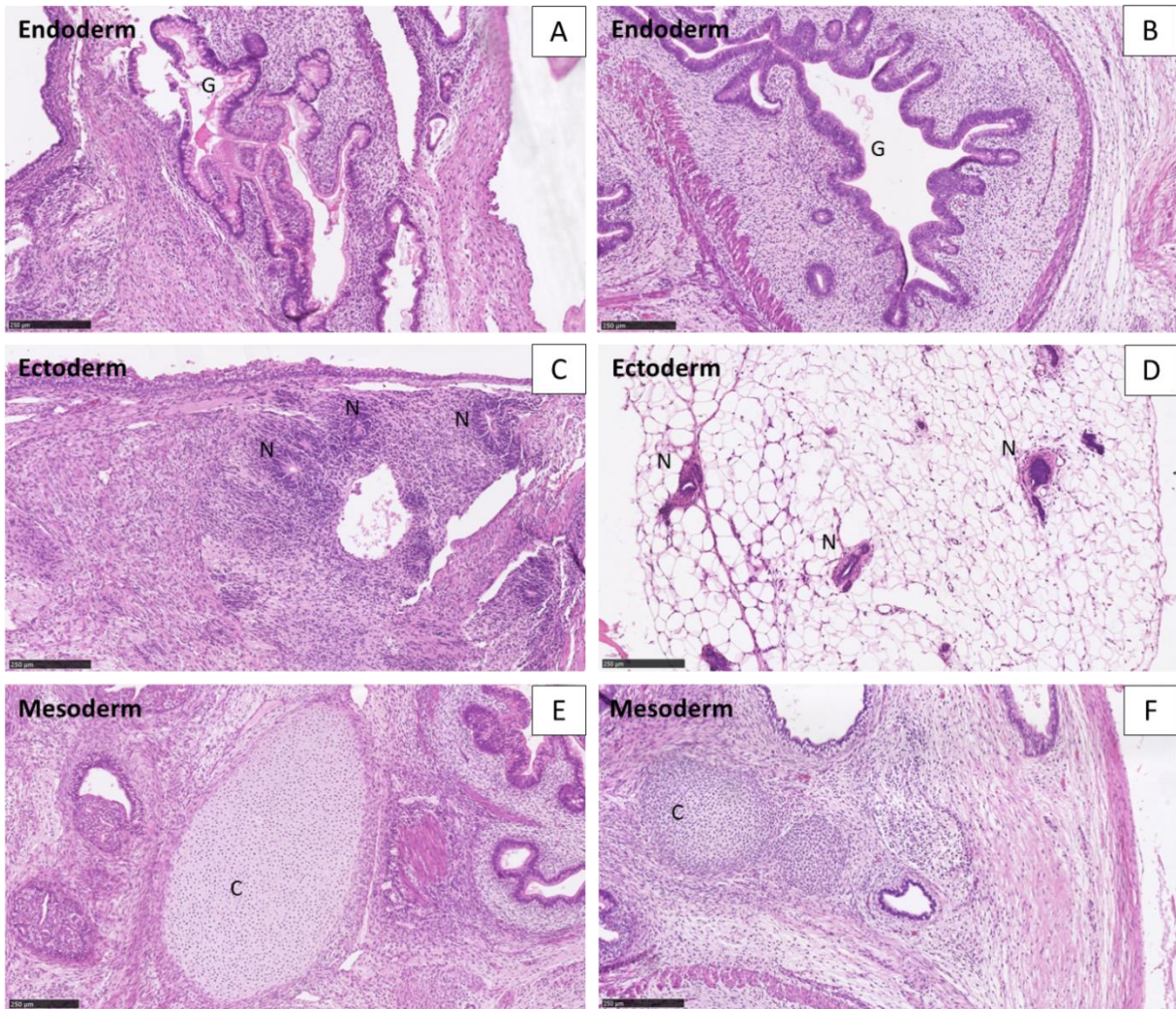
(C) FISH analysis on buccal swab using centromeric probe for chromosome X (blue), chromosome Y heterochromic region (green) and *SRY* gene locus on chromosome Y (red).



**Figure 3** : Endogenous expression of pluripotency-related markers by patient 2-derived iPSCs.

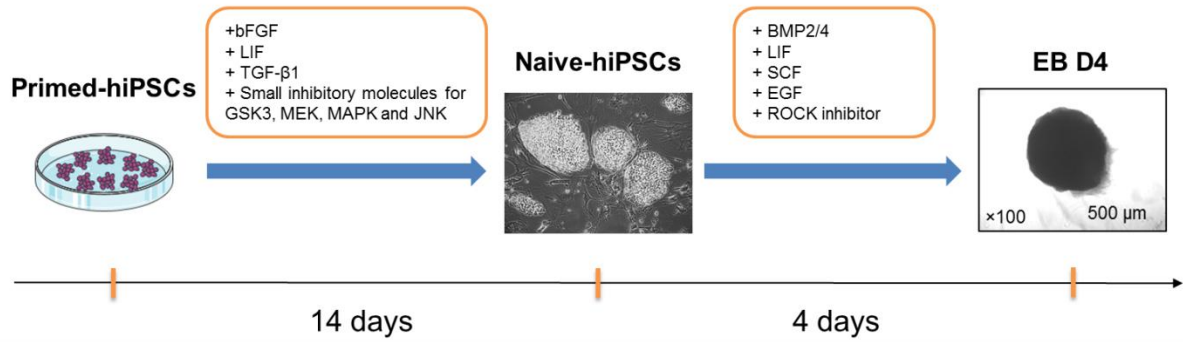
**(A)** RT-PCR analysis for detection of the pluripotency markers *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* and *REX-1*. The seven iPSC clones derived from patient 2 expressed the targeted genes.

**(B)** Immunofluorescence staining of three stem cell proteins (SSEA4, TRA-1-60 and OCT3/4) in patient iPS clones 15 and 20. Both clones expressed the three pluripotency markers.



**Figure 4** : Germ cell layer components within teratomas obtained with patient 2-derived iPSCs.

The differentiation, at passage 8 (cl.15) and 7 (cl.20), of iPSCs into ectoderm, endoderm and mesoderm was evaluated on whole sections stained with hematoxylin and eosin, for iPS clones 15 (**A, C, E**) and 20 (**B, D, F**). Both clones displayed structures representing the three lineages: (**A, B**) endoderm, (**C, D**) ectoderm, (**E, F**) mesoderm. Hematoxylin and eosin stain,  $\times 20$ ; AT, adipocyte tissue; BV, blood vessels; C, cartilage; G, gut epithelial tissue; N, neural tissue.



**Figure 5** : Timeline of *in vitro* conversion of primed-hiPSCs into a naïve state of pluripotency and PGC differentiation through EBs formation and BMP induction. BMP2/4: Bone morphogenetic protein 2/4; EB D4: embryoid body day 4; EGF: epidermal growth factor; GSK3: Glycogen synthase kinase-3; hiPSC: human induced pluripotent stem cells; JNK: c-Jun N-terminal kinase; LIF: Leukemia inhibitory factor; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase; SCF: stem cell factor; TGF-β1: Transforming growth factor β1.

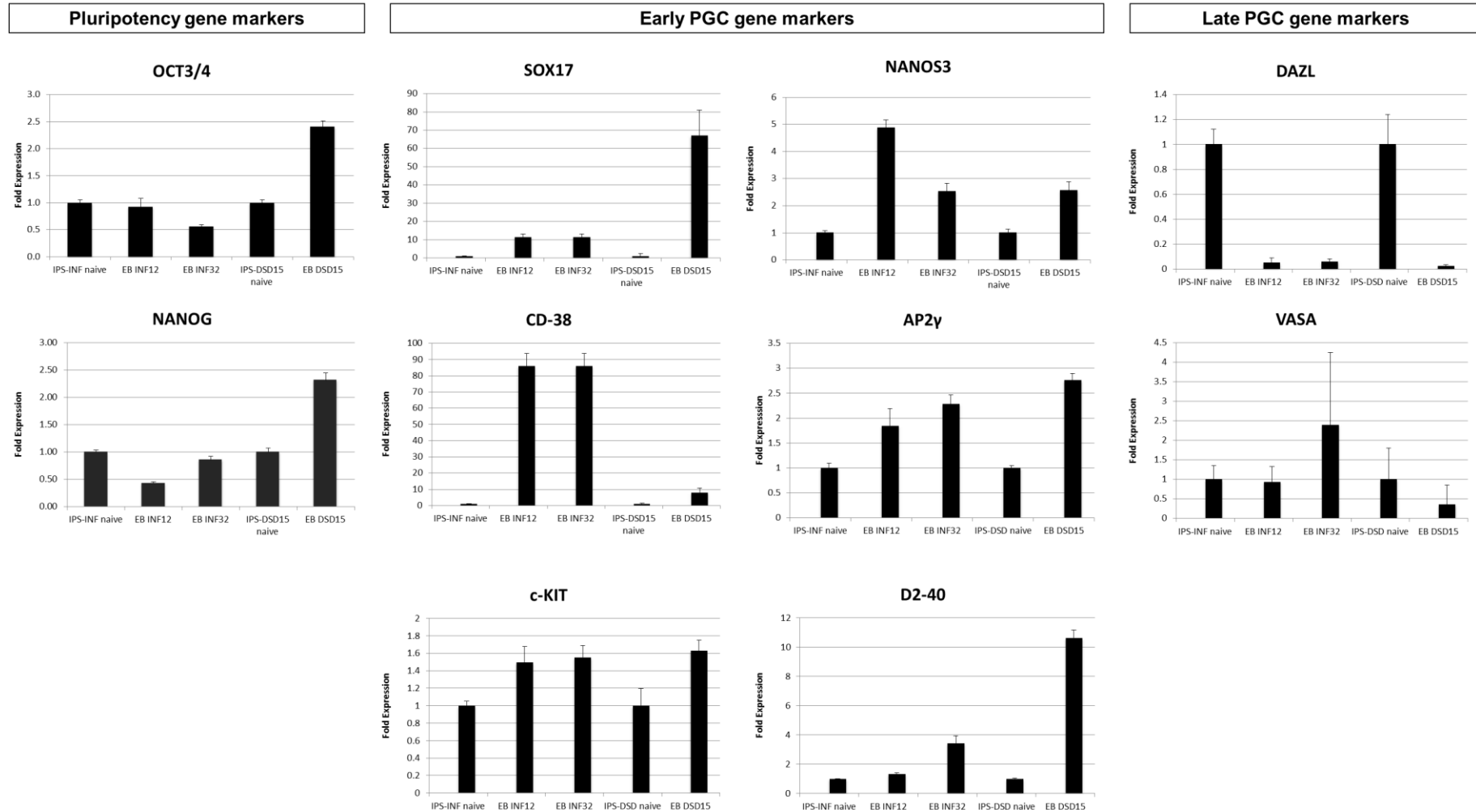
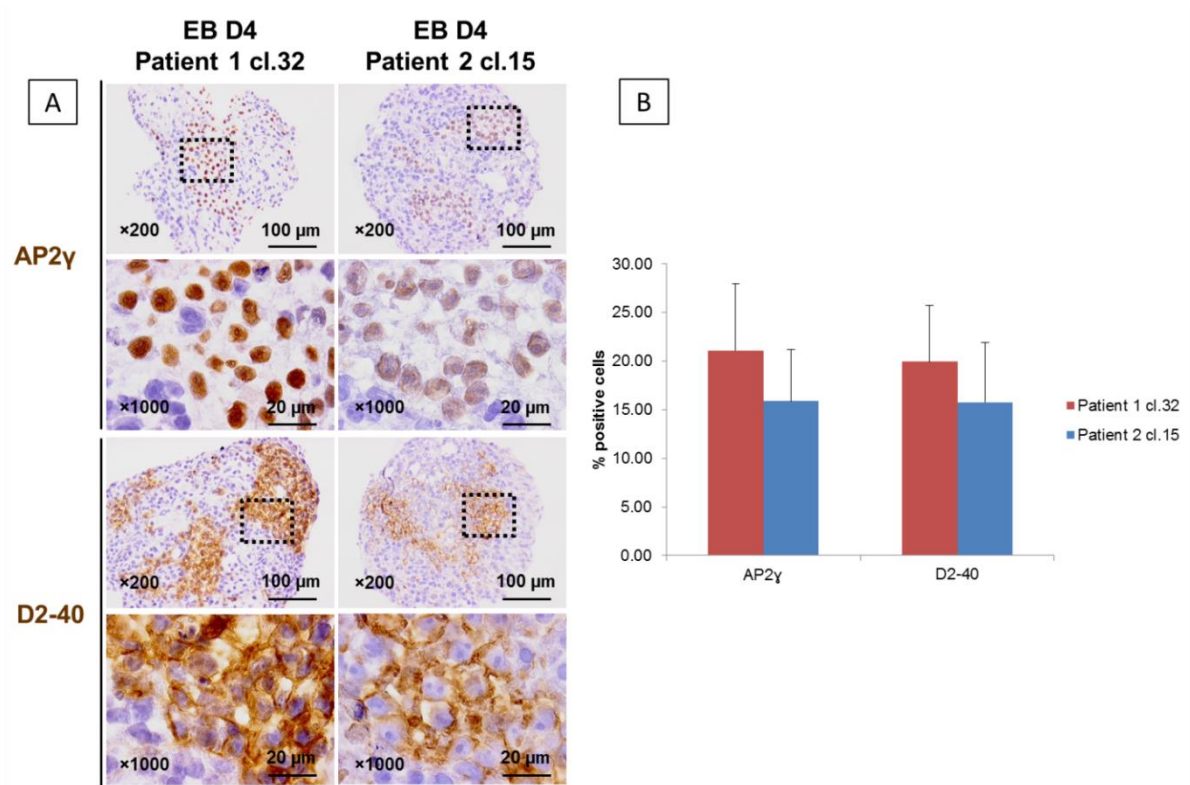


Figure 6 : Expression analysis by qRT-PCR of day 4 embryoids derived from patients hiPSCs. Relative expression levels are shown with normalization to RPLPO. Error bars indicate mean  $\pm$  SD from two to four independent biological replicates.





**Figure 7** : Immunohistochemical expression of AP2 $\gamma$  and D2-40 on EBs sections.

**(A)** Immunohistochemical pictures showing PGC positive for AP2 $\gamma$  and D2-40 in EB D4 from patient 1 cl.32-hiPSCs and patient 2 cl.15-hiPSCs.

**(B)** Percentage rate of PGC cells population differentiated within EBs from patient 1 cl.32-hiPSCs and patient 2 cl.15-hiPSCs as estimated after quantification (VisioLab Analysis software).

### **III. Identification et caractérisation de microremaniements chromosomiques cryptiques chez des patients présentant une azoospermie-cryptozoospermie ou un désordre du développement sexuel par CGH personnalisée**

#### **A. Contribution à l'identification de microremaniements chromosomiques cryptiques à l'origine de l'azoospermie non-obstructive-cryptozoospermie d'une cohorte de 43 hommes**

Les recherches génétiques réalisées dans le cadre du bilan d'infertilité masculine comprennent l'analyse du caryotype standard et la recherche de microdélétion des régions AZF. Cependant, l'impact des variations de nombre de copies de l'ADN (CNV) détectées par hybridation génomique comparative sur puce à ADN ou CGH-array est peu documenté. L'objectif a été de tester un design de puce CGH-array personnalisé « infertilité et désordre du développement sexuel » chez une cohorte de 43 patients atteints d'azoospermie non-obstructive ou de cryptozoospermie selon les spermogrammes afin de détecter des déséquilibres de l'ADN associés à l'échec de la spermatogenèse.

##### **1. Caractérisation générale des CNV**

Chaque patient analysé a présenté entre 42 à 69 CNV, hors CNV de la référence, avec une moyenne de 52,6 CNV par patient. Les CNV détectés ont été classés en 4 catégories différentes : bénin, hors critères, VOUS (Variation Of Uncertain Significance ou variation de signification incertaine) ou PP (potentiellement pathogène) (Tableau 17). Dans cette étude, seule les CNV classés VOUS ou PP ont été retenus. Les CNV classés PP ont uniquement concerné les variants associés à une microdélétion des régions AZF du chromosome Y, connue comme cause d'infertilité sévère chez l'homme (cf partie A.5).

Après interprétation, un nombre compris entre 1 à 12 CNV, classés VOUS ou PP ont été retenus pour chaque patient avec une moyenne de 4 CNV. Chaque déséquilibre génomique retenu dans cette cohorte de 43 patients a été placé sur un caryogramme afin de visualiser leur répartition (Figure 35).

Classe		Signification	Sélection
<b>B</b>	Bénin	CNV couvert sur DGV et ne comprenant pas, ou ne se situant pas à proximité (1Mb) de gènes d'intérêt en lien avec le phénotype d'infertilité ou de DSD.	<b>Non retenu</b>
<b>HC</b>	Hors critères	CNV non couvert sur DGV et ne comprenant pas, ou ne se situant pas à proximité (1Mb) de gènes d'intérêt en lien avec le phénotype d'infertilité ou de DSD.	<b>Non retenu</b>
<b>VOUS</b>	Variation de signification incertaine	CNV comprenant, ou se situant à proximité (1Mb) de gènes d'intérêt en lien avec le phénotype d'infertilité ou de DSD. Il existe une incertitude quant à la pathogénicité de ces gènes, celle-ci n'ayant pas été clairement prouvée chez l'homme ou un autre modèle animal.	<b>Retenu</b>
<b>PP</b>	Potentiellement pathogène	CNV comprenant des gènes d'intérêt en lien avec le phénotype d'infertilité ou de DSD et dont l'impact est connu chez l'homme.	<b>Retenu</b>

Tableau 17 : Méthode de classement et de sélection des CNV.

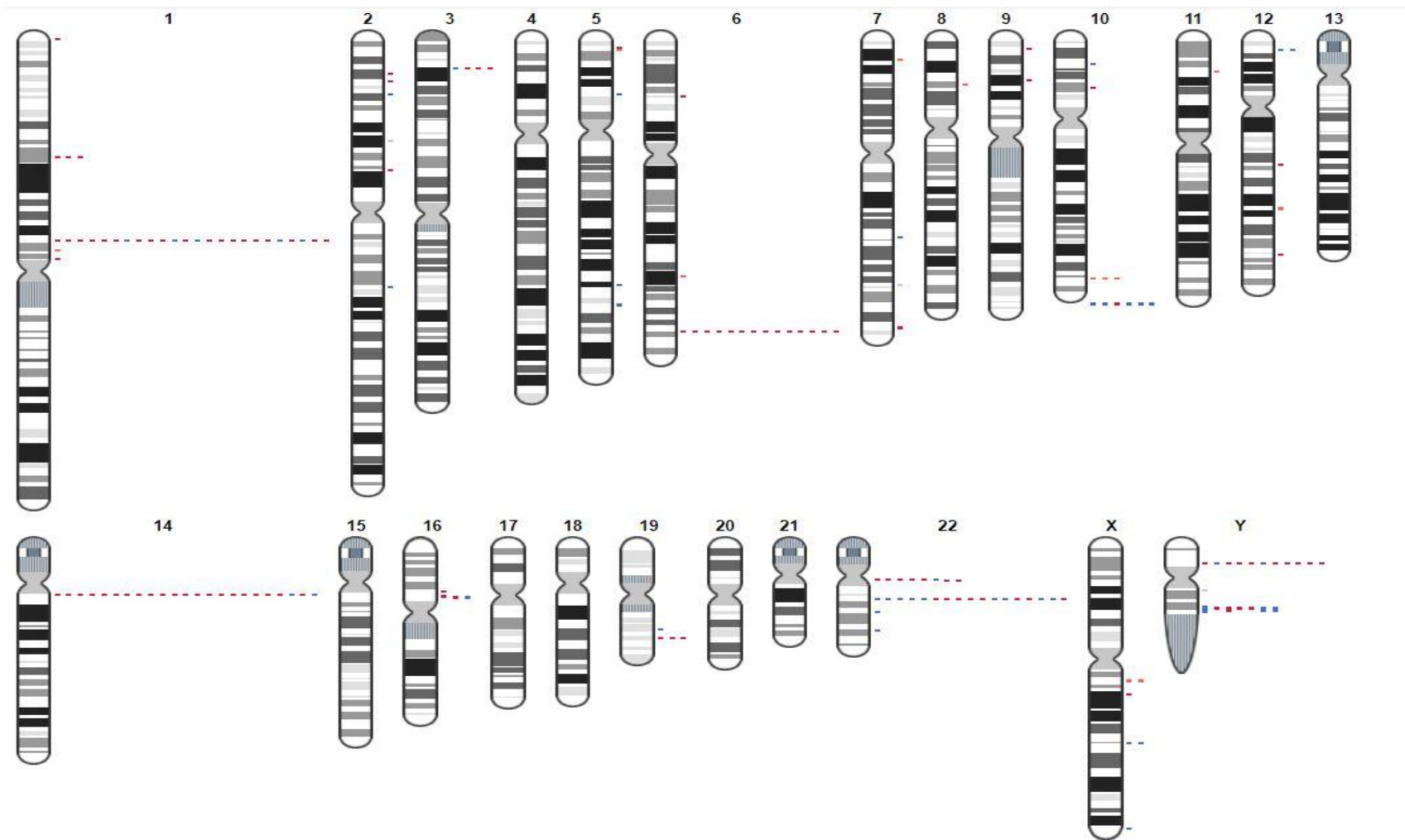
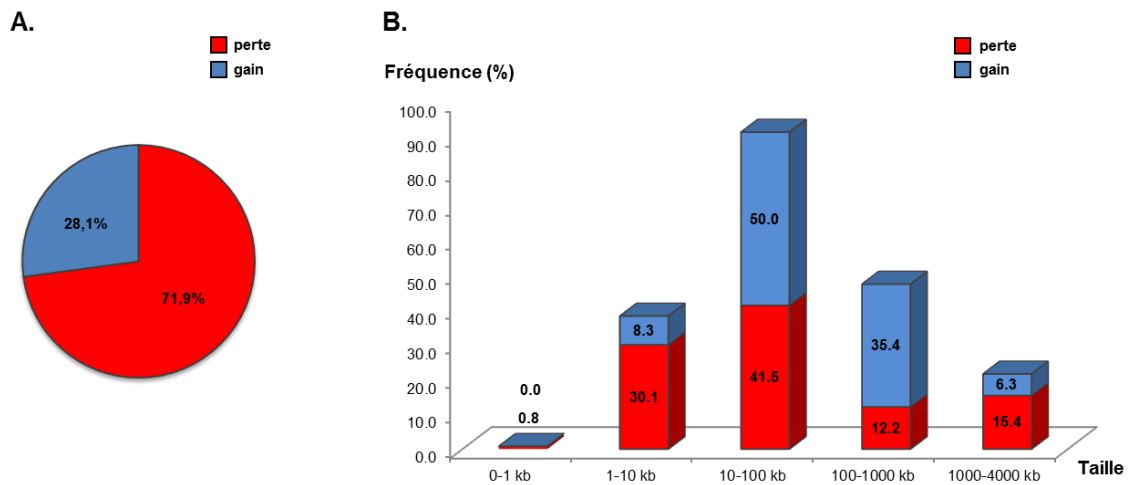
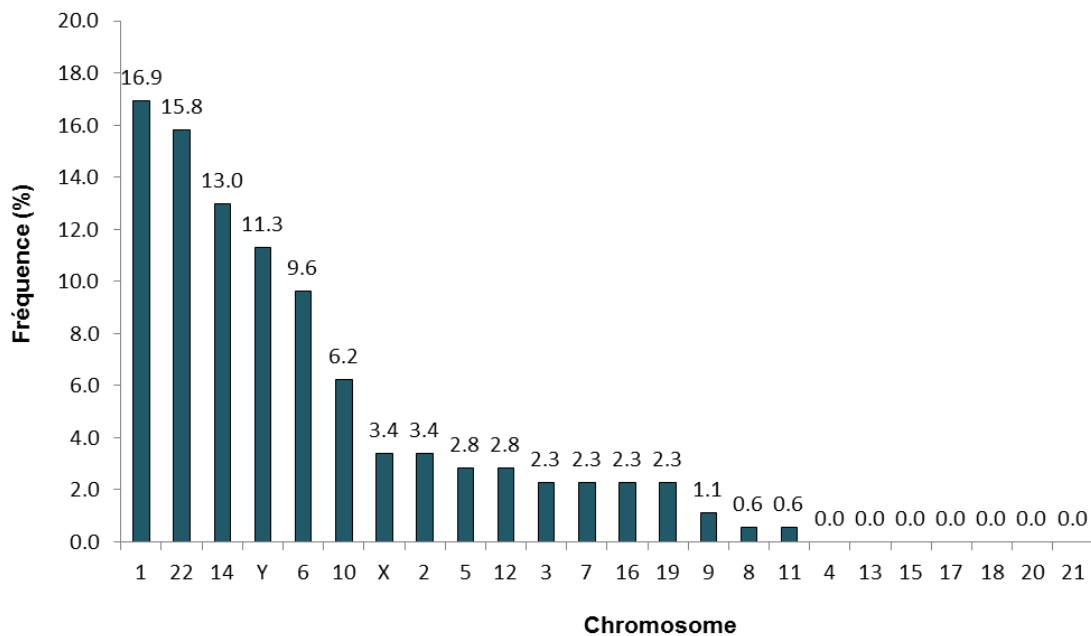


Figure 35 : Caryogramme présentant une vue d'ensemble des CNV retenus (de signification incertaine et potentiellement pathogène) des 43 patients de la cohorte. Les pertes sont représentées en rouge, et les gains en bleu.



**Figure 36** : Distribution des CNV retenus (VOUS ou PP) identifiés par CGH-array au sein de la cohorte de 43 patients azoospermes/cryptozoospermes selon le type (A) et selon la taille (B).



**Figure 37** : Fréquence par chromosome des CNV identifiés retenus (VOUS ou PP) par CGH-array au sein de la cohorte des 43 patients azoospermes/cryptozoospermes.

Les CNV retenus contiennent des gènes liés à la fonction de reproduction. Dans la méthode d'interprétation des CNV appliquée, dès lors qu'un CNV ne contenait pas de gènes, l'analyse était élargie sur une région de 2Mb (1Mb en 5' et 1Mb en 3' du CNV). Ainsi, parmi les CNV sélectionnés, 18 correspondent à des CNV dont les coordonnées sont proches d'un ou plusieurs gènes d'intérêt enrichis sur la puce à façon. Au total, 171 CNV ont été identifiés, parmi lesquels 28,1% de gains d'ADN (48 gains) et 71,9% de pertes d'ADN (123 pertes) (Figure 36A).

La répartition de tous les déséquilibres VOUS ou PP selon la taille génomique a été évaluée (Figure 36B). Les CNV sélectionnés ont une taille génomique comprise entre 0,85 kb et 3803 kb (taille moyenne de 264,7 kb). À partir de l'analyse de la figure 36, nous pouvons observer que la majorité des CNV identifiés, en gain comme en perte, ont une taille comprise entre 10 et 100 kb (41,5% des pertes et 50% des gains). Concernant les CNV inférieurs à 10 kb, 1 CNV de taille comprise entre 0-1 kb (0,85 kb) et 41 CNV de taille comprise entre 1-10 kb ont pu être identifiés grâce à la résolution augmentée de cette puce personnalisée.

Les CNV retenus ont été retrouvés principalement sur les chromosomes 1, 6, 10, 14, 22, X et Y (Figure 37). Aucun CNV d'intérêt n'a été retenu concernant les chromosomes 4, 13, 15, 17, 18, 20 et 21 (Figure 37).

Région	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)	Taille minimale (kb)	Type	Gènes d'intérêt			Récurrence (N° patient)	Référence
1p31.3	66041343	66043344	2,001	Del	<b>LEPR</b>	leptin receptor	Intron 5	<b>3</b> (P14, P31, et P40)	Khosropour <i>et al.</i> , 2016 Hodžić <i>et al.</i> , 2017
1p13.3	110228545	110240126	11,581	Dup	<b>GSTM1</b>	glutathione S-transferase mu 1	Gène entier	<b>5</b> (P7, P15, P16, P29 et P34)	Roshdy <i>et al.</i> , 2015 Jaiswal <i>et al.</i> , 2012 Salehi <i>et al.</i> , 2012
1p13.3	110230708	110240126	9,418	Del				<b>19</b> (P1, P2, P4, P6, P8-12, P14, P18, P22, P28, P30, P35, P36, P38, P41 et P43)	
1p24.3	16636068	16636918	850	Del	<b>DAZL</b>	deleted in azoospermia like	Intron6 - exon 8	<b>4</b> (P22, P35, P37 et P39)	Xu <i>et al.</i> , 2014 Nailwal <i>et al.</i> , 2017
6q25.1	152391064	152392065	1001	Del H	<b>ESR1</b>	estrogen receptor 1	Intron 8	<b>4</b> (P17, P29, P39 et P41)	Galan <i>et al.</i> , 2005 Safarinejad <i>et al.</i> , 2010 Le <i>et al.</i> , 2011
				Del				<b>10</b> (P2, P7, P8, P15, P21, P24, P27, P28, P34 et P38)	
10q26.13	123434414	123458290	23,876	Del	<b>WDR11</b>	WD repeat domain 11	/	<b>3</b> (P25, P30 et P43)	Kim <i>et al.</i> , 2011
					<b>FGFR2</b>	fibroblast growth factor receptor 2	/		Li <i>et al.</i> , 2014
10q26.3	135242075	135380518	138,443	Dup	<b>CYP2E1</b>	cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	Gène entier	<b>3</b> (P1, P5 et P37)	Nixon <i>et al.</i> , 2014
10q26.3	135354188	135380518	26,330	Dup	<b>SYCE1</b>	synaptonemal complex central element protein 1	Gène entier	<b>5</b> (P1, P5, P23, P37 et P40)	Bolcun-Filas <i>et al.</i> , 2009 Geisinger <i>et al.</i> , 2016
14q11.2	19376762	20149889	773,127	Del	<b>POTEG, POTEH</b>	POTE ankyrin domain family member G / M	Gène entier	<b>19</b> (P1, P5-7, P9, P12, P17, P19, P22, P23, P26, P28-31, P33, P37, P41 et P43)	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
16p11.2	32037473	33773163	1,735,690	Del	<b>TP53TG3, TP53TG3B, TP53TG3C, TP53TG3D</b>	TP53 target 3, B, C and D	Gène entier	<b>2</b> (P40 et P42)	Nq <i>et al.</i> , 1999
19q13.32	46270362	46271514	1,152	Del	<b>SIX5</b>	SIX homeobox 5	Exon 1- exon 2	<b>3</b> (P13, P22 et P29)	Sarkar <i>et al.</i> , 2004
22q11.1	16153099	16434984	281,885	Del	<b>POTEH</b>	POTE ankyrin domain family member H	Gène entier	<b>7</b> (P4, P12, P19, P22, et P28-30)	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
22q11.23	24347959	24395353	47,394	Del	<b>GSTT1</b>	glutathione S-transferase theta 1	Gène entier	<b>9</b> (P2, P8, P14-17, P35, P37 et P43)	Jaiswal <i>et al.</i> , 2012 Polonikov <i>et al.</i> , 2010
22q11.23	24347959	24395353	47,394	Gain			Gène entier		
Xq13.1	69731811	69734153	2,342	Del H	<b>TEX11</b>	testis expressed 11	/	<b>2</b> (P14 et P38)	Yang <i>et al.</i> , 2015 Yatsenko <i>et al.</i> , 2015.
Xq22.2	103260143	103305096	44,953	Gain	<b>H2BFWT</b>	H2B histone family member W, testis specific	Gène entier	<b>2</b> (P7 et P35)	Ying. <i>et al.</i> , 2012
Yp11.2	9641061	9650194	9,133	Del	<b>TTY22</b>	testis-specific transcript, Y-linked 22	Intron1- intron 4	<b>9</b> (P7, P11, P15, P28, P31, P34, P39, P40 et P43)	Absence de référence mais expression testiculaire spécifique
Yp11.2	9641061	9650194	9,133	Trip				<b>2</b> (P16 et P27)	
Yq11.223	25296950	25383954	87,004	Del	<b>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</b>	deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4	DAZ 1 et 4 : exon1- intron 23 DAZ2 et 3 : exon1 - intron 10	<b>2</b> (P22 et P37)	Alimardanian <i>et al.</i> , 2016

Tableau 18 : Liste des 20 CNV récurrents (région minimale ou commune). Les gènes ayant été enrichis sur ce design de CGH-array apparaissent en rouge. Les lignes grisées sont associées à des CNV élargis à 2Mb en raison de l'absence de gènes dans le CNV et se situant proche d'un gène d'intérêt enrichi sur la puce. Del : délétion; Del H : délétion homozygote; Dup : duplication; Gain : duplication et triplication; Trip : triplication.

## 2. Les CNV récurrents

Par cette étude, 20 CNV ont été retrouvés chez plusieurs patients de la cohorte (entre 2 à 19 fois) représentant des hotspots. Le tableau 18 détaille les CNV communs à plusieurs patients de la cohorte (région minimale ou commune). Ces CNV récurrents sont situés sur les chromosomes 1, 3, 6, 10, 14, 16, 19, 22, X et Y.

Parmi ces 20 CNV, 24 gènes d'intérêt ressortent des bases de données NCBI pouvant être à l'origine de l'infertilité de ces patients. Certains faisaient partie des gènes qui ont été enrichis sur la puce (*GSTM1*, *LEPR*, *DAZL*, *ESR1*, *GSTT1*, *H2BFWT*, *DAZ1/2/3/4*, *WDR11*, *FGFR2*, *SYCE1* et *SIX5*), tandis que d'autres gènes (*NOTCH2*, *CYP2E1*, *POTEG/HIM*, *TP53TG3/B/C/D* et *TTY22*) n'avaient pas été spécifiquement enrichis mais présentent un rôle potentiel dans la spermatogenèse. Des exemples de profils de CGH-array des CNV communs obtenus sont présentés figure 38.

### Chromosome 1

Parmi les 43 patients, 24 présentent un microremaniement sur le bras court du chromosome 1 dans la région 1p13.3. Ces microremaniements consistent en une perte de 9,4 kb chez 19 patients et en une duplication de 11,6 kb chez 5 patients et concernent le gène *GSTM1* codant pour la glutathion S transférase. Des études ont rapporté l'association possible entre un polymorphisme du gène *GSTM1* et des cas idiopathiques d'infertilité masculine (fréquence ~ 20-30% chez les hommes fertiles) (Tirumala Vani *et al.*, 2010, Roshdy *et al.*, 2015). Une autre étude propose également un lien entre la mutation homozygote de *GSTM1* et une augmentation du stress oxydatif (Aydemir *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent un possible effet négatif de la mutation à l'état homozygote de *GSTM1* sur la spermatogenèse (Roshdy *et al.*, 2015). D'autre part, des délétions introniques (profondes) de 2 kb du gène *LEPR* ont été retrouvées chez 3 patients de la cohorte (Figure 38A). Des variations génétiques de type SNP des gènes du récepteur de la leptine représentent des facteurs de risque pour la l'infertilité masculine (Hodzic *et al.*, 2017, Khosropour *et al.*, 2017). Ces deux variants sont tous deux couverts dans la base de données DGV.

### Chromosome 3

Quatre patients présentent une microdélétion de 0,85 kb dans la région 3p24.3. Cette microdélétion 3p24.3 est couverte sur la base de données DGV et concerne la séquence de l'intron 6 à l'exon 8 du gène *DAZL* (Figure 38B). Le gène *DAZL*, membre de la famille DAZ, joue un rôle clé dans la spermatogenèse chez l'homme. Des modifications dans la méthylation ou la séquence du gène *DAZL* sont associés au phénotype d'infertilité masculine (Xu *et al.*, 2014, Nailwal & Chauhan, 2017).



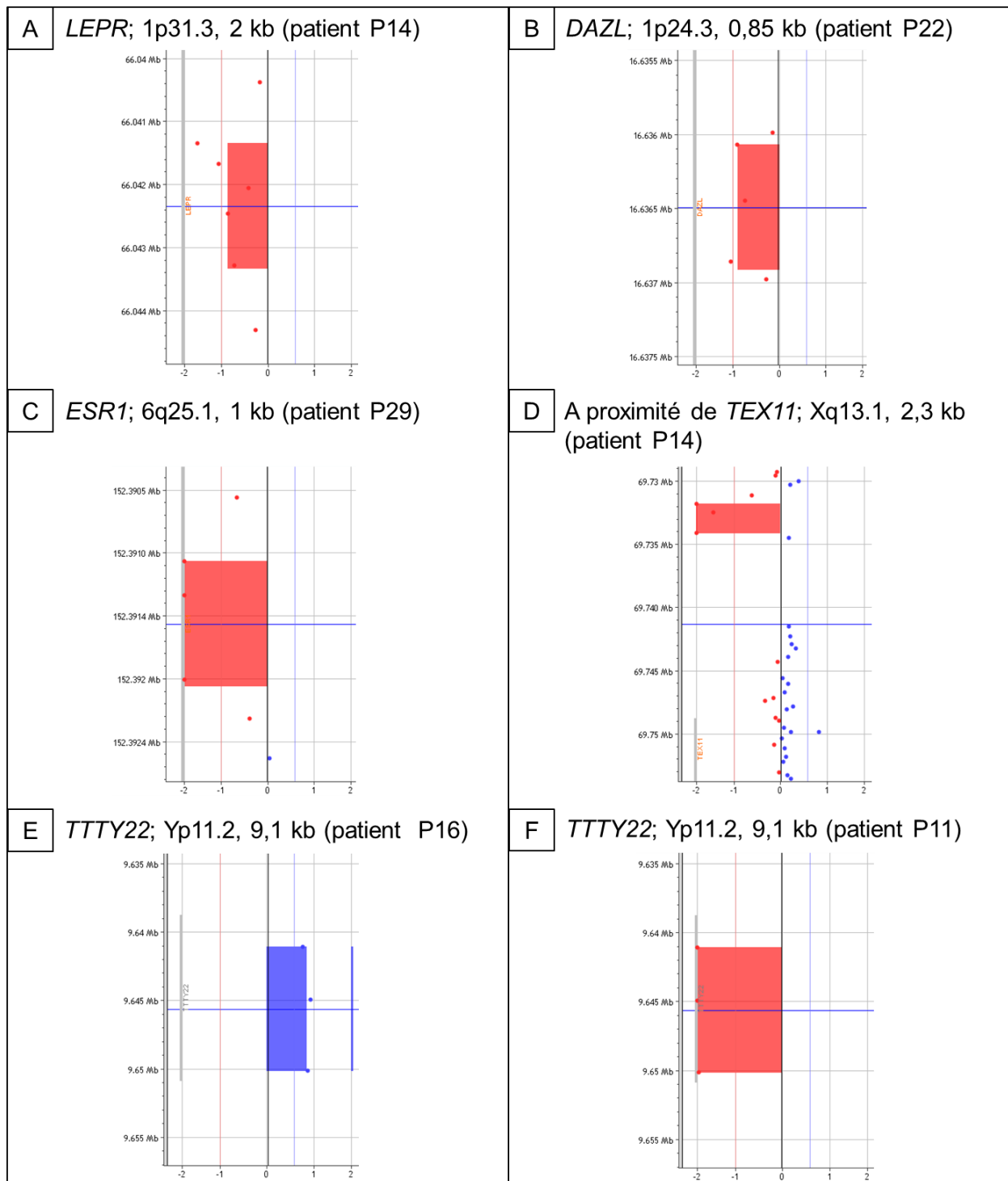


Figure 38 : Profils de CGH-array de CNV récurrents associés aux gènes *LEPR* (A), *DAZL* (B) *ESR1* (C), *TEX11* (à proximité) (D) et *TTY22* (E et F).

## Chromosome 6

Concernant le chromosome 6, 14 patients présentent une microdélétion (homozygote pour 4 patients) d'environ 1 kb dans la région 6q25.1 (Figure 38C). Elle emporte une partie intronique (intron 8, profonde) du gène *ESR1* qui est couverte dans DGV. Ce gène code pour le récepteur aux œstrogènes exprimé dans plusieurs tissus dont les testicules. La signalisation médiée par *ESR1* intervient dans la fonction de reproduction chez l'homme (Galan *et al.*, 2005). Des études quantitatives et de polymorphismes liées au gène *ESR1* ont été corrélées au phénotype d'infertilité masculine (Safarinejad *et al.*, 2010), et suggèrent que les gènes en lien avec les œstrogènes régulent principalement la concentration et la motilité des spermatozoïdes (Lee *et al.*, 2011).

## Chromosome 10

Onze patients montrent des microremaniements sur le chromosome 10, couverts dans DGV. Trois d'entre eux présentent une duplication de la région 10q26.3 de 138 kb comprenant le gène *CYP2E1*, un gène qui métabolise l'acrylamide et qui est exprimé dans les cellules germinales, en particulier au sein des spermatocytes (Nixon *et al.*, 2014). Trois patients ont en commun une duplication de 26,3kb de la région 10q26.3 contenant le gène *SYCE1*. Le gène *SYCE1* code pour une protéine composant le complexe synaptonémal, un complexe requis et indispensable pour l'appariement des chromosomes homologues lors de la prophase I de méiose (Bolcun-Filas *et al.*, 2009, Geisinger & Benavente, 2016). Chez la souris, la mutation à l'état homozygote du gène *SYCE1* perturbe le processus de synapsie des chromosomes (Bolcun-Filas *et al.*, 2009, Geisinger & Benavente, 2016). Enfin, une délétion de 23,8 kb la région 10q26.13 a été retrouvée chez 3 patients et se situe à proximité des gènes *WDR11* et *FGFR2*. Chez l'homme, *WDR11* a été associé à des cas d'hypogonadisme hypogonadotrope (Kim & Layman, 2011) et chez la souris *FGFR2* s'exprime dans les cellules germinales tout au long du développement post-natal (Li *et al.*, 2014a).

## Chromosomes 14 et 22 : famille des gènes *POTE*

Les protéines de la famille *POTE* sont exprimées dans le testicule chez l'homme au niveau des spermatocytes primaires et les spermatides impliquant un potentiel rôle dans la spermatogenèse (Ise *et al.*, 2008, Bera *et al.*, 2012). Des délétions comportant les gènes *POTEG* et *POTEM* sur le chromosome 14 (région 14q11.2) de 773 kb et le gène *POTEH* sur le chromosome 22 (région 22q11.1) de 281,8 kb ont été retrouvées respectivement chez 19 et 7 patients.

## Chromosome 16

Deux patients montrent une délétion de la région 16p11.2 comprenant les gènes *TP53TG3*, *TP53TG3B*, *TP53TG3C* et *TP53TG3D* dans leur intégralité. Le gène *TP53TG3* exprime



plusieurs transcrits par épissage alternatif. Les deux principaux transcrits (TP53TG3a et TP53TG3b) ont été démontré s'exprimant principalement dans les testicules (Ng *et al.*, 1999).

### **Chromosome 19**

Sur le chromosome 19, une perte de 1,15 kb d'une séquence de la région 19q13.32 comprenant le gène *SIX5* a été retrouvée chez 3 patients. Le gène *SIX5* est décrit chez la souris pour son rôle dans la survie cellulaire des cellules germinales et pour le processus de la spermiogenèse (Sarkar *et al.*, 2004).

### **Chromosome 22**

Des CNV récurrents ont été observés chez 18 patients différents (9 gains et 9 pertes) sur le chromosome 22 comprenant le gène *GSTT1* dans son intégralité (région 22q11.23). Quelque soit la nature du remaniement, DGV présente une couverture complète de cette région. Le gène *GSTT1*, codant pour une glutathion S transférase, pourrait présenter un bon gène candidat responsable pour l'infertilité masculine et les anomalies de la spermatogenèse (Polonikov *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'association du polymorphisme du gène *GSTT1* et du polymorphisme du gène *GSTM1*, pourraient être un facteur de risque d'infertilité masculine (voir partie III.A.3).

### **Chromosome X**

Sur le chromosome X, deux CNV différents mis en évidence conjointement, sont retrouvés chez deux patients. Le premier est une duplication de la région Xq22.2 et comporte le gène *H2BFWT* et l'autre, une délétion dans la région Xq13.1, ne contenant aucun gène mais se situant à proximité (14,6 kb) du gène *TEX11* (Figure 38D). Chez l'homme, des mutations dans ces deux gènes sont associées à azoospermie ou une oligozoospermie (Ying *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2015, Yatsenko *et al.*, 2015). Cela suggère que ces deux gènes pourraient représenter des facteurs de risque de déficience de la spermatogenèse.

### **Chromosome Y**

Les microremaniments associés à la région AZFc (Yq11.223), concernant les gènes de la famille *DAZ*, sont retrouvés à l'état délété chez 2 patients et sont décrits dans la partie III.A.5. Des variations du nombre de copie du gène *TTY22* dans la région Yp11.2 sont retrouvées sous la forme de délétions chez 9 patients et de triplication chez 2 patients. Il s'agit d'un CNV de 9,1 kb concernant la séquence du gène *TTY22* de l'intron 1 à l'intron 4 (Figure 38E et F). Ce gène code pour un ARNnc dont la fonction est inconnue avec cependant une expression au niveau testiculaire.



### 3. Association de CNV et infertilité : cas des gènes *GSTM1* et *GSTT1*

#### **Chromosome 1 et 22**

Sur les 43 patients de la cohorte, 13 patients possèdent l'association de deux microremaniements des régions 1p13.3 et 22q11.23 comprenant respectivement les gènes *GSTM1* et *GSTT1* (Tableau 18). Parmi ces 13 patients, 5 patients possèdent simultanément une délétion de ces deux régions, un patient possède une duplication de ces deux régions et les 7 patients restant présentent l'association d'une délétion et d'une duplication. Des études suggèrent que l'association de variants (SNP) dans ces deux gènes *GSTM1* et *GSTT1* est plus fréquente chez les hommes infertiles que chez les patients normospermes et serait donc un potentiel facteur de risque d'infertilité masculine (Jaiswal *et al.*, 2012, Xiong *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2013, Ying *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2013b, Song *et al.*, 2013, Kan *et al.*, 2013, Tang *et al.*, 2012, Niederberger, 2012).

Région	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)	Taille minimale (kb)	Type	Gènes d'intérêt			N°Patient	Référence
1p36.33	1627899	1663760	35,861	Del	<i>CDK11A</i> (ou <i>CDC2L2</i> )	cyclin dependent kinase 11A	Gène entier	P21	Jehan <i>et al.</i> , 2007
1p12p11.2	120556740	120622581	65,841	Del	<i>NOTCH2</i>	notch 2	Intron 2	P25	Dirami <i>et al.</i> , 2001
2q21.1	130792331	131144665	352,334	Dup	<i>POTEF</i>	POTE ankyrin domain family member F	Gène entier	P38	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
5p13.3	32111197	32164220	53,023	Dup	<i>GOLPH3</i>	golgi phosphoprotein 3	Intron 1 - exon 4	P21	Frappalo <i>et al.</i> , 2017
5q31.3	139724035	139772301	48,266	Dup	<i>HBEGF</i>	heparin binding EGF like growth factor	Exon1 – intron 2	P33	Dadoune <i>et al.</i> , 2005
7q22.1	101870343	101895138	24,795	Dup	<i>CUX1</i>	cut like homeobox 1	Exon 21- exon 24-UTR	P10	Kroll <i>et al.</i> , 2011
9p21.3	22426207	22481374	55,167	Del	<i>DMRTA1</i>	DMRT like family A1	Gène entier	P16	Xu <i>et al.</i> , 2013
10p12.1	27608561	27705755	97,194	Del	<i>PTCHD3</i>	patched domain containing 3	Gène entier	P12	Fan <i>et al.</i> , 2007
10q26.3	135242075	135378761	136,686	Del	<i>CYP2E1</i>	cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	Gène entier	P16	Nixon <i>et al.</i> , 2014
12p13.31	7985506	8074403	88,897	Dup	<i>SLC2A3</i> (ou <i>GLUT3</i> )	solute carrier family 2 member 3	Gène entier	P29	Kishimoto <i>et al.</i> , 2015
12p13.31	8002719	8118036	115,317	Dup	<i>SLC2A3</i> (ou <i>GLUT3</i> )	solute carrier family 2 member 3, 14	Gène entier	P24	Kishimoto <i>et al.</i> , 2015
					<i>SLC2A14</i>		Exon 1 – exon 6		
14q11.2	19376762	19728700	351,938	Dup	<i>POTEG</i>	POTE ankyrin domain family member G	Gène entier	P42	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
14q11.2	19376762	19728700	351,938	Dup	<i>POTEG</i> ,	POTE ankyrin domain family member G	Gène entier	P42	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
14q11.2	19474772	20421677	946,905	Dup	<i>POTEG</i> , <i>POTEM</i>	POTE ankyrin domain family member G, M	Gène entier	P18	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
14q11.2	19663407	20446000	782,593	Del	<i>POTEM</i>	POTE ankyrin domain family member M	Gène entier	P14	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
14q11.2	19709805	20421677	711,872	Dup	<i>POTEM</i>	POTE ankyrin domain family member M	Gène entier	P36	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
16p11.2	32396848	32826268	429,420	Dup	<i>TP53TG3</i>	TP53 target 3	Gène entier	P15	Nq <i>et al.</i> , 1999
19q13.2	41847953	41848955	1,002	Dup	<i>TGFB1</i>	transforming growth factor beta 1	Intron 4 - intron 3	P14	Ingman <i>et al.</i> , 2007 Zhang <i>et al.</i> , 2004
22q11.1	16114195	16434984	320,789	Dup	<i>POTEH</i>	POTE ankyrin domain family member H	Gène entier	P42	Ise <i>et al.</i> , 2008 Bera <i>et al.</i> , 2012
Xq21.1	76849521	76851379	1,858	Del	<i>ATRX</i>	ATRX, chromatin remodeler	Intron 25	P21	Tang <i>et al.</i> , 2011

**Tableau 19** : Liste des CNV rares (région minimale ou commune) contenant des gènes connus pour avoir une expression testiculaire chez l'homme et/ou la souris. Les gènes ayant été enrichis sur ce design de CGH-array apparaissent en rouge. Del : délétion; Dup : duplication.

Région	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)	Taille minimale (kb)	Type	Gènes d'intérêt			N° Patient	Référence
2p24.1	21231620	21235520	3,900	Del	<i>APOB</i>	apolipoprotein B	Exon 26	P8	Peterlin <i>et al.</i> , 2006 Huang <i>et al.</i> , 1995
2p23.3	25116942	25118931	1,989	Del	<i>ADCY3</i>	adenylate cyclase 3	Intron 2	P15	Livera <i>et al.</i> , 2005
2p13.1	73518645	73520816	2,171	Del	<i>EGR4</i>	early growth response 4	Exon 1 - 2	P29	Tourtellotte <i>et al.</i> , 1999 Hadziselimovi <i>et al.</i> , 2009
2q13	110862477	110980905	118,428	Del	<i>NPHP1</i>	nephrocystin 1	Exon 12 - 20	P42	Devi, AN. <i>et al.</i> , 2015 Dong <i>et al.</i> , 2015
5p15.31	7179549	7193123	13,574	Del	<i>MTRR</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	/	P27	Kurzawski <i>et al.</i> , 2015
5p15.31	8705735	8747060	41,325	Del			/	P27	
6p21.33	31285645	31307271	21,626	Tripl	<i>CYP21A2</i>	cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2	/	P16	Sumida <i>et al.</i> , 2011
					<i>FKBPL</i>	FK506 binding protein like	/		Sunnotel <i>et al.</i> , 2010
					<i>BAG6 (ou BAT3)</i>	BCL2 associated athanogene 6	/		Sasaki <i>et al.</i> , 2008
					<i>MSH5</i>	mutS homolog 5	/		Xu <i>et al.</i> , 2010
					<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	/		Mostafa <i>et al.</i> , 2016
6p21.32	32371813	32543492	171,679	Del	<i>BTNL2</i>	butyrophilin like 2	Exon 1 – intron 2	P38	Zhao <i>et al.</i> , 2012
6q22.31	121170324	121197112	26,788	Del	<i>GJA1 (ou Cx43)</i>	gap junction protein alpha 1	/	P37	Roscoe <i>et al.</i> , 2001
7q32.1	128147101	128237255	90,154	Dup	<i>FAM71F1</i>	family with sequence similarity 71 member F1	/	P34	Malcher <i>et al.</i> , 2013
					<i>LEP</i>	leptin	/		Khosropour <i>et al.</i> , 2017 Hodžić <i>et al.</i> , 2017
					<i>FSCN3</i>	fascin actin-bundling protein 3	/		Malcher <i>et al.</i> , 2013
7q36.1	150761810	150774667	12,857	Del	<i>SLC4A2 (ou AE2)</i>	solute carrier family 4 member 2	Exon 4 - 23	P29	Medina <i>et al.</i> , 2003 Alper <i>et al.</i> , 2009
10p13	14988400	15070572	82,172	Dup	<i>MEIG1</i>	meiosis/spermiogenesis associated 1	Gène entier	P13	Teves <i>et al.</i> , 2013 Salzberg <i>et al.</i> , 2010
11p15.1	18473655	18476332	2,677	Del	<i>LDHC</i>	lactate dehydrogenase C	/	P4	Odet <i>et al.</i> , 2008
12q21.32	88189580	88201641	12,061	Del	<i>KITLG</i>	KIT ligand	/	P6	Galan <i>et al.</i> , 2006 Cheng <i>et al.</i> , 2013
22q11.23	24282100	24297160	15,060	Del	<i>GSTT1</i>	glutathione S-transferase theta 1	/	P37	Jaiswal <i>et al.</i> , 2012 Polonikov <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 20** : Liste des CNV rares (région minimale ou commune) contenant des gènes rapportés en lien avec l'infertilité masculine chez l'homme et/ou la souris. Les gènes ayant été enrichis sur ce design de CGH-array apparaissent en rouge. Les lignes grisées sont associées à des CNV élargis à 2Mb en raison de l'absence de gènes et proches d'un gène d'intérêt enrichi sur la puce. Del : délétion; Dup : duplication; Tripl : triplification.



Cyto-bande	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)	Taille minimale (kb)	Type	Gènes d'intérêt			N° Patient	Référence
1p13.2	115324971	115387883	62,912	Del	<i>SYCP1</i>	synaptonemal complex protein 1	/	P35	De vries <i>et al.</i> , 2005 Zhang <i>et al.</i> , 2006
2p22.3	32632139	33326552	694,413	Dup	<i>TTC27</i>	tetratricopeptide repeat domain 27	Gène entier	P6	Hughes <i>et al.</i> , 2014
2p16.1	57409825	57446854	37,029	Trip	<i>FANCL</i>	Fanconi anemia complementation group L	/	P36	Zhao <i>et al.</i> , 2005
5q23.3	129253801	129575236	321,435	Dup	<i>CHSY3</i>	chondroitin sulfate synthase 3	Intron 2 – exon 3	P20	Lian <i>et al.</i> , 2015
7p21.3	13111912	13123735	11,823	Del	<i>ARL4A</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 4A	/	P29	Schürmann <i>et al.</i> , 2002
8p21.2	24976776	24990135	13,359	Del H	<i>GNRH1</i>	gonadotropin releasing hormone 1	/	P17	Maione <i>et al.</i> , 2013
9p24.1	5308149	5335103	26,954	Del	<i>RLN1</i>	relaxin 1	UTR	P12	Feng <i>et al.</i> , 2005
10q26.3	135242075	135378761	136,686	Del	<i>SYCE1</i>	synaptonemal complex central element protein 1	Intron 2 – exon 14	P16	Bolcun-Filas <i>et al.</i> , 2009 Geisinger <i>et al.</i> , 2016
12q24.13	112873331	112879940	6,609	Del	<i>PTPN11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	Intron 1	P11	Puri <i>et al.</i> , 2016
16p11.2	28866872	28877999	11,127	Del	<i>SH2B1</i>	SH2B adaptor protein 1	Exon 2 - 4	P29	Maures <i>et al.</i> , 2007
22q12.2	30932196	30962474	30,278	Dup	<i>GAL3ST1</i>	galactose-3-O-sulfotransferase 1	Gène entier	P10	Suzuki <i>et al.</i> , 2010
22q13.2	41319315	41510816	191,501	Dup	<i>RBX1</i>	ring-box 1	Gène entier	P16	Sasagawa <i>et al.</i> , 2003
Xq28	148878834	149029121	150,287	Trip	<i>MAGEA8</i>	MAGE family member A8	Gène entier	P29	Hou <i>et al.</i> , 2016

**Tableau 21** : Liste des CNV rares (région minimale ou commune) contenant des gènes rapportés en lien avec certains processus de la spermatogenèse, l'hypogonadisme hypogonadotrope, l'obésité et des anomalies testiculaires chez l'homme et/ou la souris. Les gènes ayant été enrichis sur ce design de CGH-array apparaissent en rouge. Les lignes grisées sont associées à des CNV élargis à 2Mb en raison de l'absence de gènes et proches d'un gène d'intérêt enrichi sur la puce. Del : délétion; Del H : délétion homozygote; Dup : duplication; Tripl : triplication.

#### 4. Identification de CNV isolés au sein de la cohorte

Parmi les 74 CNV retenus, 53 CNVs classés comme VOUS ou PP, pouvant être à l'origine d'un défaut de la spermatogenèse, ne sont pas récurrents et sont dispersés dans le génome. On les retrouve répartis sur les chromosomes 1, 2, 5 à 12, 14, 16, 19, 22, X et Y (Figure 35 et Tableaux 19 à 21). Des exemples de profils de CGH-array des CNV isolés obtenus sont présentés figure 39.

#### CNV riches en gène

D'après les tableaux 19, 20 et 21, nous constatons que 41 CNV contiennent 1 ou plusieurs gènes. Ces tableaux présentent les CNV retenus concernant des gènes s'exprimant au niveau testiculaire (Tableau 19), des gènes en lien avec l'infertilité masculine chez l'homme ou la souris (Tableau 20), et enfin des gènes impliqués dans des processus particuliers de la spermatogenèse ou encore d'autres pathologies en lien avec l'infertilité (Tableau 21). Parmi eux, 6 sont des microremaniements des régions AZF du chromosome Y et sont détaillés dans la partie III.A.5. Pour les 35 CNV restants, qui concernent les chromosomes 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 19, 22 et X, 18 gènes ont été retenus du fait de leur expression testiculaire décrite chez l'homme (*CDK11A*, *POTEF*, *HBEGF*, *PTCHD3*, *POTEG*, *POTEM*, *TP53TG3*, *TGFB1*, *POTEH* et *ATRX*), la souris (*NOTCH2*, *CUX1*, *CYP2E1*, *PTCHD3*, *SLC2A3* et *SLC2A14*), le rat (*SLC2A3* et *ATRX*), le poisson zèbre (*DMRTA1*) ou encore la drosophile (*GOLPH3*) (Ng *et al.*, 1999, Dirami *et al.*, 2001, Wu & Freeze, 2002, Zhang *et al.*, 2004, Dadoune *et al.*, 2005, Fan *et al.*, 2007, Jehan *et al.*, 2007, Ingman & Robertson, 2007, Ise *et al.*, 2008, Kroll *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2011, Bera *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2013a, Nixon *et al.*, 2014, Kishimoto *et al.*, 2015, Frappaolo *et al.*, 2017) (Tableau 19 et Figure 39A et B). La majorité d'entre eux s'exprime tout particulièrement dans les cellules germinales. Le gène *TP53TG3* présente quant à lui une expression spécifique au niveau du testicule (Ng *et al.*, 1999).

Concernant les autres CNV, 7 délétions et une duplication sont associées à des gènes enrichis sur la puce mais également 3 délétions, 4 duplications et une triplification comprenant des gènes non enrichis dans ce design. Le gène *SH2B1* est décrit chez la souris associé aux phénotypes d'obésité et d'infertilité lorsque son expression est perturbée (Maures *et al.*, 2007). Les gènes *EGR4*, *APOB*, *NPHP1*, *ADCY3*, *BTNL2*, *SLC4A2* et *MEIG1* ont été décrits dans la littérature comme corrélés au phénotype d'infertilité chez l'homme et chez la souris (Figure 39C, D et E). D'autres gènes ont quant à eux été sélectionnés sur la base de leur implication (homme, souris, poulet et *C. elegans*) dans des processus fondamentaux de la spermatogenèse tels que la méiose (*SYCE1*, *GAL3ST1* et *RBX1*), la différenciation (*TTC27* et *CHSY3*), la prolifération et la survie des cellules germinales (*PTPN11* et *MAGEA8*) (Sasagawa *et al.*, 2003, Bolcun-Filas *et al.*, 2009, Suzuki *et al.*, 2010, Hughes *et al.*, 2014, Lian *et al.*, 2015, Geisinger & Benavente, 2016, Hou *et al.*, 2016, Puri & Walker, 2016). Enfin, peu de travaux décrivent la fonction du gène *RLN1* et son lien avec l'infertilité masculine,

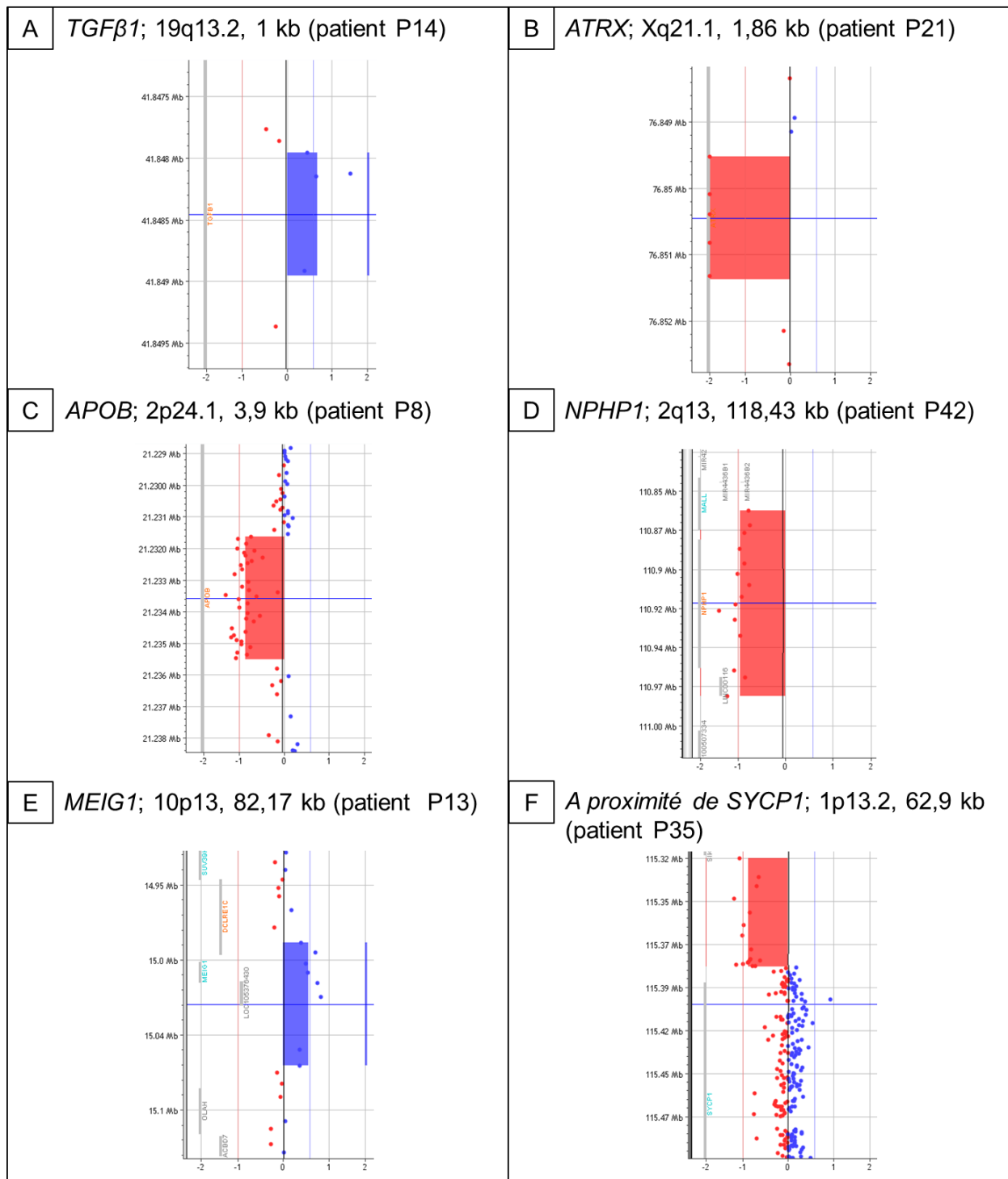


Figure 39 : Profils de CGH-array de CNV récurrents associés aux gènes *TGFβ1* (A), *ATRX* (B) *APOB* (C), *NPHP1* (D) *MEIG1* (E) et *SYCP1* (à proximité) (F).

néanmoins, une étude rapporte des anomalies testiculaires chez la souris invalidée pour ce gène (Feng *et al.*, 2005).

### **CNV dépourvus de gènes, élargis à 2Mb (hors chromosome Y, voir partie III.A.5)**

Parmi les CNV rares, 12 CNV concernent des déserts géniques mais se situent à distance d'un ou plusieurs gènes d'intérêt enrichis sur la puce à façon (Tableaux 20 et 21). Certains ont été clairement associés à des cas d'infertilité masculine chez l'homme (*MTRR*, *CYP21A2*, *FKBPL*, *MSH5*, *TNF*, *FAM71F1*, *LEP*, *FSCN3*, *KITLG* et *GSTT1*) ou chez la souris (*BAG6*, *GJA1* et *LDHC*) (Roscoe *et al.*, 2001, Galan *et al.*, 2006, Odet *et al.*, 2008, Sasaki *et al.*, 2008, Polonikov *et al.*, 2010, Sunnotel *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2010, Sumida *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2013, Malcher *et al.*, 2013, Kurzawski *et al.*, 2015, Mostafa & Taymour, 2016, Hodzic *et al.*, 2017, Khosropour *et al.*, 2017). Le gène *GNRH1* est impliqué dans des cas d'hypogonadisme hypogonadotrope (Maione *et al.*, 2013). Enfin, d'autres études ont rapporté l'implication chez la souris de trois de ces gènes dans des processus fondamentaux de la spermatogenèse tels que la méiose (*SYCP1*) (Figure 39F), la prolifération et le développement des cellules germinales (*FANCL* et *ARL4A*) (Schurmann *et al.*, 2002, de Vries *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2006).

#### **5. Microremaniements des régions AZF**

Sur les 43 patients, 9 patients présentent des microremaniements des régions AZF du bras long du chromosome Y. Deux d'entre eux ont une duplication d'une région AZF, un patient a une triplication d'une région AZF, un patient présente une duplication à proximité de gènes d'intérêt dans la région AZFa et cinq autres présentent des microdélétions des régions AZF classées potentiellement pathogènes.

Une première duplication de 8,7 kb se situe à proximité des gènes *USP9Y* (à 0,37 Mb) et *UTY* (à 0,92 Mb), décrits dans la littérature comme appartenant à la région AZFa. Des microdélétions de la région AZFa, et donc des perturbations de l'expression des gènes qu'elle contient, sont associées à une absence de cellules germinales. C'est le syndrome de Sertoli Cell Only (Foresta *et al.*, 2000, Ravel *et al.*, 2006). Deux autres duplications et une triplication concernent la région AZFc (2,7 Mb, 2,8 Mb et 3,8 Mb) et ont toutes en commun les gènes de la famille *DAZ*, indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse, ainsi que le gène *CDY* (Tableau 22) (Ravel *et al.*, 2006). Deux de ces duplications incluent notamment des gènes de la famille *BPY2* (*BPY2A*, *BPY2B* et *BPY2C*) et les gènes de la famille *CDY1* (*CDY1A* et *CDY1B*). Ces gènes se situent au niveau de la région AZFc. Des duplications partielles de la région AZFc ont été rapportées associées à une infertilité masculine dans une population de la province du Yunnan, en Chine (Ye *et al.*, 2013).

Parmi les 5 microdélétions observées, toutes correspondent à des microdélétions partielles de la région AZFc. Ces microdélétions de la région AZFc ont été identifiées malgré une recherche de microdélétions des régions AZF, effectuée par PCR dans le cadre du bilan d'infertilité, qui s'est avérée négative. La première séquence de 2,8 Mb (Yq11.223q11.23) couvre une partie de la région AZFc constituée des gènes des familles *DAZ*, *BPY* et *CDY*, la seconde séquence de 979 kb

Région AZF	Région	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)	Taille minimale (kb)	Type	Gène	Gène d'intérêt	N° Patient	Référence
AZFa	Yq11.21	14430167	14438882	8,715	Trip	<i>USP9Y, DDX3Y, UTY</i>	<i>USP9Y</i> ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked  <i>UTY</i> ubiquitously transcribed tetrapeptide repeat containing, Y-linked	P18	Foresta <i>et al.</i> , 2000 Ravel <i>et al.</i> , 2006
AZFb	Yq11.223	24484991	24514393	29,402	Del	<i>RBMY1F</i>	<i>RBMY1F</i> RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member F	P14	Halder <i>et al.</i> , 2017
AZFc	Yq11.223-q11.23	25317410	28071741	2,754,331	Dup	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4, CDY1</i>	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4  <i>CDY1</i> chromodomain Y-linked 1	P13	Ye <i>et al.</i> , 2013
AZFc	Yq11.223	25296950	25383954	87,004	Del	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i>	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4	P22 et P37	Sen <i>et al.</i> , 2015 Ravel <i>et al.</i> , 2006
AZFc	Yq11.223-q11.23	25296950	26275993	979,043	Del	<i>DAZ4, DAZ1, DAZ3, DAZ2, TTTY3B, TTTY3, CDY1, CDY1B</i>	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4  <i>CDY1, CDY1B</i> chromodomain Y-linked 1, 1B	P32	Sen <i>et al.</i> , 2015 Ravel <i>et al.</i> , 2006
AZFc	Yq11.223-q11.23	25296950	28071741	2,774,791	Del	<i>DAZ4, DAZ1, DAZ3, DAZ2, TTTY3B, TTTY3, CDY1, CDY1B, CSPG4P1Y, GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y, TTTY17B, TTTY17A, TTTY17C, TTTY4C, TTTY4B, TTTY4, BPY2B, BPY2, BPY2C</i>	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4  <i>CDY1, CDY1B</i> chromodomain Y-linked 1, 1B  <i>BPY2, BPY2B, BPY2C</i> basic charge, Y-linked, 2, 2B, 2C	P35	Sen <i>et al.</i> , 2015 Ravel <i>et al.</i> , 2006
AZFc	Yq11.223-q11.23	25296950	28071741	2,774,791	Trip	<i>DAZ4, DAZ1, DAZ3, DAZ2, TTTY3B, TTTY3, CDY1, CDY1B, CSPG4P1Y, GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y, TTTY17B, TTTY17A, TTTY17C, TTTY4C, TTTY4B, TTTY4, BPY2B, BPY2, BPY2C</i>	<i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4  <i>CDY1, CDY1B</i> chromodomain Y-linked 1, 1B  <i>BPY2, BPY2B, BPY2C</i> basic charge, Y-linked, 2, 2B, 2C	P39	Ye <i>et al.</i> , 2013
AZFc	Yq11.223-q11.23	24659449	28463192	3,803,743	Dup	<i>PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17A, TTTY17C, TTTY4C, TTTY4B, TTTY4, BPY2B, BPY2, BPY2C, DAZ4, DAZ1, DAZ3, DAZ2, TTTY3B, TTTY3, CDY1, CDY1B, CSPG4P1Y, GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y</i>	<i>BPY2, BPY2B, BPY2C</i> basic charge, Y-linked, 2, 2B, 2C  <i>DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4</i> deleted in azoospermia 1, 2, 3 and 4  <i>CDY1, CDY1B</i> chromodomain Y-linked 1, 1B	P20	Ye <i>et al.</i> , 2013

Tableau 22 : Liste des CNV inclus dans les régions AZF du chromosome Y, détectés par CGH-array à façon mais pas par PCR. Les gènes ayant été enrichis sur ce design de CGH-array apparaissent en rouge. Les lignes grisées sont associées à des CNV élargis à 2 Mb en raison de l'absence de gènes et proches d'un gène d'intérêt enrichi sur la puce. Del : délétion; Dup : duplication; Trip : triplication.

(Yq11.223q11.23) comprend les gènes des familles *DAZ* et *CDY* et la troisième séquence de 87 kb (Yq11.223) concerne les gènes de la famille *DAZ*. Ces délétions partielles de la région AZFc sont responsables d'une atteinte de la spermatogenèse allant de l'azoospermie à l'oligozoospermie modérée (Ravel *et al.*, 2006, Sen *et al.*, 2015). Enfin, une plus petite délétion partielle, de taille 29,4 kb, a été observée chez un individu azoosperme dans la région AZFb (Yq11.223) entraînant la perte du gène *RBMY1F*. Des microdélétions plus larges incluant le gène *RBMY1F* ont été rapportées associées à un arrêt de maturation des cellules germinales (Halder *et al.*, 2017).

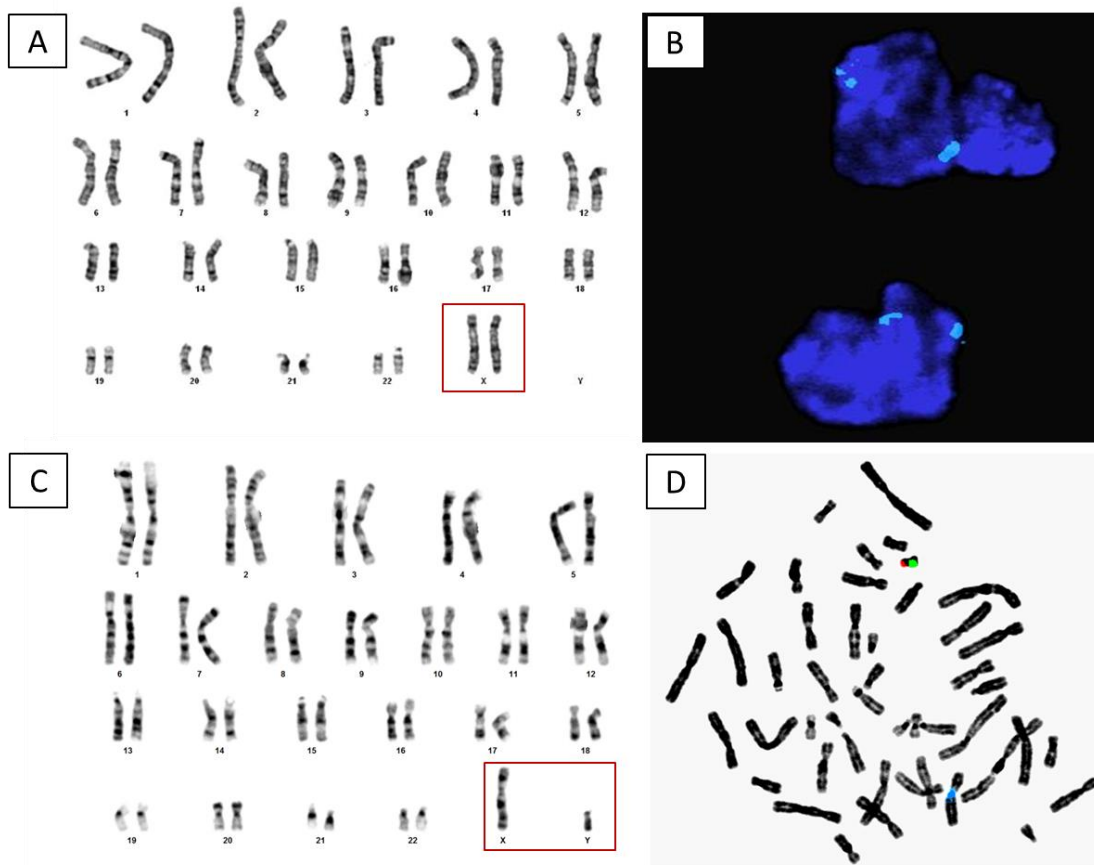


Figure 40 : Analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire des patients 2 (A et B) et 3(C et D). (A) Caryotype standard en bande G révélant un caryotype 46,XX. (B) Analyse par FISH sur frottis buccal utilisant une sonde centromérique du chromosome X (bleu), des sondes complémentaires à l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y (vert) et une sonde ciblant le gène *SRY* (rouge). (C) Caryotype standard en bande G révélant un caryotype 46,XY. (D) Analyse par FISH sur sang utilisant une sonde centromérique du chromosome X (bleu), des sondes complémentaires à l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y (vert) et une sonde ciblant le gène *SRY* (rouge).

## B. Contribution à l'identification de microremaniements chromosomiques cryptiques à l'origine d'un désordre du développement sexuel

La fonction de reproduction dépend du bon déroulement de plusieurs événements : développement embryonnaire, méiose, gamétogenèse, contrôles neuro-endocriniens et endocriniens du fonctionnement des gonades. Chez l'homme, plusieurs gènes impliqués dans le déterminisme sexuel ont été identifiés. Cependant, de nombreux cas d'hommes présentant un désordre du développement sexuel (DSD) n'ont pas de cause génétique identifiée (cf introduction, chapitre 1.V).

Dans le cadre de ce travail de thèse, la puce à façon a également été enrichie au niveau de 87 gènes impliqués dans le déterminisme sexuel (voir Annexe 3). Deux patients de sexe phénotypique masculin présentant un désordre du développement sexuel ont été analysés à l'aide de cette puce. L'observation de patients présentant un tel phénotype est très rare, ce qui justifie le petit nombre de patients recrutés.

### 1. Patient 2 : 46,XX-SRY-négatif DSD

Les résultats relatifs à l'analyse chromosomique moléculaire du patient 2 ont été présentés dans l'article 2. L'analyse chromosomique montre un caryotype à 46 chromosome 46,XX avec absence du gène *SRY* (Figure 40 A et B). Il n'a pas été mis en évidence de déséquilibres chromosomiques significatifs par CGH-array au format 1M et avec design personnalisé. En revanche, les résultats préliminaires du séquençage du génome entier a montré un variant rare d'intérêt dans le gène codant pour l'AMH (cf article 2). Le reste de l'analyse bioinformatique des résultats d'un séquençage est en cours.

### 2. Patient 3 : 46,XY-SRY positif DSD

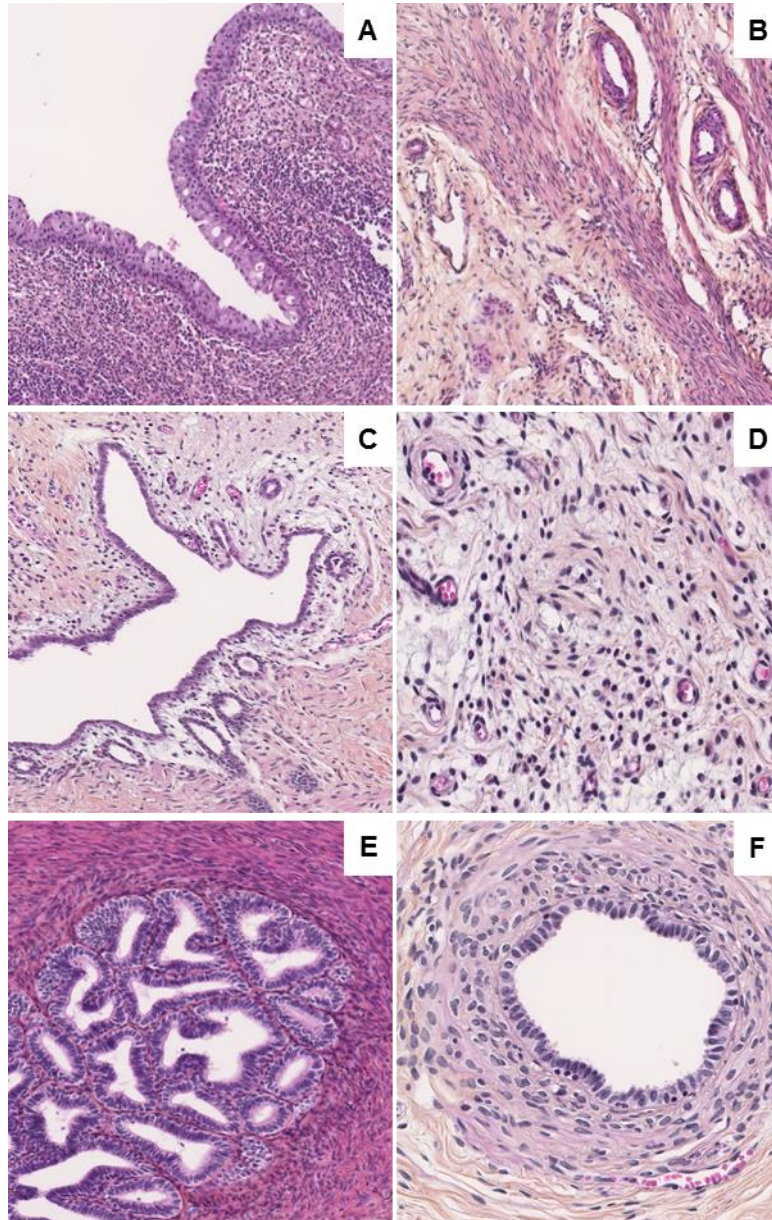
#### 2.1. Analyses cytogénétiques conventionnelles et moléculaires

Le patient 3 présente un désordre du développement sexuel caractérisé par un développement gonadique et génital anormal. Le caryotype sanguin de ce patient a été réalisé et a révélé un caryotype masculin normal 46,XY (Figure 40C). Le gène *SRY* est présent dans le génome du patient comme le démontre l'hybridation *in situ* fluorescente (Figure 40D). En effet, un signal associé au gène *SRY* est visible sur métaphase, de même que le signal relatif à hétérochromatine du chromosome Y et au centromère du chromosome X, confirmant la formule chromosomique du caryotype.

#### 2.2. CGH-array à façon pangénomique et ciblée infertilité et DSD

La CGH-array à façon a mis en évidence un déséquilibre chromosomique. Il s'agit d'une délétion de 12,3 kb (chr16:78371694-78384009, GRCh17) de la région chromosomique 16q23.1 incluant une séquence intronique (intron 5) du gène *WWOX*. Cette région est couverte sur DGV.





**Figure 41** : Analyse histologique post-ablation d'un reliquat müllérien et de la gonade droite chez le patient 3. **(A)** vagin, **(B)** utérus, **(C)** trompe utérine, **(D)** stroma ovarien, **(E)** vésicules séminales, **(F)** structure canalaire de type épидидymaire.

Néanmoins, le gène *WFOX* semble être candidat pour expliquer cette discordance entre sexe chromosomique, sexe gonadique et sexe phénotypique. En effet, il joue d'une part un rôle dans la synthèse des stéroïdes sexuels et il régule d'autre part une voie de signalisation clé de la différenciation sexuelle. Une étude rapporte un phénotype similaire à notre patient 3 et associé à une délétion multi-exons du gène *WFOX*. La description est celle d'un désordre du développement sexuel chez un individu 46,XY-SRY positif avec présence d'un vagin et d'un utérus sous-développé, d'un tissu gonadique indifférencié et d'un testicule immature (White *et al.*, 2012).

### 2.3. Chirurgie et examen histologique des tissus prélevés

L'analyse histologique des tissus prélevés lors de la chirurgie, a montré pour l'une des deux cavités un épithélium malpighien non kératinisé représentatif d'un vagin, et pour l'autre cavité, un épithélium transitionnel malpighien non kératinisé et glandulaire, soit les caractéristiques d'un utérus (Figure 41A et B). La présence d'une trompe utérine aux côtés de l'utérus a été observée et analysée (Figure 41C). Son analyse histologique révèle un épithélium cilié tubaire régulier confirmant la présence d'une trompe utérine. L'analyse de la bandelette fibreuse a révélé la présence d'un stroma ovarien comprenant des cellules fusiformes et tubules immatures, et une absence de cellules germinales (Figure 41D). Des structures glandulaires de type vésicule séminale à proximité du vagin ainsi que des structures canalaire de type épидидymaire au sein de la bandelette fibreuse (Figure 41E et F).

A l'occasion d'une chirurgie reconstructrice à l'âge de 4 ans visant à retirer un reliquat müllérien sous coelioscopie (vagin et utérus), un caryotype a été réalisé sur différents tissus (vagin, utérus, bandelette fibreuse, fibroblaste) du patient 3. Tous les tissus ont montré un caryotype 46,XY.

Ainsi, l'analyse par puce CGH-array personnalisée a permis de mettre en évidence un variant d'intérêt de très petite taille chez l'un de nos deux patients DSD. Ce variant est une délétion intronique touchant le gène *WFOX* qui pourrait potentiellement expliquer le phénotype rencontré chez le patient 3.



## **DISCUSSION**



## I. Génération de cellules iPS

### A. Caractérisation cytogénétique et moléculaire des patients 1 et 2

Pour cette partie du travail, nous avons sélectionné deux patients d'intérêt, l'un porteur d'un remaniement chromosomique complexe (Patient 1) et l'autre présentant une discordance entre le sexe génétique et le sexe phénotypique (Patient 2). La première étape a consisté en la caractérisation cytogénétique conventionnelle et moléculaire de ces deux patients.

#### 1. Caractérisation moléculaire d'un remaniement chromosomique complexe

Pour le patient 1, nous avons dans un premier temps mis en évidence par la réalisation des techniques de caryotype et de FISH un remaniement chromosomique complexe survenu *de novo* impliquant cinq points de cassure suite à l'insertion d'un segment d'un chromosome 12 dans le bras court d'un chromosome 7, et l'inversion péracentrique du chromosome 12 structurellement réarrangé. Les analyses par FISH nous ont permis d'estimer la localisation des points de cassure. La cartographie en gènes de ces régions a identifié un gène candidat, *SYCP3*, pouvant être à l'origine de l'infertilité du patient. L'analyse par CGH-array aux formats 1M ou avec design personnalisé, n'a pas permis de mettre en évidence de variants d'intérêt aux points de cassure estimés ou ailleurs dans le génome.

Dans un second temps, le séquençage de type mate-pair des points de cassure estimés par FISH a confirmé et affiné leur position. Néanmoins, le degré de complexité de ce RCC avait été sous-estimé. En effet, deux points de cassure supplémentaires sur le bras long du chromosome 12 dans la région 12p23.2 ont été mis en évidence au séquençage. Outre un plus grand nombre de points de cassure, la présence d'un petit déséquilibre (désert génique) aux points de cassure de l'insertion du chromosome 12 dans le bras court du chromosome 7 (chr7 :10257000-10656000) a été constaté de même qu'une autre délétion (chr7 :11791000-11801000) en amont dans la région 7p21.3. Par ailleurs, le séquençage mate-paire nous a permis d'apprendre que la séquence du gène *SYCP3* n'était pas interrompue par l'un des points de cassure mais que celui-ci s'était réalisé non loin de la séquence du gène, à une distance de 300 kb en 3'.

La rareté de tels évènements chromosomiques rend difficile leur analyse clinique. Les réarrangements chromosomiques complexes sont souvent associés à un déficit intellectuel, des anomalies congénitales, des avortements récurrents et une infertilité (Borg *et al.*, 2005). Néanmoins, 70% des sujets porteurs d'un RCC présentent un phénotype normal (Gatinois *et al.*, 2014). L'observation d'un tel réarrangement chromosomique est généralement faite lors d'examens génétiques réalisés à la suite d'antécédents de fausses-couches à répétition, d'une consultation pour infertilité, ou d'une enquête génétique déclenchée par l'observation d'un phénotype pathologique dans la descendance.



## 2. Caractérisation moléculaire d'un homme 46,XX-SRY-négatif

Le patient 2 présente un phénotype masculin, une petite taille et des anomalies des organes génitaux externes (hypospades) et internes (reliquat müllérien). Plusieurs gènes interviennent dans le déterminisme du sexe chez l'Homme. L'incidence de ce syndrome peut être expliquée par plusieurs mécanismes. La présence du gène *SRY* dans le génome est constatée chez 80% des hommes 46,XX DSD et ce phénomène résulterait de la translocation du gène *SRY* sur le chromosome X ou sur un autosome. La détermination du sexe est le résultat d'une balance génétique entre l'expression de gènes pro-ovariens et pro-testiculaires. Les anomalies de la différenciation sexuelle sont donc secondaires à une perturbation de l'une des étapes impliquées dans cet équilibre d'expression génique. Dans les cas d'un individu 46,XX DSD testiculaire, la surexpression (CNV ou mutation gain de fonction) des gènes pro-testiculaires ou à l'inverse, la perturbation de l'expression des gènes pro-ovariens peuvent être responsables d'une différenciation testiculaire malgré un sexe génétique féminin. La présence d'une discrète mosaïque du chromosome Y uniquement présente dans les gonades, plus rare, peut également être responsable d'une discordance entre le sexe phénotypique et le sexe génétique.

A ce jour, des cas d'hommes 46,XX ont été rapportés porteur d'une anomalie des gènes pro-testiculaires tels que *SOX9* (duplication), sa région régulatrice *TESCO* (duplication et triplication), *SOX3* (duplication), *SOX10* (duplication et triplication) et des gènes pro-ovariens tels que *RSPO1* (délétion) et *WNT4* (mutation homozygote) (cf introduction, chapitre 1). Les résultats de l'analyse par CGH-array et les premiers résultats obtenus à l'issue du séquençage génome entier sont présentés dans la partie IV.B de cette discussion.

### **B. Génération de cellules iPS à partir des patients 1 et 2 présentant une anomalie génétique**

La prouesse scientifique de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPS) offre aujourd'hui l'opportunité de modéliser des maladies et d'étudier, après les avoir redifférencié vers un type cellulaire d'intérêt, le comportement des lignées cellulaires impliquées dans la pathologie. Des lignées de cellules IPS sont déjà disponibles pour l'étude de pathologies (cf introduction, chapitre 2.V.A.5). Cependant, des modèles d'infertilité ou d'anomalie du développement sexuel précoce dans un contexte d'anomalie génétique n'ont pas été beaucoup investigués. En effet, chez l'homme, seule la génération de lignées de cellules iPS à partir d'hommes azoospermes présentant des délétions des région AZF et de patient atteints du syndrome de klinefelter ont été rapportées (Ramathal *et al.*, 2014, Shimizu *et al.*, 2016). Dans le cadre de notre projet, la génération de cellules souches pluripotentes induites humaines a constitué la première étape vers une modélisation de l'infertilité *in vitro*. Nous avons ainsi généré deux modèles génétiques *in vitro* de l'infertilité et de DSD dans un contexte d'anomalies génétiques.

La génération de cellules iPS dans la littérature a majoritairement été réalisée à partir de fibroblastes. La particularité du présent travail a été de partir d'érythroblastes, nécessitant un simple





prélèvement de sang du patient et représentant donc une procédure non-invasive. Afin de réactiver les signaux d'immaturation et de prolifération caractéristiques d'une cellule pluripotente au sein des érythroblastes, nous avons utilisé des virus de Sendai, des vecteurs non-intégratifs du génome, codant pour les facteurs de transcription OCT3/4, SOX2, KLF4, et c-MYC. Les quatre gènes codant pour ces facteurs, surexprimés dans les cellules souches embryonnaires, sont suffisants pour reprogrammer les cellules déjà différenciées en cellules pluripotentes chez l'homme (Takahashi *et al.*, 2007). Le fait de réactiver la pluripotence éteint également les autres gènes de différenciation exprimés par la cellule (Plath & Lowry, 2011). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, d'autres associations de facteurs ont également prouvé leur efficacité pour la reprogrammation cellulaire. Nous avons opté pour le mélange de Yamanaka, pionnier de la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites chez la souris puis chez l'homme (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007). Après deux semaines de culture, les premières colonies de cellules sont apparues et présentaient une morphologie semblable aux cellules souches embryonnaires indifférenciées.

Le maintien de la stabilité génomique est une caractéristique clé des cellules iPS pour garantir leur efficacité de différenciation ou pour une utilisation médicale. Parmi les quatre facteurs inclus pour la reprogrammation, deux sont des pro-oncogènes bien connus c-MYC et KLF4 (Pasi *et al.*, 2011). Il a été rapporté que les oncogènes avaient le potentiel d'endommager l'ADN par un processus connu sous le nom de stress réplicatif et donc d'induire une instabilité génomique (Pasi *et al.*, 2011). Néanmoins, les mécanismes par lesquels c-MYC et d'autres oncogènes induisent un stress dans la réplication de l'ADN et une instabilité génomique ne sont pas bien établis (Pasi *et al.*, 2011). Pour s'assurer de la stabilité des lignées de cellules iPS générées (patient 1 clones 12 et 32 et patient 2 clones 15 et 20), nous avons réalisés un caryotype de contrôle de nos lignées à différents passages précoces. Le remaniement chromosomique complexe du patient 1 ainsi que le caryotype 46,XX du patient 2 étaient stables sans anomalies additionnelles observées. Les aberrations du nombre de copies de l'ADN résultent d'une instabilité génétique sous-jacente (Costa *et al.*, 2008). L'analyse par CGH-array permet d'avoir un aperçu global de ces aberrations. Par conséquent, une CGH-array 1M a été réalisée sur les différents clones iPS obtenus. Aucun CNV significatif n'a été mis en évidence dans les lignées. En cas de culture prolongée, il a été rapporté que les lignées étaient plus enclines aux altérations génétiques (Lefort *et al.*, 2009). Il est donc important de noter que les cellules iPS que nous avons générées puis entretenues en culture pour la suite des investigations, étaient toutes à passage précoce et génétiquement contrôlées.

Deux méthodes ont été utilisées pour prouver la pluripotence de nos cellules iPS. *In vitro*, la pluripotence des cellules iPS a été confirmée par l'expression des marqueurs de la pluripotence par RT-PCR (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *REX-1*) et immunofluorescence (*SSEA1*, *OCT3/4* et *TRA-1-60*). *In vivo*, les cellules iPS ont été capables après injection par voie intramusculaire à des souris immunodéficientes, de former des tératomes comportant des tissus issus des trois feuillets embryonnaires. Ces résultats fournissent une démonstration fiable de la génération de cellules iPS pluripotentes à partir de cellules portant une particularité génétique.

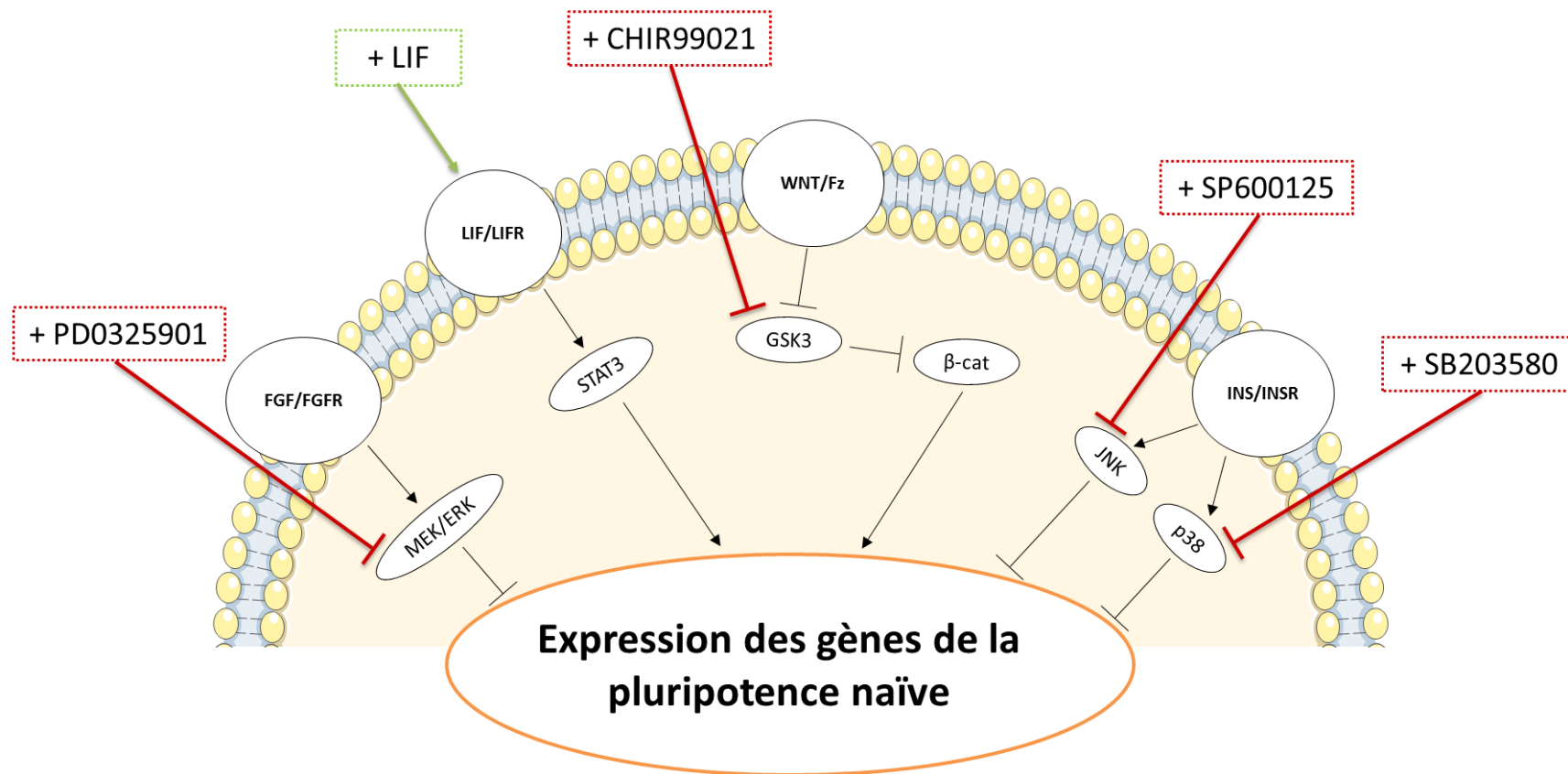


Figure 42 : Milieu LIF/4i et induction de l'état naïf de la pluripotence.  $\beta$ -cat :  $\beta$ -catenin; ERK : extracellular signal-regulated kinase; FGF : fibroblast growth factor; FGFR: fibroblast growth factor receptor; Fz : Frizzled; GSK3 : Glycogen synthase kinase-3; INS : insuline; INSR : récepteur de l'insuline; JNK : c-Jun N-terminal kinase (MAP kinases); LIF : leukemia inhibitory factor; LIFR : leukemia inhibitory factor receptor; MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase; p38 : MAP kinases p38; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; WNT : wingless-type MMTV integration site family.

## II. Développement d'un modèle cellulaire *in vitro* de cellules germinales dans un contexte d'anomalies chromosomiques : différenciation de cellules iPS de patients infertiles en cellules germinales primordiales

### A. Choix d'une stratégie

#### 1. Le choix de la conversion vers un état naïf de la pluripotence

Deux états de la pluripotence peuvent être dérivés *in vitro* à partir d'un embryon au stade blastocyste en fonction de son stade de développement. Ces deux états de la pluripotence correspondent *in vivo* à deux stades distincts de l'épiblaste au cours du développement embryonnaire précoce. Chez la souris, il est ainsi possible de dériver *in vitro* des cellules souches à l'état naïf (épiblaste pré-implantation) ou amorcée (épiblaste post-implantation) de la pluripotence. Comme nous l'avons déjà évoqué, les cellules hiPSC classiquement obtenues *in vitro* sont morphologiquement et épigénétiquement semblables aux EpiSC, correspondant à un l'état amorcé de la pluripotence. D'autant plus que leur dérivation *in vitro* est assurée par l'activation des mêmes voies de signalisation à savoir activin A/TFG $\beta$  et FGF2.

Ces deux types de cellules partagent les caractéristiques clés des cellules souches (auto-renouvellement et potentiel à se différencier en tout type de cellules spécialisées). La découverte de l'état naïf de la pluripotence humaine a néanmoins permis de mettre en évidence des inconvénients liés à l'utilisation de cellules souches à l'état amorcé. Le passage ou la dissociation des cellules souches pluripotentes peuvent être réalisés de manière manuelle ou enzymatique. Le mode manuel nécessite plus de temps et représente un exercice beaucoup plus méticuleux. Les cellules souches à l'état amorcé supportent difficilement la dissociation enzymatique et l'ensemencement en cellule unique (faible clonogénicité), et une dissociation manuelle est indispensable pour pouvoir distinguer chacun des clones générés. A l'inverse, des cellules souches à l'état naïf montrent une résistance à la dissociation à la trypsine du fait d'une clonogénicité élevée en cellule unique (Han *et al.*, 2010). Elles prolifèrent très rapidement et peuvent participer à la formation de chimères (Han *et al.*, 2010).

Ainsi, le processus de différenciation a d'abord été initié par la conversion de cellules hiPS de l'état amorcé à l'état naïf de la pluripotence. Cet état naïf de la pluripotence peut être atteint à partir de lignées de cellules souches humaines amorcées déjà établies et stabilisé en culture dans certaines conditions (Gafni *et al.*, 2013). Cet état est influencé par les voies de signalisation LIF/Stat3 et WNT/ $\beta$ -catenin (Weinberger *et al.*, 2016).

La méthode de conversion utilisée provoque une stimulation exogène de la voie de signalisation JAK/STAT3 par le LIF à laquelle s'ajoute un cocktail bien précis de petites molécules inhibitrices parmi lesquelles des inhibiteurs de GSK3 (CHIR99021), MEK (PD0325901), MAPK p38 (SB203580) et JNK (SP600125) (Gafni *et al.*, 2013) (Figure 42). L'ajout combiné des inhibiteurs de GSK3 et de MEK, contribue à activer respectivement la signalisation WNT et à inhiber la voie ERK, maintenant les cellules dans un état précoce naïf (Ying *et al.*, 2008, Marks *et al.*, 2012, Gafni *et al.*, 2013) (Figure 42). De plus, l'inhibition des autres voies des MAPK (JNK et p38) semble également avoir un effet positif sur la réversion (Gafni *et al.*, 2013, Fang *et al.*, 2014, Theunissen *et al.*, 2014) (Figure 42). Chez la souris, FGF et TFG $\beta$  sont rapportés stimuler et soutenir la pluripotence



amorcée (Weinberger *et al.*, 2016). De manière surprenante, l'ajout de FGF et de TFG $\beta$  semble contribuer, conjugué aux conditions 4i/LIF, à la croissance et à l'auto-renouvellement des cellules souches naïves (Gafni *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2015). Les cellules restent ainsi dépendantes du FGF même en présence des inhibiteurs des MAPK. Ceci indique que d'autres cascades, en aval du FGF, soutiennent la pluripotence naïve. L'utilisation de cocktail d'inhibiteurs a prouvé sa capacité à améliorer efficacement le processus de reprogrammation des cellules souches amorcées vers l'état naïf de la pluripotence (Chan *et al.*, 2013, Gafni *et al.*, 2013, Ware *et al.*, 2014, Valamehr *et al.*, 2014, Theunissen *et al.*, 2014).

## 2. Stabilité chromosomique et méthode de repiquage cellulaire

De nombreux groupes de recherche ont décrit les effets néfastes des techniques de dissociation cellulaire (trypsine, collagénase ou accutase) sur la fréquence des anomalies du caryotype dans les lignées ES et iPS humaines (Mitalipova *et al.*, 2005, Hasegawa *et al.*, 2006, Bai *et al.*, 2015). Mais d'autres études ont montré que les cellules souches pluripotentes dissociées manuellement présentent également un nombre croissant de réarrangements chromosomiques au fil des passages (Lefort *et al.*, 2008, Hovatta *et al.*, 2010, Tosca *et al.*, 2015). Pour s'assurer de la stabilité génomique des cellules iPS à l'état naïf de pluripotence, il serait donc utile, comme entrepris sur les cellules iPS amorcées, de réaliser le caryotypage de nos lignées générées. En effet, le passage des cellules iPS de l'état amorcé de la pluripotence à l'état naïf a nécessité deux semaines de culture supplémentaires avant l'étape de différenciation, équivalant à 4-5 passages additionnels. Cependant, selon l'expérience de notre laboratoire, la dissociation enzymatique douce (collagénase) n'induit pas plus de variations du nombre de copie de l'ADN (Tosca *et al.*, 2015). L'accutase permet également une dissociation efficace en douceur sans nécessité de neutralisation et/ou de rinçage.

## 3. BMP2/4 et différenciation germinale

Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine de la différenciation *in vitro* de cellules germinales à partir de cellules ES et iPS chez l'homme, avec l'obtention de différents stades CGP (Park *et al.*, 2009, Medrano *et al.*, 2012, Panula *et al.*, 2011), gonocytes (Ramathal *et al.*, 2014), cellules souches spermatogoniales (Easley *et al.*, 2012), cellules germinales initiant la méiose (Ge *et al.*, 2015), spermatocytes (Easley *et al.*, 2012, Eguizabal *et al.*, 2011), cellules haploïdes (Medrano *et al.*, 2016) et spermatides rondes (Panula *et al.*, 2011, Easley *et al.*, 2012, Eguizabal *et al.*, 2011). De nouvelles perspectives s'ouvrent ainsi pour élargir nos connaissances des premiers stades de la formation des cellules germinales, encore trop réduites dans l'espèce humaine. Chaque fois, le stade CGP est soigneusement et spécifiquement atteint avant que toute différenciation en cellules plus matures ne soit envisagée. Le stade de CGP représente donc une étape intermédiaire indispensable pour le développement de cellules germinales *in vitro*. Jusqu'à présent, aucun travail n'a rapporté la génération de cellules germinales dans un contexte d'anomalie génétique.

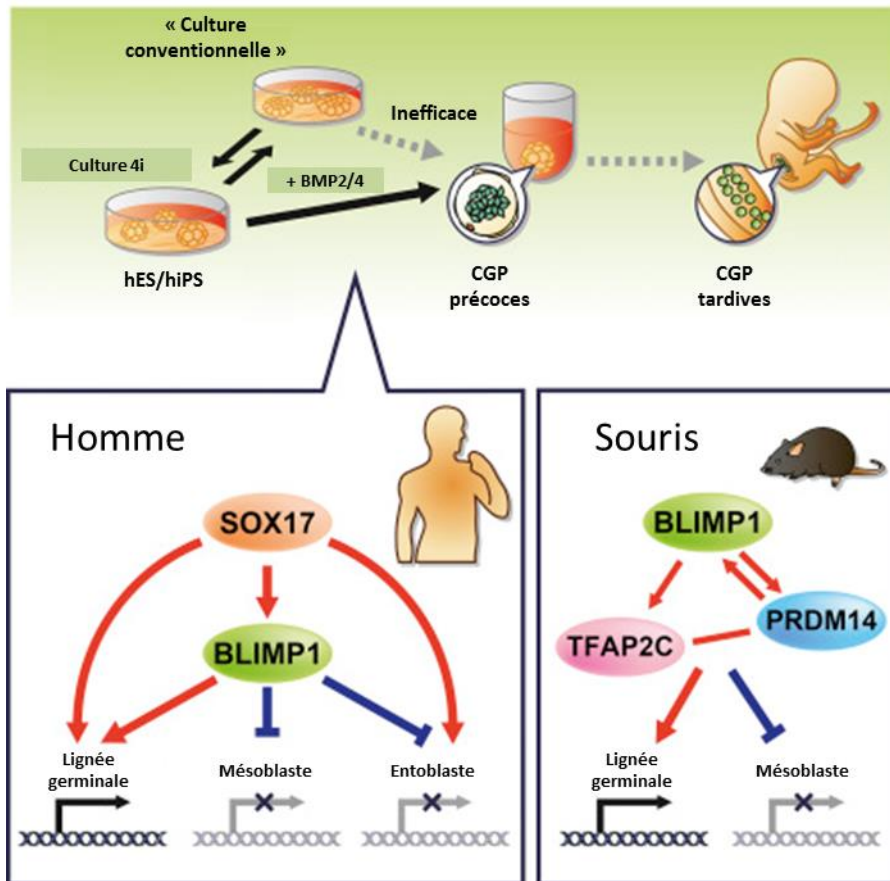


Figure 43 : SOX17, un déterminant critique des cellules germinales primordiales humaines. BLIMP1 (ou PRDM1) : PR/SET domain 1; BMP2/4 : Bone morphogenic protein 2/4; Cellules hES : cellules souches embryonnaires humaines ; Cellules hiPS : cellules souches pluripotentes induites humaines; CGP : cellule germinale primordiale; PRDM14 : PR PR/SET domain 14; SOX17 : Transcription factor SOX-17; TFAP2C : Transcription factor AP-2 gamma; 4i : 4 inhibiteurs.

L'expression forcée de gènes et/ou l'introduction de facteurs spécifiques dans le milieu constituent les deux stratégies utilisées pour l'induction des cellules germinales *in vitro*. Pour notre étude, nous avons privilégié une stratégie visant à recréer *in vitro* le microenvironnement physiologique. En effet, les cellules iPS sont des cellules qui ont déjà été manipulées génétiquement puisque leur génération nécessite l'activation induite de plusieurs gènes. Manipuler génétiquement à nouveau ces cellules ne semble pas représenter la stratégie la plus adéquate. Les stratégies visant à contrôler uniquement certains facteurs du milieu entourant les iPS, afin de générer des CGP, a déjà prouvé son efficacité (Park *et al.*, 2009, Eguizabal *et al.*, 2011, Easley *et al.*, 2012).

Pour cette étape de différenciation germinale, le passage par la formation d'EB était nécessaire. Les EB constituent une structure tridimensionnelle constituée de cellules provenant des trois feuillets embryonnaires, mimant ainsi le développement embryonnaire précoce. La formation des EB a demandé 4 jours. Une différence dans la taille des EB obtenus a été constatée entre les deux patients en particulier pour le patient 2 (clone 15) malgré un nombre de cellules de départ identique pour induire la formation d'EB. La présence et la coordination spatiale des différentes interactions cellule-cellule sont primordiales dans la formation d'EB. Ainsi, il existe probablement au sein de ces lignées cellulaires une altération de ces interactions cellule/cellule, propre à ce patient 2, qui expliquerait la petite taille des EB obtenus.

Chez les souris et l'Homme, la spécification des cellules germinales est régulée par des processus génétiques et épigénétiques qui dépendent des signaux externes produits par l'environnement cellulaire (Irie *et al.*, 2014, De Felici, 2013). Chez la souris, les signaux provenant de l'ectoblaste extra-embryonnaire proximal (BMP4 et BMP8b) et l'entoblaste viscéral (BMP2) jouent un rôle essentiel dans l'induction des CGP (De Felici, 2013). Par la suite, la survie et la localisation des PGC seraient également sous le contrôle de BMP4 produit par le mésoblaste extra-embryonnaire (Fujiwara *et al.*, 2001).

La différenciation des cellules hiPS naïves en cellules de la lignée germinale de type CGP a ainsi été réalisée par la formation d'EB et en cultivant les cellules en présence de BMP2/4, cytokines les plus importantes pour l'induction de PGC. Cette différenciation nécessite également la présence de LIF, EGF et SCF qui, ensemble, favorisent la survie et la prolifération des cellules. La RT-PCR quantitative a révélé que les cellules obtenues ont bien maintenu leur expression des marqueurs de la pluripotence (OCT3/4 et NANOG). Les cellules germinales primordiales partagent de nombreuses propriétés avec des cellules souches embryonnaires et montrent une expression intrinsèque de plusieurs facteurs clés de la pluripotence, y compris *OCT4* et *NANOG* (Bazley *et al.*, 2015). Ces cellules expriment notamment plusieurs marqueurs des CGP précoces (*SOX17*, *CD-38*, *NANOS3*, *c-KIT*, *AP2γ* et *D2-40*). Nous montrons que l'expression de *SOX17*, déterminant critique des CGP humaines (et non de la souris) et marqueur le plus précoce des CGP (Irie *et al.*, 2015), a été significativement augmentée dans les EB issus de chacune des lignées de nos deux patients (Figure 43). De manière intéressante, nous avons remarqué une augmentation significative de l'expression du gène *VASA* dans l'un des EB du patient 1. Le gène *VASA* représente un marqueur CGP post-migration qui est exprimé dans les CGP lors de la colonisation des gonades *in vivo* mais non exprimé dans les CGP lors des premiers stades du développement. Ainsi, nous pouvons supposer





que, dans cet EB en particulier, les cellules germinales sont probablement dans un état de différenciation plus avancé, ressemblant plus étroitement aux CGP tardives plutôt qu'aux cellules germinales primordiales précoces. Des analyses d'immunohistochimie ont également démontré que les CGP obtenues expriment les protéines AP2 $\gamma$  et D2-40.

Ainsi, BMP2/4 en association avec LIF, SCF et EGF ont été efficaces pour induire la différenciation des CGP humaines à partir des cellules iPS issues des deux patients. Par ailleurs, la démarche utilisée pour conduire à une différenciation des cellules iPS en CGP a été reproductible avec des pourcentages variables de cellules germinales positives dans les EB. Cette différence dans la quantité de CGP générées d'une technique à l'autre peut également être due au contexte d'anomalie chromosomique des cellules iPS utilisées pour cette différenciation germinale. Quoi qu'il en soit, dans toutes nos expériences, un destin germinale a pu être imposé aux cellules iPS qui ont atteint le stade de cellules germinales primordiales.

## **B. Différenciation germinale dans un contexte de remaniement chromosomique complexe**

### **1. Comportement méiotique des RCC et fertilité**

Des mécanismes de points de contrôle se produisent au cours du processus de la méiose. Le phénomène de synapsie des chromosomes en prophase (pachytène) de première division de méiose, constitue l'une des cibles du processus de surveillance. Les échecs dans l'appariement des chromosomes homologues mènent presque toujours à l'arrêt précoce de la méiose ou à la formation de gamètes aneuploïdes, une des principales causes de perte embryonnaire. Les anomalies chromosomiques n'ont pas les mêmes conséquences sur la spermatogenèse et l'ovogenèse. En présence de remaniement chromosomique de structure, les points de contrôle au cours de l'ovogenèse semblent être plus permissifs que dans la spermatogenèse (Bhalla, 2010). Les hommes porteurs de RCC présentent donc souvent des problèmes d'hypofertilité ou d'infertilité liés à une insuffisance du nombre de gamètes (oligozoospermie ou azoospermie).

Ainsi, le RCC survenu *de novo* chez le patient 1, pourrait à lui seul expliquer l'infertilité. En effet, la ségrégation méiotique de ces remaniements reste très complexe. Dans le cas du patient 1, le diagramme de pachytène formé pendant la méiose I formerait probablement une structure en tétravalent permettant l'appariement des chromosomes homologues. La ségrégation des chromosomes qui en découle peut théoriquement se faire selon les types 2:2, 3:1 et 4:0. Elle peut ainsi conduire à un arrêt précoce de la méiose en raison d'un échec de synapsie partielle (segments asynaptiques) ou totale des chromosomes homologues perturbant la qualité d'appariement des chromosomes. Un arrêt méiotique peut aussi être causé par l'association de segments autosomiques avec les gonosomes au sein de la vésicule sexuelle (Guichaoua *et al.*, 1991, Navarro *et al.*, 1991). La présence d'une structure complexe en pachytène lors de la première division de méiose peut déstabiliser le fuseau de division et alors entraîner des phénomènes de non-disjonction et donc des aneuploïdies additionnelles au RCC. Outre les anomalies de ségrégation, le phénomène de *crossing-over* lors de la méiose conduit à l'apparition de nouveaux chromosomes recombinants augmentant



encore les possibilités de déséquilibre (Pellestor *et al.*, 2001).

Cependant, des cas de sujets fertiles porteurs de RCC ont été rapportés (Grasshoff *et al.*, 2003, Karadeniz *et al.*, 2008). Les RCC n'induisent donc pas systématiquement des problèmes d'appariement des chromosomes pouvant expliquer l'arrêt précoce de la méiose. Si toutefois une grossesse venait à se produire, le risque d'anomalies chromosomiques pour l'embryon serait élevé. Par ailleurs, nous savons à l'issue de l'analyse de la biopsie testiculaire que, pour le patient 1, des cellules germinales aux stades spermatocytes mais également quelques rares spermatozoïdes ont été retrouvées, suggérant donc que, malgré la présence du RCC, les cellules germinales ont su, pour certaines d'entre elles, réaliser la première voire la deuxième division méiotique.

La complexité des mécanismes de ségrégation possibles pouvant aboutir à des spermatocytes ou des spermatozoïdes rend l'étude et la caractérisation de ce RCC intéressant. L'appariement des chromosomes lors de la méiose est un processus finement contrôlé. Malgré les connaissances actuelles des mécanismes impliqués dans leur genèse, les RCC apparaissent comme des événements uniques et complexes. Ainsi, la génération de cellules iPS *in vitro* porteur d'un RCC nous permettra d'étudier leur étiologie et leur comportement lors de la méiose.

## 2. Point de cassure et gène SYCP3

Comme mentionné précédemment, un point de cassure s'est produit à 300 kb en aval du gène SYCP3. Ce point de cassure pourrait avoir interrompu un élément régulateur du gène. La protéine SYCP3 est un constituant du complexe synaptonémal qui apparie les chromosomes homologues ensemble au cours de la prophase (pachytène) de première division de méiose. Ainsi, il permet la réalisation de processus clés tels que la recombinaison et la ségrégation des chromosomes méiotiques. Dans la littérature, des patients hétérozygotes pour une mutation du gène SYCP3 ont été rapportés associés à une azoospermie par arrêt précoce de la méiose (Miyamoto *et al.*, 2003, Stouffs *et al.*, 2005). La proximité du site d'un point cassure peut modifier l'activité d'un gène. Les réarrangements chromosomiques peuvent interrompre les régions de régulation ou perturber l'organisation locale de la chromatine et ainsi perturber l'expression des gènes proches du point cassure. Le gène SYCP3 n'est exprimé que dans les cellules de la lignée germinale et plus particulièrement pendant la méiose. Seule une différenciation plus avancée des CGP générées du patient 1 en cellules germinales méiotiques pourrait permettre d'apprécier le niveau d'expression de SYCP3 et confirmer si ce gène est responsable ou non du blocage méiotique. Une différenciation plus avancée de ces CGP *in vitro* contribuerait également à l'identification des points de blocage précis à l'origine de l'infertilité du patient et surtout à une meilleure compréhension des mécanismes d'asynapsie et de point de contrôle au cours de la méiose dans un contexte de RCC.



### C. Modélisation d'un développement précoce anormal à l'aide de cellules souches pluripotentes induites et de CGP : expression des gènes et régulation épigénétique au cours du développement embryonnaire précoce

Un aspect important des cellules hiPS est la possibilité de récapituler les premiers stades du développement embryonnaire *in vitro*. Par conséquent, les cellules iPS et les CGP générées à partir du patient 2 à caryotype 46,XX-SRY-négatif, représentent une ressource précieuse pour étudier des aspects particuliers du développement embryonnaire tels que le développement sexuel précoce. Les CGP obtenues pourraient être utilisées comme un système de modèle *in vitro* pour l'étude de l'expression précoce et du profil épigénétique des gènes dans l'espoir de découvrir de nouvelles causes génétiques de DSD. *In vivo*, les CGP se différencient en gonocytes (ou pro-spermatogonie) une fois qu'ils ont atteint les crêtes génitales. Ensuite, la pro-spermatogonie débute une phase d'activité mitotique intense puis se différencie en spermatogonie (Niederberger *et al.*, 2015). Chez l'homme 46,XX présentant une véritable réversion du sexe, les cellules germinales XX entrent dans la première phase de la spermatogenèse à mesure qu'elles deviennent des pro-spermatogonies, mais elles sont ensuite éliminées car incapables de participer aux phases de prolifération et de différenciation des spermatogonies (Taketo, 2015). Les cellules germinales XX ne parviennent donc pas à entrer en méiose.

Le chromosome Y joue un rôle majeur dans la fertilité masculine. Chez les hommes, les délétions de régions spécifiques du chromosome Y ont été liées à une insuffisance testiculaire et à une infertilité par oligozoospermie ou azoospermie (McElreavey *et al.*, 2006, Navarro-Costa *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2016). Les microdélétions des régions AZF (Azoospermia Factor) portées par le bras long du chromosome Y (Yq11) représentent l'une des causes génétiques les plus fréquentes de l'azoospermie ou de l'oligozoospermie sévère (Coutton *et al.*, 2012). Les CGP générées à partir d'un homme 46,XX-SRY-négatif seront probablement incapables d'effectuer une méiose sans chromosome Y. Ainsi, il reste à évaluer si les cellules de type CGP dérivées du patient 2 pourront se différencier par le processus de méiose en cellules germinales mâles plus matures si des gènes spécifiques des régions AZF étaient ajoutés.

En conclusion, en utilisant la technologie des cellules iPS, nous avons pu montrer que les hommes infertiles par azoospermie non-obstructive ou du fait d'un trouble du développement sexuel, peuvent produire des cellules de type cellules germinales primordiales. La disponibilité des lignées iPS issues d'hommes infertiles et leur utilisation pour la modélisation de l'infertilité *in vitro* vont accélérer notre compréhension des différents aspects de l'infertilité masculine passant par les processus de différenciation sexuelle, de morphogenèse des testicules et de contrôle de la spermatogenèse.

Genes					Cells	Function
<i>Acvr2a</i>	<i>Cldn11</i>	<i>Gdf1</i>	<i>Lhcgr</i>	<i>Serpina5</i>	Sertoli, peritubular, Leydig and/or interstitial cells	Growth factors and receptors Gonadotropin receptors Cell-cell adhesion Steroids and receptors Signal transduction Junctional complexes
<i>Adralb</i>	<i>Cyp17a1</i>	<i>Gdnf</i>	<i>Man2a2</i>	<i>Slc12a2</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Sox8</i>	Spermatogonia (mitosis and apoptosis)	Proapoptotic, survival and cell cycle Apoptotic stem cells
<i>B4galnt1</i>	<i>Dhh</i>	<i>Hmga1</i>	<i>Nr0b1</i>			
<i>Bcl2l2</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hmgb2</i>	<i>Rbp4</i>		Spermatocytes (meiosis)	Chromosome pairing and synapsis Homologous recombination Genomic integrity DNA replication and repair
<i>Cdkn2c</i>	<i>Dnaja1</i>	<i>Inha</i>	<i>Sf1</i>			
<i>Cdkn2e</i>	<i>Efv5</i>	<i>Kitl</i>	<i>Sbf1</i>		Spermatids (differentiation)	Cell remodeling Cytoplasmic extrusion Chromatin packaging Nuclear condensation Spermiation
<i>Adamts2</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Pi3K</i>	<i>Sycp2</i>		
<i>Apaf1</i>	<i>Dazl</i>	<i>Kit</i>	<i>Rbp4</i>	<i>Utp14b</i>	Spermatozoa (maturation, motility and fertilization)	Maturation in genital tract Capacitation Fertilization Nuclear decondensation Hyperactivated motility Sperm, zona and egg penetration
<i>Bax</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Limk2</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Zbtb16</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dnmt3l</i>	<i>Nanos2</i>	<i>Slc19a2</i>		Other fertility defects	
<i>Csf1</i>	<i>Etv5</i>	<i>Pin1</i>	<i>Sohlh2</i>			
<i>Cdkn2d</i>	<i>Gdnf</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Stra8</i>			
<i>Adralb</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Ercc1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Piwil2</i>	Spermatocytes (meiosis)	Chromosome pairing and synapsis Homologous recombination Genomic integrity DNA replication and repair
<i>Atm</i>	<i>Ccna1</i>	<i>Exo1</i>	<i>Limk2</i>	<i>Piwil4</i>		
<i>Bat3</i>	<i>Cks2</i>	<i>Fanca</i>	<i>Lmna</i>	<i>Pms2</i>	Spermatids (differentiation)	Cell remodeling Cytoplasmic extrusion Chromatin packaging Nuclear condensation Spermiation
<i>Bcl2</i>	<i>Cnb1ip1</i>	<i>Fkbp6</i>	<i>Mei1</i>	<i>Psmc3ip</i>		
<i>Bcl6</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Fus</i>	<i>Mlh1</i>	<i>Rad51c</i>	Spermatozoa (maturation, motility and fertilization)	Maturation in genital tract Capacitation Fertilization Nuclear decondensation Hyperactivated motility Sperm, zona and egg penetration
<i>Bcl2l2</i>	<i>Cpeb1</i>	<i>Gal3st1</i>	<i>Mlh3</i>	<i>Rara</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Gnpat</i>	<i>Morc1</i>	<i>Rarb</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Csda</i>	<i>H2afx</i>	<i>Msh4</i>	<i>Rec8</i>		
<i>Brca2</i>	<i>Dazap1</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Msh5</i>	<i>Slc25a4</i>	Other fertility defects	
<i>Btrc</i>	<i>Dmc1</i>	<i>Hsf1</i>	<i>Sgol2</i>			
<i>Bsg</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hsf2</i>	<i>Ovol1</i>	<i>Siah1a</i>	Other fertility defects	
<i>Bub1b</i>	<i>Egr4</i>	<i>Hspa2</i>	<i>Pafah1b2</i>	<i>Slc25a4</i>		
<i>Adamts2</i>	<i>Ddx25</i>	<i>Pank2</i>	<i>Ppp1cc</i>	<i>Tdrd1</i>	Other fertility defects	
<i>Bcl2l2</i>	<i>Fndc3a</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Pygo2</i>	<i>Tbpl1</i>		
<i>Cadm1</i>	<i>H1fnt</i>	<i>Pafah1b1</i>	<i>Rpb4</i>	<i>Theg</i>	Other fertility defects	
<i>Camk4</i>	<i>Hip1</i>	<i>Parp2</i>	<i>Rnf17</i>	<i>Tlp</i>		
<i>Cib1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Piwil1</i>	<i>Six5</i>	<i>Tnp1</i>	Other fertility defects	
<i>Creml</i>	<i>Krt9</i>	<i>Prm1</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Tnp2</i>		
<i>Csnk2a</i>	<i>Lmtk2</i>	<i>Prm2</i>	<i>Slc4a2</i>	<i>Ube2b</i>	Other fertility defects	
<i>Cugbp1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Prnd</i>	<i>Styx</i>	<i>Ybx2</i>		
<i>Ace</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Prnd</i>	<i>Smpd1</i>	Other fertility defects	
<i>Acr</i>	<i>Tekt3</i>	<i>Spag16</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Spem1</i>		
<i>Adad1</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Spag9</i>	<i>Rpg6</i>	<i>Tssk6</i>	Other fertility defects	
<i>Adam2</i>	<i>Tnp1</i>	<i>Tsn</i>	<i>Taf7l</i>	<i>Zbbp</i>		
<i>Adam3</i>	<i>Tnp2</i>	<i>Vipr2</i>		<i>Zbbp2</i>	Other fertility defects	
<i>Apob</i>	<i>Pcsk4</i>		<b>Morph.</b>			
<i>Bub1</i>	<i>Vdac3</i>	<b>OT</b>	<i>Aff4</i>	<b>Mot.</b>	Other fertility defects	
<i>Clgn</i>		<i>Fhl5</i>	<i>Agtpbp1</i>	<i>Apob</i>		
<i>Csnk2a2</i>	<b>Count</b>	<i>Gmcl1</i>	<i>Bbs2</i>	<i>Adcy3</i>	Other fertility defects	
<i>Dnahc1</i>	<i>Adamts2</i>	<i>Nphp1</i>	<i>Bbs4</i>	<i>Adcy10</i>		
<i>Egr4</i>	<i>Arl4</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>Cd59b</i>	<i>Akap4</i>	Other fertility defects	
<i>Inpp5b</i>	<i>Ahr</i>		<i>Cd81</i>	<i>Agtpbp1</i>		
<i>Jund</i>	<i>Apob</i>	<b>OAT</b>	<i>Csnk2a2</i>	<i>Atp2b4</i>	Other fertility defects	
<i>Klh10</i>	<i>Cenpb</i>	<i>Apob</i>	<i>Gba2</i>	<i>Bbs1</i>		
<i>Pebp1</i>	<i>Gamt</i>	<i>Brdt</i>	<i>Gopc</i>	<i>Bbs4</i>	Other fertility defects	
<i>Prm1</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Cadm1</i>	<i>Gml01</i>	<i>CatSper1</i>		
<i>Prm2</i>	<i>Hspa4l</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Hrb</i>	<i>CatSper2</i>	Other fertility defects	
<i>Rbmxl2</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Hook1</i>	<i>CatSper3</i>		
<i>Rxb</i>	<i>P2rxl</i>	<i>Gmcl1</i>	<i>Il2rn</i>	<i>CatSper4</i>	Other fertility defects	
<i>Ros1</i>	<i>Rxfp1</i>	<i>Jam3</i>	<i>Sepp1</i>	<i>Cd59b</i>		
<i>Spnr</i>	<i>Sh2b1</i>	<i>Polg</i>	<i>Sept4</i>	<i>Cga</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>		
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>		
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>		
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>		
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>		
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>	Other fertility defects	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanci</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>		
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>	Other fertility defects	
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>		
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>	Other fertility defects	
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>	Other fertility defects	
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>	Other fertility defects	
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>		
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>	Other fertility defects	
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>	Other fertility defects	
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>		
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>	Other fertility defects	
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>		
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>	Other fertility defects	
<i>Cenpb</i>	<i>Fanc</i>	<i>G</i>				

### **III. Développement d'une puce CGH-array personnalisée pour les patients présentant une azoospermie-cryptozoospermie ou présentant un désordre du développement sexuel**

L'hybridation génomique comparative sur puce à ADN (CGH-array) a été développée à la fin des années 90 pour détecter les délétions et duplications chromosomiques au sein de génomes entiers (Solinas-Toldo *et al.*, 1997, Pinkel *et al.*, 1998). La CGH-array représente un outil performant non seulement dans la détection de déséquilibres chromosomiques cryptiques et leur localisation précise, mais aussi dans l'établissement d'une corrélation génotype-phénotype. Les 43 patients constituant la cohorte présentent une azoospermie-cryptozoospermie et tous possèdent des déséquilibres détectés par CGH-array pouvant potentiellement être en lien avec leur phénotype d'infertilité. Une moyenne de 52,6 déséquilibres par patient a été détectée et analysée, ce qui a permis de retenir au total 171 CNV significatifs. Afin de définir la pertinence des déséquilibres identifiés et leur corrélation avec le phénotype d'infertilité, nous les avons classés en deux catégories : VOUS ou PP. Pour les deux patients DSD, seul un patient présente un CNV pouvant potentiellement être responsable du phénotype observé (patient 3).

#### **A. Mise au point d'un outil de diagnostic pour l'infertilité masculine et les cas de DSD**

Pour cette partie du travail de thèse, nous avons choisi d'étudier la présence de microremaniements cryptiques au sein d'une cohorte de patient infertiles ou présentant un désordre du développement sexuel. Cet aspect des origines génétiques de l'infertilité masculine et de DSD a été peu effectuée. Dans cette optique, une bibliographie (revues et articles) chez l'homme et la souris a permis de sélectionner 358 gènes relatifs au phénotype d'infertilité et 87 gènes associés à des désordres du développement sexuel soit un total de 445 gènes (Annexe 3). Nous avons aussi choisi d'enrichir particulièrement ce design au niveau des gènes de la région AZF du chromosome Y. En effet, le chromosome Y est le plus souvent peu couvert en séquences d'ADN dans les puces commerciales catalogues disponibles pour le diagnostic. Cette liste de 445 gènes n'est pas exhaustive. Il a fallu limiter l'inclusion de gènes supplémentaires pour des raisons de limites imposées par la résolution de la puce (400K) en terme de surface. Comme le montre la figure 44, le nombre de gènes connus à ce jour comme influençant la fonction testiculaire, ne serait-ce que chez la souris, est conséquent. Nous avons décidé de traiter les exons et les introns séparément de sorte à imposer une résolution de 0,1 kb pour les exons et de 0,6 kb pour les introns et d'augmenter la probabilité de trouver des sondes hautement performantes dans ces régions.

Etant donné le nombre de gènes sélectionnés, une résolution de 400K a été utilisée pour le design de la puce. Ce design offre ainsi la possibilité de réaliser un examen pangénomique à un haut niveau de résolution (résolution moyenne de 5,3 kb), et d'être enrichie au niveau d'un panel de gènes spécifiques.



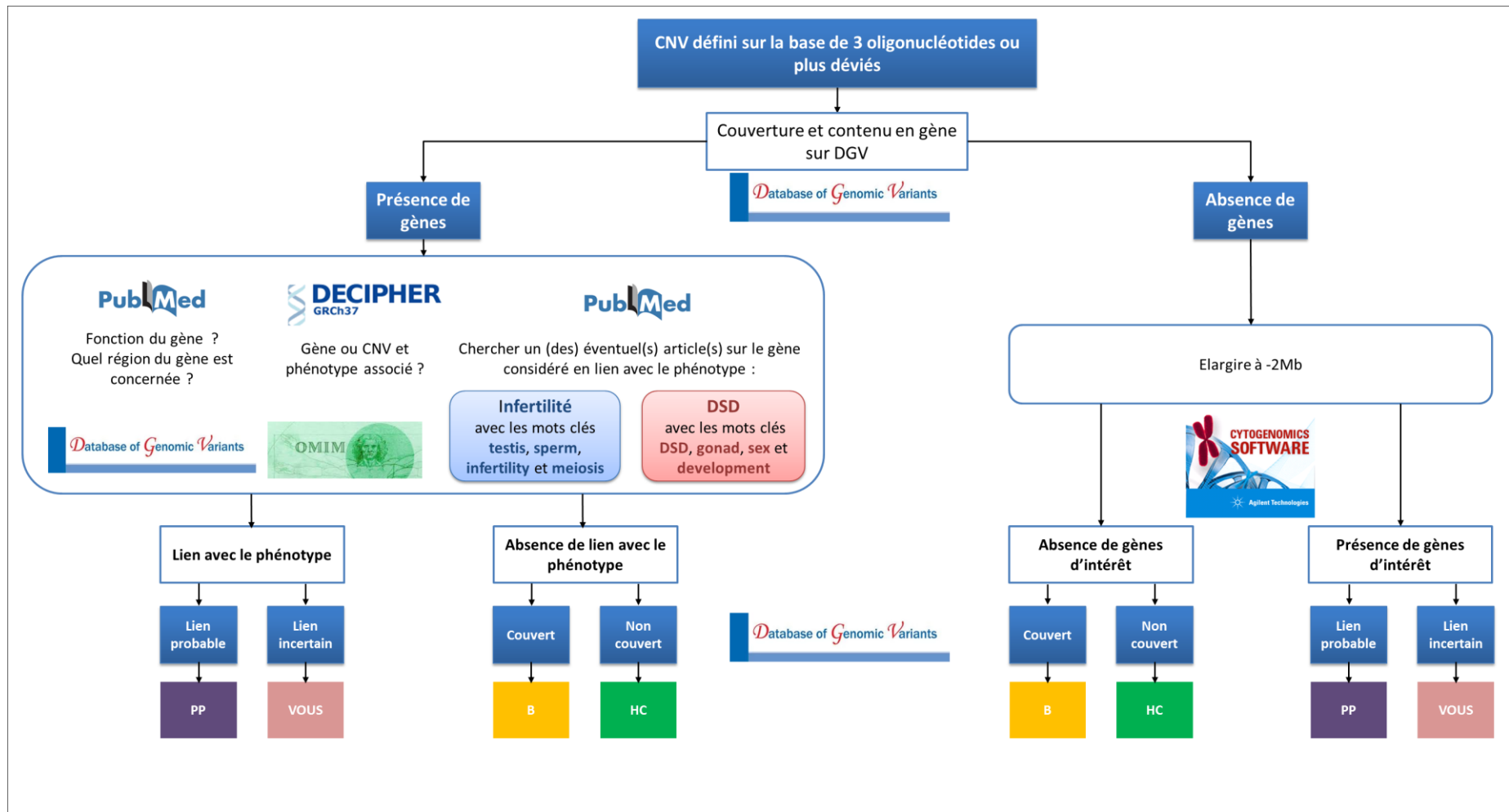


Figure 45 : Stratégie d'interprétation des CNV. B : bénin ; HC : hors critères ; PP : potentiellement pathogène ; VOUS : variants de signification incertaine.

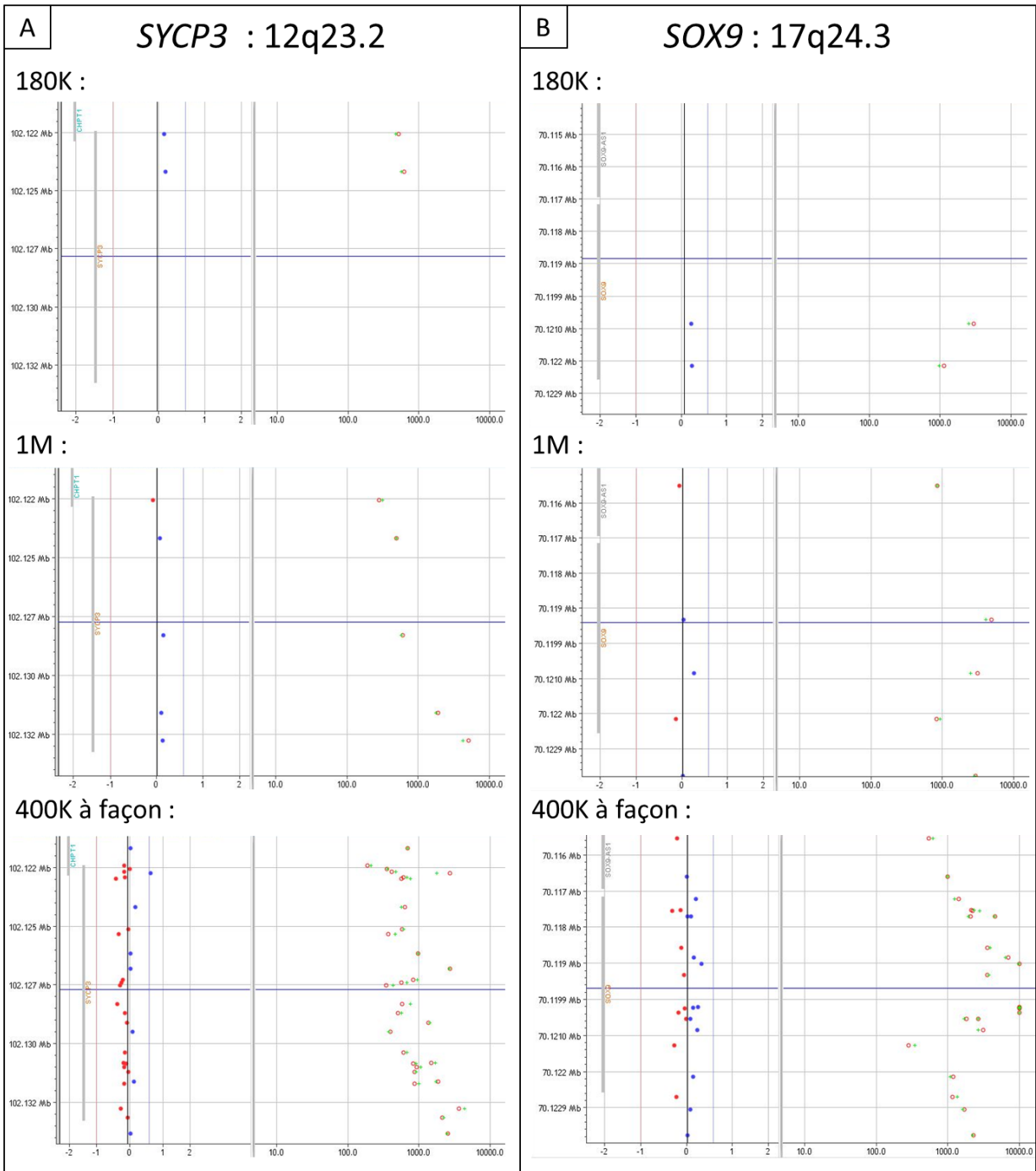
## 1. Interprétation des données

L'impact clinique d'un CNV identifié peut parfois être difficile à interpréter. Nous avons distingué pour cette étude schématiquement quatre types de CNV : les CNV bénins (B), les CNV hors critères (HC), les CNV de signification inconnue ou VOUS et les CNV potentiellement pathogènes (PP). Pour l'interprétation des données, nous ne nous sommes pas uniquement basés sur les informations fournies par la base de données DGV. Cette base de données nous informe de la couverture du microremaniement au sein d'une population d'individus dits sains. Cette base de données « contrôle » est utilisée en routine diagnostique pour les patients atteints de pathologies, en particulier de déficience intellectuelle syndromique ou non syndromique. Néanmoins, dans le cadre d'une analyse d'un patient ne présentant pas de déficience intellectuelle syndromique ou non syndromique, cette base de données pourrait ne pas s'avérer adéquate. En effet, dans notre sujet d'étude, la base DGV ne renseigne pas sur le sexe ou l'aptitude à concevoir des individus inclus. Aucun bilan de fertilité n'est réalisé ni prérequis lors de l'inclusion. En conséquence, un CNV couvert dans cette base de données ne peut être utilisé que de manière indicative pour cette étude puisque pour ces individus, homme ou femme, la fertilité n'est pas précisée. C'est pourquoi, indépendamment de la couverture des CNV dans DGV, chacun des gènes compris dans les CNV (ou à proximité du CNV en cas de désert génique) a été analysé. Pour chacun de ces gènes, la fonction a été cherchée sur NCBI et une recherche sur pubmed a été entreprise avec les mots clés « infertility », « meiosis », « sperm » et « testis » dans le cas des patients azoospermes-cryptozoospermes et les mots clés « development », « DSD », « gonad » et « sex » pour les deux patients DSD afin d'identifier un gène d'intérêt conférant un caractère VOUS ou PP au CNV considéré (Figure 45).

## 2. Comparaison des formats de puce à ADN : exemple des gènes d'intérêt *SYCP3* et *SOX9*

Lorsque l'on compare le design de la puce à façon avec les puces à ADN pangénomiques de type 180K (le plus utilisé en diagnostic) et 1M (dite haute résolution) proposées par le fournisseur, on constate qu'elles ne permettent pas de couvrir suffisamment les gènes candidats pour les phénotypes d'infertilité et de DSD. Comme le montre la figure 46, le gène *SYCP3* est couvert par 2 sondes sur la puce 180K catalogue et par trois sondes supplémentaires en utilisant le design 1M. De la même manière, on constate que la couverture du gène *SOX9* passe de 2 sondes avec un format 180K catalogue à 4 sondes en utilisant un format 1M. Un remaniement cryptique dans ces gènes pourrait ne pas être détecté avec ces deux formats de puce à design classique avec le filtre d'analyse bioinformatique qui retient un CNV à partir de 3 sondes consécutives déviées.

Néanmoins, en utilisant le format CGH-array 400K à façon pangénomique et spécifiquement enrichi dans des gènes d'intérêt pour l'infertilité et le désordre du développement sexuel, les gènes *SYCP3* et *SOX9* sont couverts respectivement par 27 et 18 sondes (Figure 46A et B).



**Figure 46** : Comparatif de la densité des sondes sur les régions 12q23.2 (gène *SYCP3*) (**A**) et 17q24.3 (gène *SOX9*) (**B**) pour les puces à ADN Agilent 180K catalogue, 1M catalogue et 400K personnalisée.

## B. Validation de la puce à façon par l'analyse d'une cohorte

Pour cette étude, les 171 CNV détectés et sélectionnés ont été regroupés en deux classes de CNV, communs et peu fréquents ou rares.

### 1. CNV récurrents

L'analyse de cette cohorte de patients infertiles a permis l'identification de plusieurs CNV récurrents classés VOUS comportant des gènes candidats pour l'infertilité masculine.

#### 1.1. CNV associés à une délétion

Parmi ces CNV, des microdélétions de l'intron 6 à l'exon 8 du gène *DAZL*, ont été retrouvés chez 4 patients de la cohorte. Les gènes de la famille *DAZ*, ainsi nommés pour «deleted in azoospermia», sont des gènes candidats pour l'azoospermie. Le gène *DAZL* est l'homologue autosomal (plus de 99% d'homologie de séquence) de *DAZ* sur le chromosome 3. Bien que cette région soit couverte dans la base de données DGV, ce gène semble jouer un rôle essentiel dans la spermatogenèse chez la souris comme chez l'homme. Chez la souris, une invalidation du gène *Dazl* à l'état homozygote entraîne une absence de maturation des cellules germinales, les tubes séminifères ne contenant que des cellules de type spermatogonie A (très peu de spermatozoïdes). Ainsi, l'invalidation du gène *DAZL* s'accompagne d'une absence complète de production des gamètes (Schrans-Stassen *et al.*, 2001). Chez l'homme, l'association de SNP lié au gène *DAZL* avec l'infertilité masculine a été rapportée, rendant son implication plus que probable et en fait donc un excellent gène candidat pour l'infertilité masculine (Xu *et al.*, 2014, Nailwal & Chauhan, 2017).

Parmi les 43 patients, 14 présentent une délétion hétérozygote (10 patients) ou homozygote (4 patients) intronique du gène *ESR1*. Le développement de lignées de souris mâles transgéniques dépourvues du récepteur aux œstrogènes (*ESR1*), a permis d'apporter des preuves supplémentaires sur les effets des œstrogènes sur la fonction et le développement testiculaires. Ces souris sont en effet infertiles (Korach, 1994, Couse *et al.*, 1999). D'autres études supportent également l'importance de la voie de signalisation médiée par les œstrogènes dans la fonction reproductrice chez l'homme (Galan *et al.*, 2005, Safarinejad *et al.*, 2010). Chez l'homme, *ESR1* est exprimé dans les tissus reproducteurs et plus spécifiquement au niveau des cellules de Leydig (Pelletier & El-Alfy, 2000). Des polymorphismes du gène *ESR1* ont été associés au phénotype d'infertilité masculine (Safarinejad *et al.*, 2010). D'autres chercheurs rapportent qu'une forte concentration en œstrogènes est couplée à un nombre faible de spermatozoïdes (Guarducci *et al.*, 2006). Il manque cependant des données supplémentaires pour conclure véritablement sur l'implication du gène *ESR1* dans l'infertilité masculine (Suzuki *et al.*, 2002, Galan *et al.*, 2005, Safarinejad *et al.*, 2010).



Les variants bénins ou polymorphismes du nombre de copies de l'ADN couvrent environ 12% de l'ensemble du génome dans la population générale (Redon *et al.*, 2006). Certains polymorphismes sont fréquents alors que d'autres sont très rares soulignant tout l'intérêt de rapporter ces CNV rares considérés comme polymorphes dans les bases de données. Dans le cas du CNV concernant le gène *ESR1*, 14 patients de la cohorte présentent cette microdélétion intronique à l'état hétérozygote ou homozygote. Cela suggère que ce CNV puisse correspondre à un polymorphisme. De plus, celui-ci est couvert dans la base de données DGV. Afin de confirmer que ce microremaniement est un polymorphisme sans impact sur la fonction du gène *ESR1*, il pourrait être intéressant de vérifier que cette microdélétion intronique n'ait pas d'effet sur l'épissage du transcrit *ESR1* en séquençant son ARN messenger. En effet, si après épissage aucun exon n'est affecté par la microdélétion intronique 7-8 du gène *ESR1*, alors cela suggérerait que cette délétion intronique n'ait pas d'incidence sur l'expression du récepteur ESR1. Le même raisonnement peut être tenu pour les variants associés aux gènes de la famille *POTE*. En effet, des CNV contenant ces gènes sont retrouvés au total chez 20 patients différents de la cohorte. Les protéines *POTE* sont exprimées dans les spermatocytes primaires, ou encore les spermatides ce qui a conduit certains auteurs à proposer leur implication dans la spermatogenèse (Ise *et al.*, 2008, Bera *et al.*, 2012). Malgré tout, aucune corrélation particulière entre les gènes *POTE* et la fonction testiculaire n'a été décrite.

Une autre délétion intronique partagée par 3 patients de la cohorte a été identifiée et concerne le gène *LEPR*. Il s'agit du gène qui code pour le récepteur de la leptine et des variations génétiques dans ce gène et celui codant pour la leptine sont considérés comme facteur de risque pour l'infertilité masculine (Hodzic *et al.*, 2017, Khosropour *et al.*, 2017). Mais à nouveau, il reste à prouver que la délétion intronique a un impact sur l'épissage alternatif de ce gène.

Parmi les autres CNV récurrents au sein de cette cohorte, d'autres gènes d'intérêt ont été sélectionnés. Des candidats directement impliqués dans le processus de spermatogenèse tel que *SIX5*, un facteur de transcription qui semble impliqué dans l'organogenèse, retrouvé à l'état délété (exons 1 à 2) chez 3 patients. En effet, muté à l'état homozygote chez la souris, *SIX5* induirait une apoptose importante des cellules germinales et une hyperprolifération des cellules de Leydig (Sarkar *et al.*, 2004).

## 1.2. CNV associés à un gain

Il est habituellement établi que les duplications sont des altérations génétiques mieux tolérées dans le génome que les délétions. Ainsi, les CNV à l'état délété ont une plus grande probabilité d'être pathogènes. Pourtant, les CNV associés à une perte de matériel génétique à l'état hétérozygote peuvent être fréquemment observés chez des individus en bonne santé. De même que des délétions homozygotes ont également été observées dans des génomes d'individus sains, bien que beaucoup moins décrits dans la littérature. Il faut garder à l'esprit qu'un gain (duplication,



triplication ou amplification), peut impliquer une insertion à proximité ou non de la séquence d'origine. Ainsi, bien que difficile à interpréter sans analyses complémentaires, il ne faut pas sous-estimer l'effet des duplications sur le phénotype de l'infertilité comme tout autre phénotype. Par ailleurs, des variants à zéro, une ou deux copies chez des personnes en bonne santé peuvent, si présent à plus de deux copies, être moins bien tolérés par un individu.

La protéine SYCE1 constitue un des composants principaux de l'élément central du complexe synaptonémal qui se forme entre les chromosomes homologues au cours de la prophase méiotique. De ce fait, il constitue un élément indispensable lors de la méiose pour des phénomènes essentiels tels que la recombinaison homologue et le processus de synapsie (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Au total, 5 patients présentent un gain du gène *SYCE1* dans son intégralité. Néanmoins, aucune donnée sur l'effet du surdosage du gène *SYCE1* n'a été rapportée. La position de cette duplication au sein du génome par la technique de FISH ou de séquençage nous indiquerait si la duplication s'est insérée en interrompant la séquence du gène *SYCE1* ou ailleurs dans le génome.

L'analyse de la duplication du gène *H2FBWT*, d'après la base de données du laboratoire, montre qu'il s'agirait d'un polymorphisme d'autant que cette région est très couverte en gain dans la base données DGV. Malgré l'hypothèse de l'implication potentielle de polymorphismes du gène *H2FBWT* dans l'infertilité de la population chinoise (Ying *et al.*, 2012), ces résultats ne nous permettent pas de conclure avec certitude sur d'éventuel impact de ce gène sur l'infertilité.

Les gènes dont l'expression spécifique (*TTY2*), prédominante (*TP53TG3*) ou simplement rapportée au sein du tissu testiculaire (*CYP2E1*, les gènes de la famille *POTE*) ont également retenu notre attention (Ng *et al.*, 1999, Nixon *et al.*, 2014). Mais leur relation avec le phénotype d'infertilité masculine reste néanmoins discutable, celle-ci n'ayant pas été décrite dans la littérature.

### 1.3. Récurrence et association de variants

Au sein de la cohorte de patients, deux CNV (duplication et délétion) localisés dans les régions 1p13.3 et 22q11.23 ont été observés. Ces CNV comprennent respectivement les gènes *GSTM1* et *GSTT1*. Sur 24 des 43 patients, le variant contenant le gène *GSTM1* est retrouvé à l'état dupliqué (5 patients) ou délété (19 patients), et pour 18 patients le variant contenant le gène *GSTT1* est retrouvé à part égale à l'état dupliqué ou délété. Une combinaison de ces deux variants est observée chez 13 patients. Une étude statistique d'analyse de liaison SNP a montré que le gène *GSTM1* aurait un impact négatif sur la spermatogenèse (Roshdy *et al.*, 2015). Les hommes porteurs d'une délétion à l'état homozygote de gène *GSTM1* montrent des concentrations de spermatozoïdes significativement plus faibles comparés aux hommes non délétés (Roshdy *et al.*, 2015).

Parallèlement, d'autres études suggèrent que l'association de variants dans ces deux gènes *GSTM1* et *GSTT1* est plus souvent retrouvée chez des hommes infertiles que chez des patients fertiles et représenterait à ce titre un facteur de risque d'infertilité masculine (Jaiswal *et al.*, 2012, Salehi *et al.*, 2012). Toutefois, 29 patients sur 43 de notre cohorte présentent au moins un





microremaniement de ces régions, ce qui nous laisse supposer que l'association de ces deux CNV serait en réalité des polymorphismes au sein de la population. Certains CNV peuvent être pathogènes mais présenter une pénétrance incomplète et une expressivité variable. Ces phénomènes expliqueraient que l'on puisse trouver des polymorphismes dans ces gènes à la fois de manière fréquente chez les hommes infertile mais également au sein d'individus sains. L'analyse de la survenue de ce variant par CGH-array à façon au sein d'une cohorte d'hommes fertiles, normospermes, fournirait des éléments de réponses à ce questionnement. En effet, si ces deux microremaniements chromosomiques étaient également retrouvés en association au sein d'une cohorte d'hommes fertiles, l'association de variants de ces deux gènes comme facteur de risque pour l'infertilité masculine pourrait être exclue.

Les CNV qui existent à la fois à l'état délété et dupliqué dans une population sont encore plus difficiles à interpréter en l'absence de données corrélatives supplémentaires. C'est le cas dans cette étude des CNV comprenant les gènes *GSTM1*, *GSTT1*, et *TTY22*. Des CNV peuvent tout aussi bien s'observer à l'état dupliqué chez des personnes fertiles et pourtant être associés à une infertilité à l'état délété.

## 2. Identification de CNV isolés au sein de la cohorte

Les variants peu communs et moins fréquemment partagés sont supposés représenter des événements plus récents dans l'histoire de l'évolution. Parmi les 171 CNV sélectionnés au sein de notre cohorte de patient azoospermes-cryptozoospermes, 47 d'entre eux correspondant à des variants rares comportant un(plusieurs) gène(s) candidat(s).

Si l'on considère les gènes enrichis spécifiquement sur cette puce à façon, 10 CNV d'intérêt ressortent de cette analyse parmi lesquels 10 gènes ont été associés de façon plus ou moins forte à l'infertilité. Ces gènes ont été sélectionnés grâce à l'étude de modèles de souris infertiles chez lesquelles certains de ces gènes ont été invalidés et à la fréquence plus importante d'un ou plusieurs polymorphismes nucléotidiques dans une population d'hommes infertiles. Les candidats retenus codent pour des protéines testiculaires (*TGFβ1* et *ATRX*), possédant un rôle critique dans la spermatogenèse chez la souris (*EGR4*, *SLC4A2*, *SYCE1* et *GAL3ST1*) et/ou l'homme (*ADCY3* et *SYCE1*), impliquées dans la prolifération et la survie des cellules germinales (*PTPN11*), ou liés à des phénotypes d'obésité sévère associées à une infertilité (*SH2B1*) et enfin des gènes dont les polymorphismes ont été associés à l'infertilité chez l'homme (*APOB*).

Il est intéressant de remarquer que cette analyse pangénomique a également permis de retenir 23 gènes non enrichis sur cette puce. Parmi eux, nous avons identifié des délétions concernant les gènes *NOTCH2*, *PTCHD3*, *NPHP1*, *BTNL2* ou encore *MEIG1*, gènes candidats pour l'infertilité. Le gène *PTCHD3* présente une expression spécifique aux cellules germinales masculines (Fan *et al.*, 2007). Chez la souris, le rat ou encore l'homme, l'ARN messager de *Ptchd3* a été détecté de façon exclusive dans le testicule et son expression s'est révélée être spécifique des cellules germinales mâles. *Ptchd3* est un nouveau gène spécifique des cellules germinales masculines pouvant être impliqué dans le développement et ou la formation du spermatozoïde (Fan *et al.*, 2007). *NOTCH2* et *PTCHD3* s'expriment également tous deux dans la lignée germinale. Une expression des composants

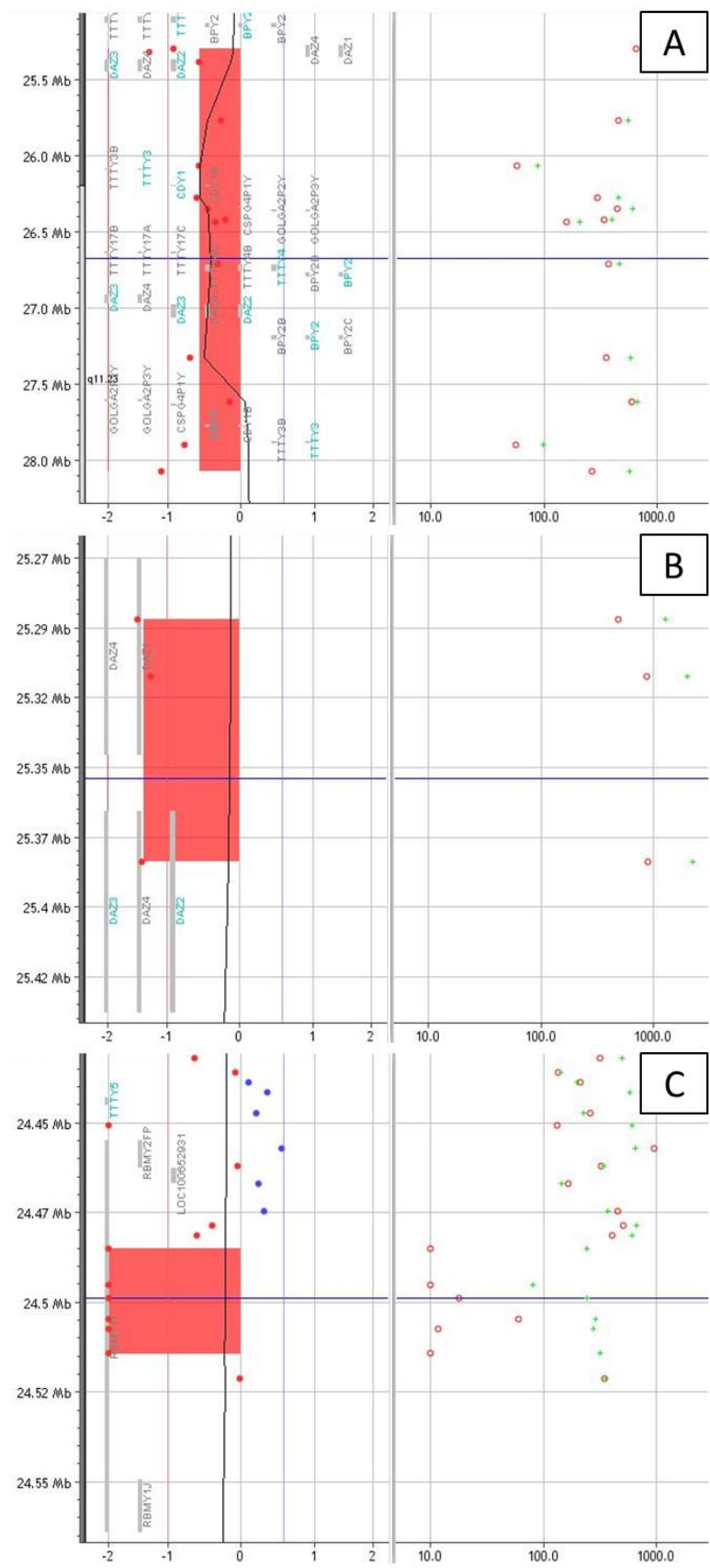


Figure 47 : Profil de CGH-array des délétions Yq11.223q11.23 de la région AZFc des patients P35 (2,7 Mb) (A), P22 (87 kb) (B) et P14 (29,4 kb) (C).

de la voie de Notch dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli de souris néonatales a été rapportée (Dirami *et al.*, 2001). De plus, une corrélation entre le profil d'expression du gène *NPHP1* dans les cellules germinales et le phénotype d'infertilité masculine a été observé (Devi *et al.*, 2015). Dans notre cohorte, une délétion emportant la région de l'exon 1 à l'intron 2 du gène *BTNL2* a été mise en évidence. Une étude a associé les variants dans la région HLA, comprenant notamment le gène *BTNL2*, au risque d'azoospermie non-obstructive (Zhao *et al.*, 2012). Enfin, le gène méiotique, *MEIG1*, dupliqué chez l'un de nos patients, est décrit chez la souris comme responsable d'une altération de la spermatogenèse à l'état délété (Salzberg *et al.*, 2010, Teves *et al.*, 2013).

### 3. Microdélétions des régions AZF

Le facteur AZF, comprenant les régions AZFa, AZFb et AZFc et les gènes qui les composent, est connu pour être crucial au maintien du bon déroulement de la spermatogenèse (Ravel *et al.*, 2006). Les microdélétions Yq sont associées à des phénotypes variables allant de l'azoospermie à l'oligozoospermie sévère. De ce fait, l'analyse par PCR des régions AZF du chromosome Y est maintenant réalisée de façon routinière dans le cadre du bilan d'infertilité chez l'homme. Ainsi, nous avons choisi de ne pas inclure dans notre cohorte les patients présentant une microdélétion des régions AZF, la cause de leur infertilité étant de ce fait expliquée. Malgré cela, 5 patients de la cohorte présentent une délétion dans l'une des régions AZF par CGH-array à façon. Une délétion partielle de la région AZFb emportant l'intron 1 du gène *RBMY1F* (patient P14) et 4 délétions partielles de la région AZFc impliquant les gènes de la famille *DAZ* ou encore *CDY* et *BPY* (patients P22, P32, P35 et P37).

Pour analyser les CNV dans ces régions AZF, la présence de séquences répétées, en particulier pour la région AZFc, rend l'enrichissement en sondes, et parfois l'interprétation, difficiles. En effet, pour deux des microdélétions de la région AZFc (patients P32 et P35), une déviation importante de la ligne de base (de même envergure pour les deux patients) est observée pour le patient P35 (Figure 47A). Ainsi, il est fort probable que pour ces deux CNV la délétion corresponde à un artefact plutôt qu'à une réelle délétion. De même, parmi les trois gains des régions AZFc (patients P13, P20 et P39) observées, toutes présentent une déviation de la ligne de base non négligeable et n'ont alors pas été retenues comme cause directe de l'infertilité de nos patients. Une confirmation par qPCR est en cours.

Néanmoins, pour trois des CNV des régions AZF, nous observons bien des microdélétions des régions AZFb (patient P14) et AZFc (patients P22 et P37) (Figure 47B et C). Ainsi, pour ces patients pourtant négatifs pour la recherche des microdélétions des régions AZF par PCR, l'existence de microdélétions Yq ont été mises en évidence par CGH-array à façon. Un lien de causalité évident pouvant expliquer le phénotype d'infertilité de ces patients. Ces résultats révèlent à la fois les limites de la technique PCR pour l'analyse de ces régions et montre tout l'intérêt d'utiliser une CGH-array haute densité enrichie au niveau des gènes de l'infertilité masculine afin de déceler des anomalies chromosomiques de petite taille ou localisées dans des régions difficiles d'interprétation en biologie moléculaire. Les qPCR sont en cours afin de valider ou non la présence de ces variants.

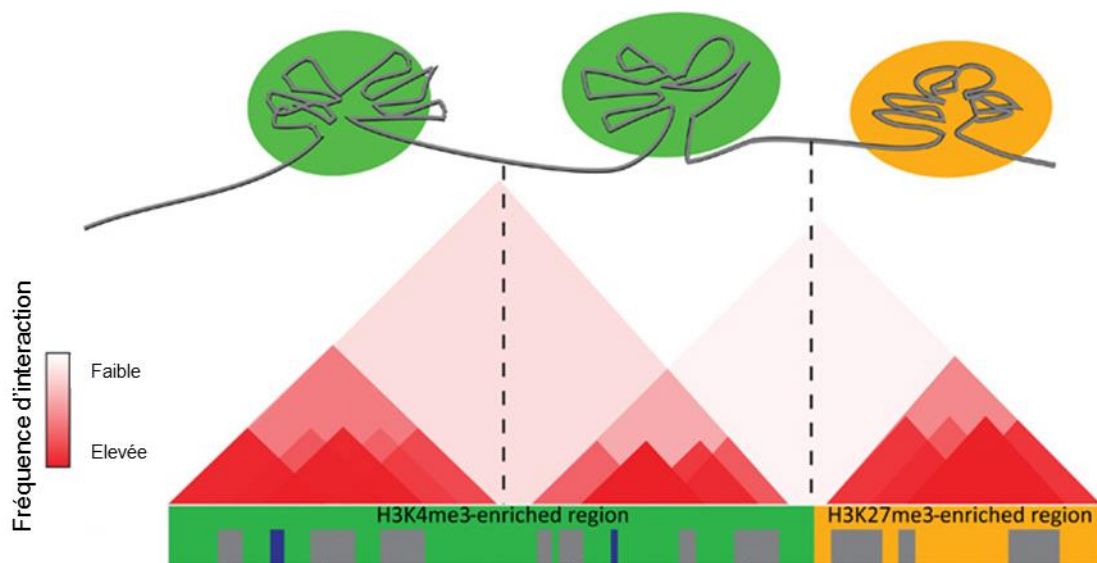


Figure 48 : Interaction et « topologically associating domains » ou TAD. Dans les noyaux, le génome est compartimenté sur la base d'interactions préférentielles entre les éléments génomiques, formant des structures appelées TAD. La structure de la chromatine active (vert) et la structure de la chromatine transcriptionnellement réprimée (orange) sont représentées (adapté de Aranda *et al.*, 2015).

#### 4. CNV et proximité de séquence génique d'intérêt

La pertinence clinique potentielle d'un CNV augmente par rapport à son contenu en gènes. Ceci est particulièrement vrai si ces gènes comprennent des gènes OMIM morbides, connus pour être impliqués dans le phénotype d'infertilité. Les CNV associés à des « déserts » géniques et dépourvus d'éléments régulateurs connus sont difficiles à interpréter. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les réarrangements de séquences non codantes peuvent également perturber la régulation des gènes.

Il manque encore de nombreuses informations génotypiques et phénotypiques concernant environ 80% à 90% de nos gènes codants et pour presque tous les gènes et les éléments régulateurs de l'ARN non codant (Tommerup *et al.*, 2015). Les techniques de ligature de proximité, également connues sous le nom de capture de conformation chromosomique (3C), ont aidé à analyser le repli de la chromatine dans le noyau et ainsi comprendre l'organisation génomique en identifiant les points de contact et d'interaction de la chromatine (Dali & Blanchette, 2017). Des études récentes ont démontré que les chromosomes, chez certains d'organismes, sont compartimentés en différents types de domaines de la chromatine (Dekker & Heard, 2015). Chez les mammifères, les chromosomes forment des compartiments chromatiniens, des domaines de grande taille de l'ordre de la mégabase, appelés « topologically associating domains » ou TAD (Dixon *et al.*, 2012, Nora *et al.*, 2012, Sexton *et al.*, 2012, Aranda *et al.*, 2015) (Figure 48). Il s'agit d'unités structurales partagées entre les différents types cellulaires et conservées entre les espèces. Ces domaines sont indispensables pour de nombreux processus tels que la régulation de l'expression des gènes et la réplication de l'ADN (Dekker & Heard, 2015). Tout variant contenant des gènes ou non peut interférer avec la structure de ces TAD chromatiniens. La modification structurale du domaine TAD générée par la survenue d'un variant du nombre de copie peut par conséquent avoir une incidence non négligeable sur l'expression de gènes avoisinants.

Dans cette étude, nous avons au total identifié 13 CNV localisés à une distance de 1Mb ou moins d'un gène d'intérêt spécifiquement enrichi sur la puce à façon. A ce jour, l'interprétation des déséquilibres dans les déserts géniques reste difficile mais avec l'émergence de nouveaux outils d'analyse tel que la visualisation des TAD, nous pourrions peut-être nous affranchir des soucis d'interprétation que soulèvent l'analyse de certains CNV. Plusieurs outils différents sont disponibles pour la prévision des TAD, mais l'exactitude de leurs propriétés n'a pas complètement été évaluée. En effet, des différences existent entre outils dans la prédiction des TAD qui varient en termes de taille, de nombre mais aussi d'autres propriétés biologiques tels que les sites de liaison CTCF (Dali & Blanchette, 2017). Une amélioration de cet outil de prédiction pour corriger cette variabilité des données est indispensable afin que tout utilisateur puisse interpréter correctement ses données.

#### 5. CNV et désordre du développement sexuel

Les troubles du développement sexuel sont définis comme des conditions congénitales dans lesquelles le développement des sexes chromosomiques, gonadique ou anatomique est atypique. Les patients présentant un désordre du développement sexuel sont très rares. Nous avons donc pour



cette partie recruté et analysé uniquement deux patients. Chez les patients classés selon le terme DSD 46,XY ou 46,XX avec anomalies du développement sexuel, souvent aucune étiologie spécifique n'est établie.

La différenciation sexuelle est un processus en cascade mettant en jeu différents systèmes de contrôle (génétiques, paracrines, endocrines). Des défauts de fonctionnement d'un ou plusieurs de ces mécanismes, à un moment important et précis du développement embryonnaire ou foetal conduisent le plus souvent à une situation de développement du tractus génital incomplet soit plus rarement à la persistance de structures anatomiques appartenant aux deux sexes.

Comme beaucoup de gènes impliqués dans le développement gonadique sont sensibles aux effets de dose, ce phénotype peut être causé par des variations de nombre de copies affectant ces gènes. L'objectif de cette étude a été, par l'analyse moléculaire de deux patients DSD, d'identifier l'origine de cette discordance entre sexe chromosomique et sexe phénotypique et donc d'établir un diagnostic. Par conséquent, nous avons proposé une analyse pangénomique par CGH-array enrichie au niveau de 87 gènes associés au désordre du développement sexuel. L'évaluation de chacun des patients comprend des paramètres cliniques, hormonaux, ainsi que des paramètres histologiques. La CGH-array est devenu un outil puissant pour identifier les CNV du génome et donnera de nouvelles pistes sur les voies impliquées dans le développement et les dysfonctionnements des gonades chez l'homme.

#### 5.1. Patient 2 : 46,XX-SRY-négatif DSD et phénotype masculin

Le syndrome masculin 46,XX ou trouble testiculaire de la différenciation sexuelle est un état rare caractérisé par une gamme de caractéristiques cliniques variées, allant de l'homme aux organes génitaux ambigus à normaux (Alves *et al.*, 2010). Tous sont caractérisés par une infertilité causée par l'absence des régions AZF du bras long du chromosome Y. Le patient 2, est un patient phénotypiquement masculin mais présentant une malformation uro-génitale sévère à type DSD marqué par un hypospade et la présence d'un reliquat müllérien. L'analyse chromosomique a montré un caryotype 46,XX. Bien que la majorité des hommes 46,XX comporte dans leur génome une translocation gonosomique ou autosomique du gène *SRY*, nous n'avons pas mis en évidence la présence de ce gène par FISH et PCR.

Les divers cas répertoriés de DSD 46,XX-SRY-négatif (chez l'homme ou l'équivalent chez la souris) ont permis d'identifier plusieurs gènes d'intérêt pouvant être associés au phénotype du patient. Une absence de délétion ou de duplication dans des régions clés telles que *SOX9*, *DAX-1*, *SF-1*, *WT1*, *GATA4*, *WNT4*, *FGF9* et *RSPO1* a été vérifiée par CGH-array à façon ciblant tous les gènes connus de la cascade de la différenciation sexuelle. De même, chez ce patient, aucune évidence de duplication de la région régulatrice en amont de *SOX9*, *TESCO*, n'a été constatée (Hyon *et al.*, 2015). Enfin, aucun autre variant d'intérêt hors polymorphisme n'a été mis en évidence.

Un séquençage génome entier a donc été entrepris. L'analyse bioinformatique est en cours mais l'analyse préliminaire a identifié un variant rare d'intérêt (chr19:2250720) dans le gène codant pour l'AMH et non répertorié dans les bases de données. Ce variant de l'AMH ne permet pas d'expliquer la réversion sexuelle. Une ou plusieurs anomalie(s) dans un(d'autres) gène(s) ont





certainement fait peser la balance de la différenciation sexuelle vers un développement masculin malgré un sexe chromosomique féminin et l'absence du gène *SRY*. Ainsi, dans ce cas précis, l'absence ou la perturbation de l'expression du gène de l'AMH pourrait expliquer l'absence incomplète de régression des canaux de Müller qui évoluent en utérus, trompes de Fallope et partie supérieure du vagin et ainsi la présence de ce reliquat müllérien. La différenciation masculine des organes génitaux externes étant sous la dépendance de la testostérone et de sa conversion en DHT, l'ambiguïté des organes génitaux externes peut être un symptôme lié au faible taux de testostérone du patient.

En conclusion, cet homme 46,XX-*SRY*-négatif présente une masculinisation qui ne peut être attribuée à la présence de CNV au niveau des gènes clés connus de la différenciation sexuelle. Cependant, la présence de mutations fonctionnelles gain de fonction (gènes pro-testiculaires) ou perte de fonction (gènes pro-ovariens) dans un ou plusieurs des gènes en aval du gène *SRY* est à envisager pour déterminer l'origine de cette réversion sexuelle.

## 5.2. Patient 3 : gène *WFOX* et désordre du développement sexuel

Le patient 3, un garçon de 6 ans, présente dès la naissance des organes génitaux ambigus. L'analyse chromosomique a montré un caryotype 46,XY et des études moléculaires par FISH ont démontré la présence du gène *SRY*. Ces anomalies des organes génitaux ont été explorées par génitographie qui a montré la présence d'une cavité solide de type reliquat müllérien. L'analyse histologique des cavités et des tissus prélevés chirurgicalement, a montré la présence d'un vagin avec en périphérie des structures glandulaires évoquant des vésicules séminales, d'un utérus et à droite la présence d'une trompe ainsi qu'une bandelette fibreuse. Les différents éléments prélevés au niveau de la bandelette fibreuse montrent un stroma ovarien, renfermant des tubules immatures ainsi qu'une zone évoquant des structures canalaire de type épидидyme. Ainsi, malgré le sexe chromosomique masculin du patient, on constate la persistance de reliquats müllériens à savoir, un utérus, une trompe utérine et un vagin. Comme pour le patient 2, la persistance de tels reliquats müllériens sous entendent une possible perturbation dans l'action ou l'expression de l'AMH. Par conséquent, les canaux de Wolff se sont plus ou moins développés (épидидyme, canaux déférents et vésicules séminales) mais les canaux de Müller n'ont pas régressé. Un développement de type masculin s'est tout de même déclenché, malgré un hypospade et une absence de canaux déférents à gauche. Enfin, aucun ovocyte n'a été observé, il n'y a alors aucun argument en faveur d'une situation d'ovotestis à l'histologie.

Les taux sanguins en inhibine B se sont révélés significativement bas (26 pg/ml). L'inhibine B représente un marqueur de la fonction sertolienne, son taux abaissé est un signe de disfonctionnement testiculaire. Les tests hormonaux ont montré un taux de testostérone normal associé à un taux bas de DHT (5 nmol/l). Ces taux bas en DHT laissent penser à un déficit en 5-alpha réductase. Cette enzyme catalyse la conversion de la testostérone en DHT, hormone indispensable à la différenciation masculine des organes génitaux externes et au développement du tractus uro-génital masculin. Le déficit en 5-alpha réductase est une pathologie rare entraînant chez les patients un DSD défini par une différenciation incomplète des organes génitaux chez un patient de caryotype XY



(bourgeon génital, hypospadias et scrotum bifide) avec présence d'une cavité postérieure à type de reliquat vaginal. Le séquençage des gènes codant pour cette enzyme (*SRD5A1* et *SRD5A2*) est donc nécessaire pour répondre à cette éventualité.

L'ADN génomique du patient a été analysé par CGH-array à façon. Cette analyse a révélé une délétion intronique (intron 5) hétérozygote de 12,3 kb au sein du gène *WWOX*. Le gène *WWOX* se situe sur le bras long du chromosome 16 dans la région 16q23.1, un site fragile connu pour être souvent réarrangé dans un large éventail de cancers. Il est composé au total de neuf exons et comprend des domaines WW (interactions protéine-protéine) et d'un domaine SDR. Dans la littérature, il a été rapporté que le gène *WWOX* était impliqué dans le métabolisme des stéroïdes et qu'il inhiberait la voie Wnt/ $\beta$ -catenin de manière dose-dépendante (Aqeilan *et al.*, 2009, Bouteille *et al.*, 2009). Les modèles de souris d'inactivation du gène *WWOX* décrits ont montré des anomalies gonadiques incluant des défauts dans la fonction des cellules de Leydig (Ludes-Meyers *et al.*, 2007, Aqeilan *et al.*, 2009). Ceci soutient donc l'hypothèse de l'implication du gène *WWOX* dans le développement gonadique. Chez l'homme, une seule étude a décrit un microremaniement affectant la séquence codante de *WWOX* associé à un cas de DSD 46,XY (White *et al.*, 2012). En effet, le patient décrit dans cette étude présente une délétion emportant les exons 6 à 8, emportant ainsi le domaine SDR, chez un garçon aux organes génitaux ambigus à la naissance (tissu gonadique indifférencié, testicules immatures, cellules germinales malignes, vagin et utérus sous-développé) et ce malgré un caryotype masculin 46,XY et la présence du gène *SRY* (White *et al.*, 2012). Dans notre cas, seul un intron est délété. Bien que le phénotype du patient 3 soit très proche de celui du patient publié, l'impact éventuel de la délétion sur l'épissage alternatif du gène *WWOX* reste à prouver.



## **PERSPECTIVES**



## I. Cellules iPS et différenciation germinale

En terme de perspectives, il serait intéressant d'élargir le protocole de différenciation à un plus grand nombre de lignée iPS issues de patients infertiles différents : anomalie chromosomique de nombre (47,XXY, 47,XYY), de structure, mais également des patients présentant un caryotype normal et dont les analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence un variant d'intérêt (mutation, CNV ou SNP).

Dans cette optique, afin d'estimer l'implication d'un gène particulier dans la fonction de reproduction, nous pourrions envisager de travailler sur une lignée iPS normale dans laquelle nous pourrions invalider le gène de notre choix. Pour cela, nous pourrions utiliser la méthode de « gene silencing » qu'offre l'utilisation des siRNA. La transfection de siRNA est une approche qui permet d'inhiber l'expression des gènes et donc de réguler leur expression en ciblant et dégradant les ARNm.

De même, corriger les cellules iPS de patients infertiles porteurs d'une mutation grâce à la technologie CRISPR/cas9 avant différenciation et comparer leur potentiel de différenciation au cours des différentes étapes de la spermatogenèse avec leur homologue non corrigé constituerait une manière fiable de confirmer l'impact d'un gène candidat dans la fonction de reproduction. Le système CRISPR/Cas9 est un outil génétique de transformation du génome qui a vu son essor ces deux dernières années (White *et al.*, 2015). Le principe de la CRISPR/Cas9 repose sur l'aptitude d'une protéine capable de « couper » l'ADN (Cas9) permettant de modifier, de façon spécifique et à un endroit très précis, le génome. Cet outil permettrait ainsi de réprimer l'expression d'un gène d'intérêt en ciblant et rectifiant l'ADN génomique directement.

Enfin, une des principales perspectives de ce travail est de tenter d'obtenir *in vitro* des cellules germinales à des stades plus avancés dans la spermatogenèse afin de créer un véritable modèle génétique *in vitro* de la méiose dans un contexte d'anomalie génétique. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le gène *SYCP3* ne s'exprimant que dans la lignée germinale au cours de la méiose, seule une différenciation plus aboutie des CGP permettrait de déterminer l'implication réelle du gène *SYCP3* dans l'infertilité de ce patient.

Une étude très récente menée par Hirota et son équipe, rapporte la génération de cellules iPS à partir de souris XXY et XYY ainsi que leur différenciation vers la lignée germinale. Cette différenciation a abouti en la formation de spermatozoïdes fonctionnels qui ont conduit, par ICSI, à la production de souriceaux XXY et XYY fertiles. (Hirota *et al.*, 2017). Chez les patients atteints du syndrome de klinefelter (47,XXY) ou du double Y (47,XYY), la spermatogenèse est perturbée du fait de la présence en excès d'un des gonosomes (excès de gènes) (Heard & Turner, 2011). Il serait ainsi intéressant de voir si la même approche peut être utilisée comme traitement de l'infertilité des hommes porteurs de trois chromosomes sexuels. Produire des gamètes *in vitro*, par différenciation cellulaire à partir de cellules souches pluripotentes humaines, est donc un champ de recherche prometteur qui pourra, peut-être dans les années à venir, représenter un traitement de l'infertilité.





## Des améliorations...

Une perspective de cette étude est le parallèle à faire avec des cellules iPS issues de patients normospermes. En particulier, si nous souhaitons pousser la différenciation germinale de nos CGP plus loin dans la spermatogenèse, une comparaison en terme d'expression génique, de marqueurs de surface, de profil de méthylation et de morphologie avec une lignée capable de réaliser la méiose est indispensable. Cette lignée de cellules iPS « normospermes » servirait ainsi de témoin positif et de point de comparaison pour chacune de nos démarches de différenciation et renforcerait la pertinence du protocole utilisé. Par ailleurs, la validation des CGP dérivées d'iPS comme modèle de l'infertilité *in vitro* dans un contexte d'anomalie chromosomique passe par la démonstration de la conservation des caractéristiques moléculaires (RCC et caryotype 46,XX). Il nous faudra ajouter dans notre protocole de différenciation, une étape afin de confirmer le statut chromosomique de nos CGP.

## II. Etude chromosomique des hommes infertiles et perspectives

Nous avons développé et appliqué un nouveau design de CGH-array pour la recherche de déséquilibres génétiques associés à l'infertilité masculine et au DSD. Les résultats obtenus à l'issue de l'analyse de cohorte sont prometteurs et ouvrent ainsi d'autres voies pour la recherche sur l'implication de la génétique dans l'infertilité masculine. En particulier, l'impact des microremaniements cryptiques sur la fonction de reproduction chez l'homme, est encore trop peu documentée dans la littérature scientifique. Cette approche semble également représenter un bon outil de détection des microdélétions des régions AZF. Afin de prouver le potentiel du design que nous proposons en terme de diagnostic, une analyse d'une plus grande cohorte d'hommes infertiles idiopathiques doit être réalisée. Par ailleurs, des études complémentaires et des tests fonctionnels sur la fonction des 21 gènes candidats retenus lors de cette étude seront nécessaires afin d'établir l'impact réel de chacun de ces gènes sur la fonction de reproduction masculine et particulièrement sur l'azoospermie non-obstructive et la cryptozoospermie. La réalisation d'une enquête familiale permettrait de vérifier si un variant annoté VOUS est présent chez les parents pour chacun des patients de la cohorte. Cela faciliterait l'interprétation de certains CNV, notamment pour le patient 3 et le variant du gène *WWOX*. Il serait également intéressant de réaliser une SNP-array dans le cadre d'une étude familiale pour le patient 2 du fait du caractère consanguin de la famille.

Pour compléter cette étude, la cohorte sera élargie à un plus grand nombre de patients pour identifier de nouveaux CNV et gènes associés pouvant être responsables d'anomalies de la reproduction chez l'homme. Mais surtout, afin de pallier au manque d'information sur la fertilité des individus témoins de ces bases de données publiques comme DGV, l'étude d'une cohorte d'hommes sains et fertiles devrait venir compléter l'analyse des données générées par l'utilisation de la CGH-array. En effet, en comparant la cohorte des patients azoospermes-cryptozoospermes et la cohorte d'hommes témoins normospermes fertiles, certains CNV et certains gènes candidats (identifiés statistiquement chez l'homme ou dans des modèles animaux) pourraient alors être écartés.

A terme, cette CGH-array personnalisée pangénomique et ciblée « infertilité masculine » constituerait un bon outil diagnostique pour les patients masculins infertiles au sens large, soit aux indications non restreintes aux anomalies de nombre des spermatozoïdes.



Dans cette cohorte, il a été parfois difficile de distinguer les patients réellement azoospermes des patient cryptozoospermes. Pour la suite du recrutement des patients, seuls les patients pour lesquels une biopsie testiculaire a été effectuée pourraient être inclus. De cette manière, cela fournirait des renseignements précieux sur l'atteinte réelle de la spermatogenèse testiculaire et nous pourrions distinguer les patients infertiles par blocage méiotique des patients présentant une infertilité (azoospermie ou cryptozoospermie) malgré une spermatogenèse complète observé lors de la biopsie testiculaire.

Entre le premier axe d'étude de mon travail de thèse et celui-ci, les perspectives se croisent. En effet, l'analyse de la puce à façon a fourni un certain nombre de gènes candidats pouvant contribuer au phénotype d'infertilité. Ainsi, Il serait intéressant de pouvoir, à partir d'une lignée iPS *in vitro*, inhiber l'expression de gènes candidats associés à un blocage méiotique par l'intermédiaire d'un shRNA ou d'un siRNA avant de différencier ces cellules vers la lignée germinale afin d'estimer leur implication réelle dans l'infertilité masculine.



## **BIBLIOGRAPHIE**



- Aasen, T., A. Raya, M. J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boue and J. C. Izpisua Belmonte, 2008: Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26, 1276-1284.
- Abusheikha, N., A. Lass and P. Brinsden, 2001: XX males without SRY gene and with infertility. *Hum Reprod*, 16, 717-718.
- Agarwal, A., A. Mulgund, A. Hamada and M. R. Chyatte, 2015: A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 37.
- Ahmed, S. F., A. Bashamboo, A. Lucas-Herald and K. McElreavey, 2013: Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *British medical bulletin*, 106, 67-89.
- Alberts, B., A. Johnson and J. Lewis, 2002: Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Meiosis *Garland Science*.
- Aleck, K. A., L. Argueso, J. Stone, J. G. Hackel and R. P. Erickson, 1999: True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *American journal of medical genetics*, 85, 2-4.
- Alvarez-Buylla, A. and H. Merchant-Larios, 1986: Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res*, 165, 362-368.
- Alves, C., Z. Braid, F. B. Coeli and M. P. Mello, 2010: 46,XX male - testicular disorder of sexual differentiation (DSD): hormonal, molecular and cytogenetic studies. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 54, 685-689.
- Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor and J. A. Thomson, 2000: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, 227, 271-278.
- Amps, K., P. W. Andrews, G. Anyfantis, L. Armstrong, S. Avery, H. Baharvand, J. Baker, D. Baker, M. B. Munoz, S. Beil, N. Benvenisty, D. Ben-Yosef, J. C. Biancotti, A. Bosman, R. M. Brena, D. Brison, G. Caisander, M. V. Camarasa, J. Chen, E. Chiao, Y. M. Choi, A. B. Choo, D. Collins, A. Colman, J. M. Crook, G. Q. Daley, A. Dalton, P. A. De Sousa, C. Denning, J. Downie, P. Dvorak, K. D. Montgomery, A. Feki, A. Ford, V. Fox, A. M. Fraga, T. Frumkin, L. Ge, P. J. Gokhale, T. Golan-Lev, H. Gourabi, M. Gropp, G. Lu, A. Hampl, K. Harron, L. Healy, W. Herath, F. Holm, O. Hovatta, J. Hyllner, M. S. Inamdar, A. K. Irwanto, T. Ishii, M. Jaconi, Y. Jin, S. Kimber, S. Kiselev, B. B. Knowles, O. Kopper, V. Kukhareenko, A. Kuliev, M. A. Lagarkova, P. W. Laird, M. Lako, A. L. Laslett, N. Lavon, D. R. Lee, J. E. Lee, C. Li, L. S. Lim, T. E. Ludwig, Y. Ma, E. Maltby, I. Mateizel, Y. Mayshar, M. Mileikovsky, S. L. Minger, T. Miyazaki, S. Y. Moon, H. Moore, C. Mummery, A. Nagy, N. Nakatsuji, K. Narwani, S. K. Oh, S. K. Oh, C. Olson, T. Otonkoski, F. Pan, I. H. Park, S. Pells, M. F. Pera, L. V. Pereira, O. Qi, G. S. Raj, B. Reubinoff, A. Robins, P. Robson, J. Rossant, G. H. Salekdeh, et al., 2011: Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*, 29, 1132-1144.
- Andang, M., A. Moliner, C. A. Doege, C. F. Ibanez and P. Ernfors, 2008: Optimized mouse ES cell culture system by suspension growth in a fully defined medium. *Nat Protoc*, 3, 1013-1017.
- Anderson, R., R. Fassler, E. Georges-Labouesse, R. O. Hynes, B. L. Bader, J. A. Kreidberg, K. Schaible, J. Heasman and C. Wylie, 1999: Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development*, 126, 1655-1664.
- Anokye-Danso, F., C. M. Trivedi, D. Juhr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. A. Epstein and E. E. Morrisey, 2011: Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8, 376-388.
- Aoi, T., K. Yae, M. Nakagawa, T. Ichisaka, K. Okita, K. Takahashi, T. Chiba and S. Yamanaka, 2008: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321, 699-702.
- Aqeilan, R. I., J. P. Hagan, A. de Bruin, M. Rawahneh, Z. Salah, E. Gaudio, H. Siddiqui, S. Volinia, H. Alder, J. B. Lian, G. S. Stein and C. M. Croce, 2009: Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology*, 150, 1530-1535.
- Aranda, S., G. Mas and L. Di Croce, 2015: Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Science advances*, 1, e1500737.
- Armanet, N., L. Tosca, S. Brisset, T. Liehr and G. Tachdjian, 2015: Small Supernumerary Marker Chromosomes in Human Infertility. *Cytogenetic and genome research*, 146, 100-108.
- Aydemir, B., I. Onaran, A. R. Kiziler, B. Alici and M. C. Akyolcu, 2007: Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl*, 9, 108-115.
- Azuara, V., P. Perry, S. Sauer, M. Spivakov, H. F. Jorgensen, R. M. John, M. Gouti, M. Casanova, G. Warnes, M. Merkenschlager and A. G. Fisher, 2006: Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*, 8, 532-538.
- Bai, Q., J. M. Ramirez, F. Becker, V. Pantesco, T. Lavabre-Bertrand, O. Hovatta, J. M. Lemaître, F. Pellestor and J. De Vos, 2015: Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 24, 653-662.
- Ban, H., N. Nishishita, N. Fusaki, T. Tabata, K. Saeki, M. Shikamura, N. Takada, M. Inoue, M. Hasegawa, S. Kawamata and S. Nishikawa, 2011: Efficient generation of transgene-free human induced





- pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14234-14239.
- Bao, S., F. Tang, X. Li, K. Hayashi, A. Gillich, K. Lao and M. A. Surani, 2009: Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature*, 461, 1292-1295.
- Barazani, Y. and E. Sabanegh, Jr., 2015: Rare case of monozygotic twins diagnosed with klinefelter syndrome during evaluation for infertility. *Reviews in urology*, 17, 42-45.
- Bardoni, B., E. Zanaria, S. Guioli, G. Floridaia, K. C. Worley, G. Tonini, E. Ferrante, G. Chiumello, E. R. McCabe, M. Fraccaro and et al., 1994: A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*, 7, 497-501.
- Battle-Morera, L., A. Smith and J. Nichols, 2008: Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*, 46, 758-767.
- Bazley, F. A., C. F. Liu, X. Yuan, H. Hao, A. H. All, A. De Los Angeles, E. T. Zambidis, J. D. Gearhart and C. L. Kerr, 2015: Direct Reprogramming of Human Primordial Germ Cells into Induced Pluripotent Stem Cells: Efficient Generation of Genetically Engineered Germ Cells. *Stem Cells Dev*, 24, 2634-2648.
- Beers, J., K. L. Linask, J. A. Chen, L. I. Siniscalchi, Y. Lin, W. Zheng, M. Rao and G. Chen, 2015: A cost-effective and efficient reprogramming platform for large-scale production of integration-free human induced pluripotent stem cells in chemically defined culture. *Sci Rep*, 5, 11319.
- Belville, C., J. D. Marechal, S. Pennetier, P. Carmillo, L. Masgrau, L. Messika-Zeitoun, J. Galey, G. Machado, D. Treton, J. Gonzales, J. Y. Picard, N. Josso, R. L. Cate and N. di Clemente, 2009: Natural mutations of the anti-Mullerian hormone type II receptor found in persistent Mullerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport. *Hum Mol Genet*, 18, 3002-3013.
- Benko, S., C. T. Gordon, D. Mallet, R. Sreenivasan, C. Thauvin-Robinet, A. Brendehaug, S. Thomas, O. Bruland, M. David, M. Nicolino, A. Labalme, D. Sanlaville, P. Callier, V. Malan, F. Huet, A. Molven, F. Dijoud, A. Munnich, L. Faivre, J. Amiel, V. Harley, G. Houge, Y. Morel and S. Lyonnet, 2011: Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *Journal of medical genetics*, 48, 825-830.
- Bennett, C. P., Z. Docherty, S. A. Robb, P. Ramani, J. R. Hawkins and D. Grant, 1993: Deletion 9p and sex reversal. *Journal of medical genetics*, 30, 518-520.
- Benson, G. V., H. Lim, B. C. Paria, I. Satokata, S. K. Dey and R. L. Maas, 1996: Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*, 122, 2687-2696.
- Bera, T. K., D. A. Walker, R. J. Sherins and I. Pastan, 2012: POTE protein, a cancer-testis antigen, is highly expressed in spermatids in human testis and is associated with apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 417, 1271-1274.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S. Lander, 2006: A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125, 315-326.
- Berta, P., J. R. Hawkins, A. H. Sinclair, A. Taylor, B. L. Griffiths, P. N. Goodfellow and M. Fellous, 1990: Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348, 448-450.
- Bhalla, N., 2010: Meiotic checkpoints: repair or removal? *Curr Biol*, 20, R1014-1016.
- Birch, J. L. and J. C. Zomerdijk, 2008: Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. *Biochemical Society transactions*, 36, 619-624.
- Birk, O. S., D. E. Casiano, C. A. Wassif, T. Cogliati, L. Zhao, Y. Zhao, A. Grinberg, S. Huang, J. A. Kreidberg, K. L. Parker, F. D. Porter and H. Westphal, 2000: The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403, 909-913.
- Blakemore, S. J., S. Burnett and R. E. Dahl, 2010: The role of puberty in the developing adolescent brain. *Human brain mapping*, 31, 926-933.
- Blasco, M. A., M. Serrano and O. Fernandez-Capetillo, 2011: Genomic instability in iPSCs: time for a break. *EMBO J*, 30, 991-993.
- Bock, C., E. Kiskinis, G. Versteppen, H. Gu, G. Boulting, Z. D. Smith, M. Ziller, G. F. Croft, M. W. Amoroso, D. H. Oakley, A. Gnirke, K. Eggan and A. Meissner, 2011: Reference Maps of human ES and iPSC cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, 144, 439-452.
- Bohring, C. and W. Krause, 2003: Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum Reprod*, 18, 915-924.
- Bolcun-Filas, E., Y. Costa, R. Speed, M. Taggart, R. Benavente, D. G. De Rooij and H. J. Cooke, 2007: SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol*, 176, 741-747.
- Bolcun-Filas, E., E. Hall, R. Speed, M. Taggart, C. Grey, B. de Massy, R. Benavente and H. J. Cooke, 2009: Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS genetics*, 5, e1000393.
- Borg, K., P. Stankiewicz, E. Bocian, A. Kruczek, E. Obersztyn, J. R. Lupski and T. Mazurczak, 2005: Molecular analysis of a constitutional complex genome rearrangement with 11 breakpoints involving chromosomes 3, 11, 12, and 21 and a approximately 0.5-Mb submicroscopic deletion in a patient with mild mental retardation. *Human genetics*, 118, 267-275.



- Boroviak, T., R. Loos, P. Bertone, A. Smith and J. Nichols, 2014: The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol*, 16, 516-528.
- Bouchard, M., A. Souabni, M. Mandler, A. Neubuser and M. Busslinger, 2002: Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev*, 16, 2958-2970.
- Bouteille, N., K. Driouch, P. E. Hage, S. Sin, E. Formstecher, J. Camonis, R. Lidereau and F. Lallemand, 2009: Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene*, 28, 2569-2580.
- Brinster, R. L., 1974: The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *The Journal of experimental medicine*, 140, 1049-1056.
- Brons, I. G., L. E. Smithers, M. W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S. M. Chuva de Sousa Lopes, S. K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R. A. Pedersen and L. Vallier, 2007: Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448, 191-195.
- Buaas, F. W., P. Val and A. Swain, 2009: The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. *Hum Mol Genet*, 18, 2989-3001.
- Buecker, C. and N. Geijsen, 2010: Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications. *Cell Stem Cell*, 7, 559-564.
- Burgoyne, P. S., S. K. Mahadevaiah and J. M. Turner, 2009: The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature reviews. Genetics*, 10, 207-216.
- Campolo, F., M. Gori, R. Favaro, S. Nicolis, M. Pellegrini, F. Botti, P. Rossi, E. A. Jannini and S. Dolci, 2013: Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells*, 31, 1408-1421.
- Carter, M. G., B. J. Smagghe, A. K. Stewart, J. A. Rapley, E. Lynch, K. J. Bernier, K. W. Keating, V. M. Hatzioannou, E. J. Hartman and C. C. Bamdad, 2016: A Primitive Growth Factor, NME7AB, Is Sufficient to Induce Stable Naive State Human Pluripotency; Reprogramming in This Novel Growth Factor Confers Superior Differentiation. *Stem Cells*, 34, 847-859.
- Chambers, I., J. Silva, D. Colby, J. Nichols, B. Nijmeijer, M. Robertson, J. Vrana, K. Jones, L. Grotewold and A. Smith, 2007: Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450, 1230-1234.
- Chan, Y. S., J. Goke, J. H. Ng, X. Lu, K. A. Gonzales, C. P. Tan, W. Q. Tng, Z. Z. Hong, Y. S. Lim and H. H. Ng, 2013: Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell*, 13, 663-675.
- Chandley, A. C., P. Edmond, S. Christie, L. Gowans, J. Fletcher, A. Frackiewicz and M. Newton, 1975: Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet*, 39, 231-254.
- Chang, C., Y. T. Chen, S. D. Yeh, Q. Xu, R. S. Wang, F. Guillou, H. Lardy and S. Yeh, 2004: Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6876-6881.
- Chang, H. and M. M. Matzuk, 2001: Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev*, 104, 61-67.
- Chazaud, C., 2008: [Early embryogenesis in mammals: stem cells and first commitment steps]. *Medecine sciences : M/S*, 24, 1043-1048.
- Chen, Y., K. Blair and A. Smith, 2013: Robust self-renewal of rat embryonic stem cells requires fine-tuning of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *Stem Cell Reports*, 1, 209-217.
- Cheng, L., N. F. Hansen, L. Zhao, Y. Du, C. Zou, F. X. Donovan, B. K. Chou, G. Zhou, S. Li, S. N. Dowey, Z. Ye, S. C. Chandrasekharappa, H. Yang, J. C. Mullikin and P. P. Liu, 2012a: Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*, 10, 337-344.
- Cheng, L., N. F. Hansen, L. Zhao, Y. Du, C. Zou, F. X. Donovan, B. K. Chou, G. Zhou, S. Li, S. N. Dowey, Z. Ye, N. C. S. Program, S. C. Chandrasekharappa, H. Yang, J. C. Mullikin and P. P. Liu, 2012b: Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*, 10, 337-344.
- Cheng, P., H. Chen, S. R. Liu, X. Y. Pu and Z. C. A., 2013: SNPs in KIT and KITLG genes may be associated with oligospermia in Chinese population. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 18, 650-654.
- Chianese, C., A. C. Gunning, C. Giachini, F. Daguin, G. Balercia, E. Ars, D. Lo Giacco, E. Ruiz-Castane, G. Forti and C. Krausz, 2014: X chromosome-linked CNVs in male infertility: discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance. *PLoS One*, 9, e97746.
- Chiang, H. S., Y. N. Wu, C. C. Wu and J. L. Hwang, 2013: Cytogenic and molecular analyses of 46,XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 112, 72-78.
- Childs, A. J., H. L. Kinnell, J. He and R. A. Anderson, 2012: LIN28 is selectively expressed by primordial and pre-meiotic germ cells in the human fetal ovary. *Stem Cells Dev*, 21, 2343-2349.
- Chin, M. H., M. J. Mason, W. Xie, S. Volinia, M. Singer, C. Peterson, G. Ambartsumyan, O. Aimiwu, L. Richter, J. Zhang, I. Khvorostov, V. Ott, M. Grunstein, N. Lavon, N. Benvenisty, C. M. Croce, A. T. Clark, T. Baxter, A. D. Pyle, M. A. Teitell, M. Pelegri, K. Plath and W. E. Lowry, 2009: Induced



- pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 5, 111-123.
- Choi, Y., S. Jeon, M. Choi, M. H. Lee, M. Park, D. R. Lee, K. Y. Jun, Y. Kwon, O. H. Lee, S. H. Song, J. Y. Kim, K. A. Lee, T. K. Yoon, A. Rajkovic and S. H. Shim, 2010: Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia. *Hum Mutat*, 31, 788-793.
- Chou, B. K., P. Mali, X. Huang, Z. Ye, S. N. Dowey, L. M. Resar, C. Zou, Y. A. Zhang, J. Tong and L. Cheng, 2011: Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res*, 21, 518-529.
- Clark, A. M., K. K. Garland and L. D. Russell, 2000: 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*, 63, 1825-1838.
- Cocuzza, M., C. Alvarenga and R. Pagani, 2013: The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1, 15-26.
- Collas, P., C. K. Taranger, A. C. Boquest, A. Noer and J. A. Dahl, 2006: On the way to reprogramming cells to pluripotency using cell-free extracts. *Reprod Biomed Online*, 12, 762-770.
- Costa, J. L., G. Meijer, B. Ylstra and C. Caldas, 2008: Array comparative genomic hybridization copy number profiling: a new tool for translational research in solid malignancies. *Seminars in radiation oncology*, 18, 98-104.
- Couse, J. F., S. C. Hewitt, D. O. Bunch, M. Sar, V. R. Walker, B. J. Davis and K. S. Korach, 1999: Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*, 286, 2328-2331.
- Coutton, C., V. Satre, C. Arnoult and P. Ray, 2012: Génétique de l'infertilité masculine: Les nouveaux acteurs. *médecine/sciences*, 28, 513--518.
- Cowan, C. A., J. Atienza, D. A. Melton and K. Eggan, 2005: Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309, 1369-1373.
- Cox, J. J., L. Willatt, T. Homfray and C. G. Woods, 2011: A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *The New England journal of medicine*, 364, 91-93.
- Crocker, M., S. B. Coghill and R. Cortinho, 1988: An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. *Clinical genetics*, 34, 70-73.
- Dadoune, J. P., A. Pawlak, M. F. Alfonsi and J. P. Siffroi, 2005: Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 11, 133-140.
- Daheron, L., S. L. Opitz, H. Zaehres, M. W. Lensch, P. W. Andrews, J. Itskovitz-Eldor and G. Q. Daley, 2004: LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22, 770-778.
- Dali, R. and M. Blanchette, 2017: A critical assessment of topologically associating domain prediction tools. *Nucleic Acids Res*, 45, 2994-3005.
- de Boer, E. and C. Heyting, 2006: The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma*, 115, 220-234.
- De Felici, M., 2013: Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. *Oogenesis*, 19-37.
- de Vries, F. A., E. de Boer, M. van den Bosch, W. M. Baarends, M. Ooms, L. Yuan, J. G. Liu, A. A. van Zeeland, C. Heyting and A. Pastink, 2005: Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*, 19, 1376-1389.
- DeCherney, A. N., L. Laufer, N. Roman, AS., 2012: CURRENT Diagnosis & Treatment: Obstetrics & Gynecology, 11e. *McGraw-Hill LANGE*.
- Dekker, J. and E. Heard, 2015: Structural and functional diversity of Topologically Associating Domains. *FEBS letters*, 589, 2877-2884.
- Deng, J., R. Shoemaker, B. Xie, A. Gore, E. M. LeProust, J. Antosiewicz-Bourget, D. Egli, N. Maherli, I. H. Park, J. Yu, G. Q. Daley, K. Eggan, K. Hochedlinger, J. Thomson, W. Wang, Y. Gao and K. Zhang, 2009: Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol*, 27, 353-360.
- Devi, A. N., T. R. Anil Kumar, S. M. Pillai, K. Jayakrishnan and P. G. Kumar, 2015: Expression profiles of NPHP1 in the germ cells in the semen of men with male factor infertility. *Andrology*, 3, 685-693.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Golland, H. Wichterle, C. E. Henderson and K. Eggan, 2008: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218-1221.
- Dirami, G., N. Ravindranath, M. V. Achi and M. Dym, 2001: Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J Androl*, 22, 944-952.
- Dixon, J. R., S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J. S. Liu and B. Ren, 2012: Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485, 376-380.
- Dohle, G. R., M. Smit and R. F. Weber, 2003: Androgens and male fertility. *World journal of urology*, 21, 341-345.
- Doitsidou, M., M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Kopranner, J. Dorries, D. Meyer, C. V. Esguerra, T. Leung and E. Raz, 2002: Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*, 111, 647-659.



- Donovan, P. J. and M. P. de Miguel, 2003: Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 463-471.
- Dravid, G., Z. Ye, H. Hammond, G. Chen, A. Pyle, P. Donovan, X. Yu and L. Cheng, 2005: Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23, 1489-1501.
- Dudley, B. M., C. Runyan, Y. Takeuchi, K. Schaible and K. Molyneaux, 2007: BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mech Dev*, 124, 68-77.
- Duggal, G., S. Warriar, S. Ghimire, D. Broekaert, M. Van der Jeught, S. Lierman, T. Deroo, L. Peelman, A. Van Soom, R. Cornelissen, B. Menten, P. Mestdagh, J. Vandesompele, M. Roost, R. C. Slieker, B. T. Heijmans, D. Deforce, P. De Sutter, S. C. De Sousa Lopes and B. Heindryckx, 2015: Alternative Routes to Induce Naive Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 33, 2686-2698.
- Dutta, D., S. Ray, P. Home, M. Larson, M. W. Wolfe and S. Paul, 2011: Self-renewal versus lineage commitment of embryonic stem cells: protein kinase C signaling shifts the balance. *Stem Cells*, 29, 618-628.
- Easley, C. A. t., B. T. Phillips, M. M. McGuire, J. M. Barringer, H. Valli, B. P. Hermann, C. R. Simerly, A. Rajkovic, T. Miki, K. E. Orwig and G. P. Schatten, 2012: Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep*, 2, 440-446.
- Ebert, A. D., J. Yu, F. F. Rose, Jr., V. B. Mattis, C. L. Lorson, J. A. Thomson and C. N. Svendsen, 2009: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457, 277-280.
- Eckert, D., K. Biermann, D. Nettersheim, A. J. Gillis, K. Steger, H. M. Jack, A. M. Muller, L. H. Looijenga and H. Schorle, 2008: Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. *BMC Dev Biol*, 8, 106.
- Efroni, S., R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D. J. Hoepfner, C. Dash, D. P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R. D. McKay, K. H. Buetow, T. R. Gingeras, T. Misteli and E. Meshorer, 2008: Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2, 437-447.
- Egozcue, S., J. Blanco, J. M. Vendrell, F. Garcia, A. Veiga, B. Aran, P. N. Barri, F. Vidal and J. Egozcue, 2000: Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*, 6, 93-105.
- Eguizabal, C., N. Montserrat, R. Vassena, M. Barragan, E. Garreta, L. Garcia-Quevedo, F. Vidal, A. Giorgetti, A. Veiga and J. C. Izpisua Belmonte, 2011: Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 29, 1186-1195.
- Eicher, E. M. and L. L. Washburn, 1986: Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual review of genetics*, 20, 327-360.
- Eiges, R., A. Urbach, M. Malcov, T. Frumkin, T. Schwartz, A. Amit, Y. Yaron, A. Eden, O. Yanuka, N. Benvenisty and D. Ben-Yosef, 2007: Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell*, 1, 568-577.
- El-Dahtory, F. and H. M. Elsheikha, 2009: Male infertility related to an aberrant karyotype, 47,XYY: four case reports. *Cases journal*, 2, 28.
- Espejel, S., G. R. Roll, K. J. McLaughlin, A. Y. Lee, J. Y. Zhang, D. J. Laird, K. Okita, S. Yamanaka and H. Willenbring, 2010: Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest*, 120, 3120-3126.
- Esteban, M. A., T. Wang, B. Qin, J. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng and D. Pei, 2010: Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6, 71-79.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman, 1981: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.
- Fan, J., H. Akabane, X. Zheng, X. Zhou, L. Zhang, Q. Liu, Y. L. Zhang, J. Yang and G. Z. Zhu, 2007: Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain containing gene Ptchd3. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 757-761.
- Fang, R., K. Liu, Y. Zhao, H. Li, D. Zhu, Y. Du, C. Xiang, X. Li, H. Liu, Z. Miao, X. Zhang, Y. Shi, W. Yang, J. Xu and H. Deng, 2014: Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 15, 488-496.
- Faunes, F., P. Hayward, S. M. Descalzo, S. S. Chatterjee, T. Balayo, J. Trott, A. Christoforou, A. Ferrer-Vaquer, A. K. Hadjantonakis, R. Dasgupta and A. M. Arias, 2013: A membrane-associated beta-catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Development*, 140, 1171-1183.
- Fei, T., K. Xia, Z. Li, B. Zhou, S. Zhu, H. Chen, J. Zhang, Z. Chen, H. Xiao, J. D. Han and Y. G. Chen, 2010: Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome Res*, 20, 36-44.
- Feng, S., N. V. Bogatcheva, A. A. Kamat and A. I. Agoulnik, 2005: Genetic targeting of relaxin and insl3 signaling in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1041, 82-90.
- Ferlin, A., E. Moro, A. Rossi, B. Dallapiccola and C. Foresta, 2003: The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *Journal of medical genetics*, 40, 18-24.





- Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka and C. Foresta, 2007: Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online*, 14, 734-745.
- Festuccia, N., R. Osorno, F. Halbritter, V. Karwacki-Neisius, P. Navarro, D. Colby, F. Wong, A. Yates, S. R. Tomlinson and I. Chambers, 2012: Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 11, 477-490.
- Ficz, G., T. A. Hore, F. Santos, H. J. Lee, W. Dean, J. Arand, F. Krueger, D. Oxley, Y. L. Paul, J. Walter, S. J. Cook, S. Andrews, M. R. Branco and W. Reik, 2013: FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency. *Cell Stem Cell*, 13, 351-359.
- Finelli, P., A. I. Pincelli, S. Russo, M. T. Bonati, M. P. Recalcati, M. Masciadri, D. Giardino, F. Cavagnini and L. Larizza, 2007: Disruption of friend of GATA 2 gene (FOG-2) by a de novo t(8;10) chromosomal translocation is associated with heart defects and gonadal dysgenesis. *Clinical genetics*, 71, 195-204.
- Flejter, W. L., J. Fergestad, J. Gorski, T. Varvill and S. Chandrasekharappa, 1998: A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *American journal of human genetics*, 63, 794-802.
- Foley, E. A. and T. M. Kapoor, 2013: Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14, 25-37.
- Ford, C. E., P. E. Polani, J. H. Briggs and P. M. Bishop, 1959: A presumptive human XXY/XX mosaic. *Nature*, 183, 1030-1032.
- Foresta, C., E. Moro, A. Rossi, M. Rossato, A. Garolla and A. Ferlin, 2000: Role of the AZFa candidate genes in male infertility. *Journal of endocrinological investigation*, 23, 646-651.
- Fraietta, R., D. S. Zylberstejn and S. C. Esteves, 2013: Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1, 81-88.
- Frappaolo, A., S. Sechi, G. Belloni, R. Piergentili and M. G. Giansanti, 2017: Visualization of cleavage furrow proteins in fixed dividing spermatocytes. *Methods in cell biology*, 137, 85-103.
- Frumkin, T., M. Malcov, M. Telias, V. Gold, T. Schwartz, F. Azem, A. Amit, Y. Yaron and D. Ben-Yosef, 2010: Human embryonic stem cells carrying mutations for severe genetic disorders. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46, 327-336.
- Fujiwara, T., N. R. Dunn and B. L. Hogan, 2001: Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13739-13744.
- Fusaki, N., H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki and M. Hasegawa, 2009: Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 85, 348-362.
- Gafni, O., L. Weinberger, A. A. Mansour, Y. S. Manor, E. Chomsky, D. Ben-Yosef, Y. Kalma, S. Viukov, I. Maza, A. Zviran, Y. Rais, Z. Shipony, Z. Mukamel, V. Krupalnik, M. Zerbib, S. Geula, I. Caspi, D. Schneir, T. Shwartz, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, S. Benjamin, I. Amit, A. Tanay, R. Massarwa, N. Novershtern and J. H. Hanna, 2013: Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504, 282-286.
- Galan, J. J., B. Buch, N. Cruz, A. Segura, F. J. Moron, L. Bassas, L. Martinez-Pineiro, L. M. Real and A. Ruiz, 2005: Multilocus analyses of estrogen-related genes reveal involvement of the ESR1 gene in male infertility and the polygenic nature of the pathology. *Fertil Steril*, 84, 910-918.
- Galan, J. J., M. De Felici, B. Buch, M. C. Rivero, A. Segura, J. L. Royo, N. Cruz, L. M. Real and A. Ruiz, 2006: Association of genetic markers within the KIT and KITLG genes with human male infertility. *Hum Reprod*, 21, 3185-3192.
- Gatinois, V., J. Puechberty, G. Lefort, D. Genevieve and F. Pellestor, 2014: [Complex chromosomal rearrangements: a paradigm for the study of chromosomal instability]. *Medecine sciences : M/S*, 30, 55-63.
- Ge, W., C. Chen, M. De Felici and W. Shen, 2015: In vitro differentiation of germ cells from stem cells: a comparison between primordial germ cells and in vitro derived primordial germ cell-like cells. *Cell death & disease*, 6, e1906.
- Geijsen, N., M. Horoschak, K. Kim, J. Gribnau, K. Eggan and G. Q. Daley, 2004: Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427, 148-154.
- Geisinger, A. and R. Benavente, 2016: Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenetic and genome research*, 150, 77-85.
- Georges, A., D. L'Hote, A. L. Todeschini, A. Auguste, B. Legois, A. Zider and R. A. Veitia, 2014: The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife*, 3.
- Gersen, S. and M. Keagle, 2008: The Principles of Clinical Cytogenetics. *Springer Science & Business Media*.
- Ghosh, Z., K. D. Wilson, Y. Wu, S. Hu, T. Quertermous and J. C. Wu, 2010: Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One*, 5, e8975.
- Gilbert, S., 2000: Developmental Biology. 6th edition. Early Mammalian Development.



- Glass, I. A., K. A. Rauen, E. Chen, J. Parkes, D. G. Alberston, D. Pinkel and P. D. Cotter, 2006: Ring chromosome 15: characterization by array CGH. *Human genetics*, 118, 611-617.
- Gore, A., Z. Li, H. L. Fung, J. E. Young, S. Agarwal, J. Antosiewicz-Bourget, I. Canto, A. Giorgetti, M. A. Israel, E. Kiskinis, J. H. Lee, Y. H. Loh, P. D. Manos, N. Montserrat, A. D. Panopoulos, S. Ruiz, M. L. Wilbert, J. Yu, E. F. Kirkness, J. C. Izpisua Belmonte, D. J. Rossi, J. A. Thomson, K. Eggan, G. Q. Daley, L. S. Goldstein and K. Zhang, 2011: Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471, 63-67.
- Grasshoff, U., S. Singer, T. Liehr, H. Starke, B. Fode, M. Schoning and A. Dufke, 2003: A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q13-->q24.1 and partial monosomy 4q27-->q28 [corrected]. *Cytogenetic and genome research*, 103, 17-23.
- Greber, B., H. Lehrach and J. Adjaye, 2007: Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells*, 25, 455-464.
- Griffin, J., B. R. Emery, G. L. Christensen and D. T. Carrell, 2008: Analysis of the meiotic recombination gene REC8 for sequence variations in a population with severe male factor infertility. *Syst Biol Reprod Med*, 54, 163-165.
- Griffiths, A. J. F., W. M. Gelbart and J. H. Miller, 1999: Modern Genetic Analysis. Chromosomal Rearrangements. . New York: W. H. Freeman.
- Guarducci, E., F. Nuti, L. Becherini, M. Rotondi, G. Balercia, G. Forti and C. Krausz, 2006: Estrogen receptor alpha promoter polymorphism: stronger estrogen action is coupled with lower sperm count. *Hum Reprod*, 21, 994-1001.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Munsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge, 1990: A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-250.
- Guichaoua, M. R., A. de Lanversin, C. Cataldo, D. Delafontaine, C. Alasia, M. Fraternali, P. Terriou, A. Stahl and J. M. Luciani, 1991: Three dimensional reconstruction of human pachytene spermatocyte nuclei of a 17;21 reciprocal translocation carrier: study of XY-autosome relationships. *Human genetics*, 87, 709-715.
- Gunesdogan, U., E. Magnusdottir and M. A. Surani, 2014: Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event [corrected]. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369.
- Guo, G., J. Yang, J. Nichols, J. S. Hall, I. Eyres, W. Mansfield and A. Smith, 2009: Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, 136, 1063-1069.
- Habibi, E., A. B. Brinkman, J. Arand, L. I. Kroeze, H. H. Kerstens, F. Matarese, K. Lepikhov, M. Gut, I. Brun-Heath, N. C. Hubner, R. Benedetti, L. Altucci, J. H. Jansen, J. Walter, I. G. Gut, H. Marks and H. G. Stunnenberg, 2013: Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 13, 360-369.
- Hackett, J. A. and M. A. Surani, 2014: Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*, 15, 416-430.
- Haidet-Phillips, A. M., M. E. Hester, C. J. Miranda, K. Meyer, L. Braun, A. Frakes, S. Song, S. Likhite, M. J. Murtha, K. D. Foust, M. Rao, A. Eagle, A. Kammesheidt, A. Christensen, J. R. Mendell, A. H. Burghes and B. K. Kaspar, 2011: Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*, 29, 824-828.
- Halder, A., P. Kumar, M. Jain and V. K. Iyer, 2017: Copy number variations in testicular maturation arrest. *Andrology*, 5, 460-472.
- Hall, J., G. Guo, J. Wray, I. Eyres, J. Nichols, L. Grotewold, S. Morfopoulou, P. Humphreys, W. Mansfield, R. Walker, S. Tomlinson and A. Smith, 2009: Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 5, 597-609.
- Hamada, A. J., S. C. Esteves and A. Agarwal, 2013: A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1, 39-60.
- Hamerton, J. L., N. Canning, M. Ray and S. Smith, 1975: A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities. *Clinical genetics*, 8, 223-243.
- Han, D. W., B. Greber, G. Wu, N. Tapia, M. J. Arauzo-Bravo, K. Ko, C. Bernemann, M. Stehling and H. R. Scholer, 2011: Direct reprogramming of fibroblasts into epiblast stem cells. *Nat Cell Biol*, 13, 66-71.
- Han, D. W., N. Tapia, J. Y. Joo, B. Greber, M. J. Arauzo-Bravo, C. Bernemann, K. Ko, G. Wu, M. Stehling, J. T. Do and H. R. Scholer, 2010: Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. *Cell*, 143, 617-627.
- Hanna, J., A. W. Cheng, K. Saha, J. Kim, C. J. Lengner, F. Soldner, J. P. Cassady, J. Muffat, B. W. Carey and R. Jaenisch, 2010: Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9222-9227.
- Hanna, J., S. Markoulaki, M. Mitalipova, A. W. Cheng, J. P. Cassady, J. Staerk, B. W. Carey, C. J. Lengner, R. Foreman, J. Love, Q. Gao, J. Kim and R. Jaenisch, 2009: Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*, 4, 513-524.



- Hannema, S. E. and I. A. Hughes, 2007: Regulation of Wolffian duct development. *Hormone research*, 67, 142-151.
- Hansson, V., S. C. Weddington, F. S. French, W. McLean, A. Smith, S. N. Nayfeh, E. M. Ritzen and L. Hagenas, 1976: Secretion and role of androgen-binding proteins in the testis and epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 17-33.
- Hasegawa, K., T. Fujioka, Y. Nakamura, N. Nakatsuji and H. Suemori, 2006: A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. *Stem Cells*, 24, 2649-2660.
- Hayashi, K., T. Kobayashi, T. Umino, R. Goitsuka, Y. Matsui and D. Kitamura, 2002: SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech Dev*, 118, 99-109.
- He, T., X. Zhang, H. Deng, W. Zhou, X. Zhao, H. Zhao, J. Lu, Y. Zheng, C. Zhang, L. Zhang and A. Yin, 2017: A novel Y chromosome microdeletion potentially associated with defective spermatogenesis identified by custom array comparative genome hybridization. *Reprod Biomed Online*, 34, 75-81.
- Heard, E. and J. Turner, 2011: Function of the sex chromosomes in mammalian fertility. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a002675.
- Hester, M. E., S. Song, C. J. Miranda, A. Eagle, P. H. Schwartz and B. K. Kaspar, 2009: Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency. *PLoS One*, 4, e7044.
- Hirai, H., P. Karian and N. Kikyo, 2011: Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J*, 438, 11-23.
- Hirota, T., H. Ohta, B. E. Powell, S. K. Mahadevaiah, O. A. Ojarikre, M. Saitou and J. M. A. Turner, 2017: Fertile offspring from sterile sex chromosome trisomic mice. *Science*.
- Hodzic, A., M. Ristanovic, B. Zorn, C. Tulic, A. Maver, I. Novakovic, D. Plaseska-Karanfilska and B. Peterlin, 2017: Genetic variation in leptin and leptin receptor genes as a risk factor for idiopathic male infertility. *Andrology*, 5, 70-74.
- Holdcraft, R. W. and R. E. Braun, 2004: Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, 131, 459-467.
- Homolka, D., P. Jansa and J. Forejt, 2012: Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma*, 121, 91-104.
- Hotaling, J. M., 2014: Genetics of male infertility. *The Urologic clinics of North America*, 41, 1-17.
- Hou, P., Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, T. Zhao, J. Ye, W. Yang, K. Liu, J. Ge, J. Xu, Q. Zhang, Y. Zhao and H. Deng, 2013: Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341, 651-654.
- Hou, S., L. Xian, P. Shi, C. Li, Z. Lin and X. Gao, 2016: The Magea gene cluster regulates male germ cell apoptosis without affecting the fertility in mice. *Sci Rep*, 6, 26735.
- Hovatta, O., M. Jaconi, V. Tohonen, F. Bena, S. Gimelli, A. Bosman, F. Holm, S. Wyder, E. M. Zdobnov, O. Irion, P. W. Andrews, S. E. Antonarakis, M. Zucchelli, J. Kere and A. Feki, 2010: A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes. *PLoS One*, 5, e10263.
- Hsieh-Li, H. M., D. P. Witte, M. Weinstein, W. Branford, H. Li, K. Small and S. S. Potter, 1995: Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development*, 121, 1373-1385.
- Hu, B. Y., J. P. Weick, J. Yu, L. X. Ma, X. Q. Zhang, J. A. Thomson and S. C. Zhang, 2010: Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4335-4340.
- Hu, K., J. Yu, K. Suknutha, S. Tian, K. Montgomery, K. D. Choi, R. Stewart, J. A. Thomson and Slukvin, II, 2011: Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*, 117, e109-119.
- Hu, Y. C., L. M. Okumura and D. C. Page, 2013: Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS genetics*, 9, e1003629.
- Huang, B., S. Wang, Y. Ning, A. N. Lamb and J. Bartley, 1999: Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American journal of medical genetics*, 87, 349-353.
- Huangfu, D., R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A. E. Chen and D. A. Melton, 2008a: Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 26, 795-797.
- Huangfu, D., K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein and D. A. Melton, 2008b: Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 26, 1269-1275.
- Hughes, I. A., C. Houk, S. F. Ahmed, P. A. Lee and G. Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology Consensus, 2006: Consensus statement on management of intersex disorders. *Journal of pediatric urology*, 2, 148-162.
- Hughes, S., H. Wilkinson, S. P. Gilbert, M. Kishida, S. S. Ding and A. Woollard, 2014: The C. elegans TPR Containing Protein, TRD-1, Regulates Cell Fate Choice in the Developing Germ Line and Epidermis. *PLoS One*, 9, e114998.
- Hussein, S. M., N. N. Batada, S. Vuoristo, R. W. Ching, R. Autio, E. Narva, S. Ng, M. Sourour, R. Hamalainen, C. Olsson, K. Lundin, M. Mikkola, R. Trokovic, M. Peitz, O. Brustle, D. P. Bazett-Jones, K. Alitalo, R. Lahesmaa, A. Nagy and T. Otonkoski, 2011: Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 471, 58-62.



- Hyon, C., S. Chantot-Bastaraud, R. Harbuz, R. Bhouri, N. Perrot, M. Peycelon, M. Sibony, S. Rojo, X. Piguel, F. Bilan, B. Gilbert-Dussardier, A. Kitzis, K. McElreavey, J. P. Siffroi and A. Bashamboo, 2015: Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of sex development (DSD). *American journal of medical genetics. Part A*.
- Ichida, J. K., J. Blanchard, K. Lam, E. Y. Son, J. E. Chung, D. Egli, K. M. Loh, A. C. Carter, F. P. Di Giorgio, K. Koszka, D. Huangfu, H. Akutsu, D. R. Liu, L. L. Rubin and K. Eggan, 2009: A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*, 5, 491-503.
- Imbeaud, S., E. Faure, I. Lamarre, M. G. Mattei, N. di Clemente, R. Tizard, D. Carre-Eusebe, C. Belville, L. Tragethon, C. Tonkin, J. Nelson, M. McAuliffe, J. M. Bidart, A. Lababidi, N. Josso, R. L. Cate and J. Y. Picard, 1995: Insensitivity to anti-mullerian hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor. *Nat Genet*, 11, 382-388.
- Imken, L., H. Rouba, B. El Houate, N. Louanjli, A. Barakat, A. Chafik and K. McElreavey, 2009: Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Mol Hum Reprod*, 15, 733-738.
- Ingman, W. V. and S. A. Robertson, 2007: Transforming growth factor-beta1 null mutation causes infertility in male mice associated with testosterone deficiency and sexual dysfunction. *Endocrinology*, 148, 4032-4043.
- Irie, N., W. W. Tang and M. Azim Surani, 2014: Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. *Reproductive medicine and biology*, 13, 203-215.
- Irie, N., L. Weinberger, W. W. Tang, T. Kobayashi, S. Viukov, Y. S. Manor, S. Dietmann, J. H. Hanna and M. A. Surani, 2015: SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell*, 160, 253-268.
- Ise, T., S. Das, S. Nagata, H. Maeda, Y. Lee, M. Onda, M. R. Anver, T. K. Bera and I. Pastan, 2008: Expression of POTE protein in human testis detected by novel monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 365, 603-608.
- Ishii, T., 2014: Human iPS Cell-Derived Germ Cells: Current Status and Clinical Potential. *J Clin Med*, 3, 1064-1083.
- Jacobs, P. A., A. G. Baikie, W. M. Court Brown and J. A. Strong, 1959: The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet (London, England)*, 1, 710.
- Jaiswal, D., R. Sah, N. K. Agrawal, U. S. Dwivedi, S. Trivedi and K. Singh, 2012: Combined effect of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms on human male infertility in north Indian population. *Reproductive sciences*, 19, 312-316.
- Jakob, S. and R. Lovell-Badge, 2011: Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *The FEBS journal*, 278, 1002-1009.
- Jameson, S. A., Y. T. Lin and B. Capel, 2012: Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol*, 370, 24-32.
- Jarow, J. P., M. A. Espeland and L. I. Lipshultz, 1989: Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of urology*, 142, 62-65.
- Jegou, B., 2015: Paracetamol-induced endocrine disruption in human fetal testes. *Nature reviews. Endocrinology*, 11, 453-454.
- Jehan, Z., S. Vallinayagam, S. Tiwari, S. Pradhan, L. Singh, A. Suresh, H. M. Reddy, Y. R. Ahuja and R. A. Jesudasan, 2007: Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res*, 17, 433-440.
- Jia, F., K. D. Wilson, N. Sun, D. M. Gupta, M. Huang, Z. Li, N. J. Panetta, Z. Y. Chen, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker and J. C. Wu, 2010: A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, 7, 197-199.
- Kaji, K., K. Norrby, A. Paca, M. Mileikovsky, P. Mohseni and K. Woltjen, 2009: Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458, 771-775.
- Kamp, C., P. Hirschmann, H. Voss, K. Huellen and P. H. Vogt, 2000: Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet*, 9, 2563-2572.
- Kan, H. P., F. L. Wu, W. B. Guo, Y. Z. Wang, J. P. Li, Y. Q. Huang, S. G. Li and J. P. Liu, 2013: Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to male factor infertility risk: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 99, 690-696.
- Kantartzi, P. D., D. Goulis Ch, G. D. Goulis and I. Papadimas, 2007: Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia*, 11, 99-104.
- Karadeniz, N., K. Mrasek and A. Weise, 2008: Further delineation of complex chromosomal rearrangements in fertile male using multicolor banding. *Molecular cytogenetics*, 1, 17.
- Katz, M. D., I. Kligman, L. Q. Cai, Y. S. Zhu, C. M. Fratianni, I. Zervoudakis, Z. Rosenwaks and J. Imperato-McGinley, 1997: Paternity by intrauterine insemination with sperm from a man with 5alpha-reductase-2 deficiency. *The New England journal of medicine*, 336, 994-997.
- Kehler, J., E. Tolkunova, B. Koschorz, M. Pesce, L. Gentile, M. Boiani, H. Lomeli, A. Nagy, K. J. McLaughlin, H. R. Scholer and A. Tomilin, 2004: Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports*, 5, 1078-1083.
- Kent-First, M., A. Muallem, J. Shultz, J. Pryor, K. Roberts, W. Nolten, L. Meisner, A. Chandley, G. Gouchy, L. Jorgensen, T. Havighurst and J. Grosch, 1999: Defining regions of the Y-chromosome





- responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular reproduction and development*, 53, 27-41.
- Khosropour, S., M. Hamidi, A. Fattahi, I. Khodadadi, M. Karami, M. Fazilati, A. Vaisi-Raygani and H. Tavilani, 2017: Leptin and leptin-receptor polymorphisms in fertile and infertile men. *Syst Biol Reprod Med*, 63, 7-14.
- Kim, D., C. H. Kim, J. I. Moon, Y. G. Chung, M. Y. Chang, B. S. Han, S. Ko, E. Yang, K. Y. Cha, R. Lanza and K. S. Kim, 2009a: Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4, 472-476.
- Kim, G. J., E. Sock, A. Buchberger, W. Just, F. Denzer, W. Hoepffner, J. German, T. Cole, J. Mann, J. H. Seguin, W. Zipf, C. Costigan, H. Schmiady, M. Rostasy, M. Kramer, S. Kaltenbach, B. Rosler, I. Georg, E. Troppmann, A. C. Teichmann, A. Salfelder, S. A. Widholz, P. Wieacker, O. Hiort, G. Camerino, O. Radi, M. Wegner, H. H. Arnold and G. Scherer, 2015: Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *Journal of medical genetics*, 52, 240-247.
- Kim, H., J. Wu, S. Ye, C. I. Tai, X. Zhou, H. Yan, P. Li, M. Pera and Q. L. Ying, 2013a: Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun*, 4, 2403.
- Kim, H. G. and L. C. Layman, 2011: The role of CHD7 and the newly identified WDR11 gene in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 346, 74-83.
- Kim, I. W., A. C. Khadilkar, E. Y. Ko and E. S. Sabanegh, Jr., 2013b: 47,XXY Syndrome and Male Infertility. *Reviews in urology*, 15, 188-196.
- Kim, J. B., B. Greber, M. J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K. I. Park, H. Zaehres and H. R. Scholer, 2009b: Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*, 461, 649-643.
- Kim, J. B., V. Sebastiano, G. Wu, M. J. Arauzo-Bravo, P. Sasse, L. Gentile, K. Ko, D. Ruau, M. Ehrich, D. van den Boom, J. Meyer, K. Hubner, C. Bernemann, C. Ortmeier, M. Zenke, B. K. Fleischmann, H. Zaehres and H. R. Scholer, 2009c: Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136, 411-419.
- Kim, J. B., H. Zaehres, G. Wu, L. Gentile, K. Ko, V. Sebastiano, M. J. Arauzo-Bravo, D. Ruau, D. W. Han, M. Zenke and H. R. Scholer, 2008: Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454, 646-650.
- Kim, J. W., E. M. Chang, S. H. Song, S. H. Park, T. K. Yoon and S. H. Shim, 2011: Complex chromosomal rearrangements in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis. *Fertil Steril*, 95, 349-352, 352 e341-345.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg and G. Q. Daley, 2010: Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285-290.
- Kim, Y., A. Kobayashi, R. Sekido, L. DiNapoli, J. Brennan, M. C. Chaboissier, F. Poulat, R. R. Behringer, R. Lovell-Badge and B. Capel, 2006: Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, 4, e187.
- Kim, Y. E., J. A. Park, Y. W. Ha, S. K. Park, H. S. Kim, S. K. Oh and Y. Lee, 2012: Chromosomal Modification in Human Embryonic Stem Cells Cultured in a Feeder-Free Condition after Single Cell Dissociation using Accutase. *Development & reproduction*, 16, 353-361.
- Kimbrel, E. A. and R. Lanza, 2015: Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nature reviews. Drug discovery*, 14, 681-692.
- Kishimoto, A., T. Ishiguro-Oonuma, R. Takahashi, M. Maekawa, K. Toshimori, M. Watanabe and T. Iwanaga, 2015: Immunohistochemical localization of GLUT3, MCT1, and MCT2 in the testes of mice and rats: the use of different energy sources in spermatogenesis. *Biomedical research*, 36, 225-234.
- Klein, E., M. Manvelyan, I. Simonyan, A. B. Hamid, R. S. Guilherme, T. Liehr and T. Karamysheva, 2012: Centromeric association of small supernumerary marker chromosomes with their sister-chromosomes detected by three dimensional molecular cytogenetics. *Molecular cytogenetics*, 5, 15.
- Knebelmann, B., L. Boussin, D. Guerrier, L. Legeai, A. Kahn, N. Josso and J. Y. Picard, 1991: Anti-Mullerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Mullerian duct syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3767-3771.
- Knower, K. C., H. Sim, P. J. McClive, J. Bowles, P. Koopman, A. H. Sinclair and V. R. Harley, 2007: Characterisation of urogenital ridge gene expression in the human embryonal carcinoma cell line NT2/D1. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 1, 114-126.
- Kobayashi, A. and R. R. Behringer, 2003: Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews. Genetics*, 4, 969-980.
- Kohler, B., H. Biebermann, V. Friedsam, J. Gellermann, R. F. Maier, M. Pohl, P. Wieacker, O. Hiort, A. Gruters and H. Krude, 2011: Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96, E1131-1136.



- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge, 1991: Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351, 117-121.
- Koopman, P., A. Munsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge, 1990: Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348, 450-452.
- Korach, K. S., 1994: Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266, 1524-1527.
- Kosztolanyi, G., K. Mehes and E. B. Hook, 1991: Inherited ring chromosomes: an analysis of published cases. *Human genetics*, 87, 320-324.
- Krausz, C. and M. Fellous, 2003: [Chromosome Y and infertility in men]. *Annales d'endocrinologie*, 64, 403-412.
- Krausz, C., C. Giachini, D. Lo Giacco, F. Daguin, C. Chianese, E. Ars, E. Ruiz-Castane, G. Forti and E. Rossi, 2012: High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS One*, 7, e44887.
- Kreidberg, J. A., H. Sariola, J. M. Loring, M. Maeda, J. Pelletier, D. Housman and R. Jaenisch, 1993: WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74, 679-691.
- Kroll, M. R., E. S. Viss, J. Lamb, J. Horstman, A. Powell, A. Van Wyk, K. Hinkkala, T. Hoogland, M. Schippers, S. Shannon, C. G. Carlton, M. Sharma, A. Taylor, G. B. Vanden Heuvel and T. N. Jelsma, 2011: Asynchronous expression of the homeodomain protein CUX1 in Sertoli cells and spermatids during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*, 84, 455-465.
- Kuijk, E. W., S. M. Chuva de Sousa Lopes, N. Geijsen, N. Macklon and B. A. Roelen, 2011: The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update*, 17, 254-271.
- Kupis, L., P. A. Dobronski and P. Radziszewski, 2015: Varicocele as a source of male infertility - current treatment techniques. *Central European journal of urology*, 68, 365-370.
- Kurzawski, M., A. Wajda, D. Malinowski, A. Kazienko, R. Kurzawa and M. Drozdziak, 2015: Association study of folate-related enzymes (MTHFR, MTR, MTRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population. *Genetics and molecular biology*, 38, 42-47.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving and B. L. Hogan, 1999: Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, 13, 424-436.
- Lecureuil, C., E. Kara, F. Guillou, D. Monniaux and P. Crepieux, 2007: [Does FSH signaling have a gender?]. *Medecine sciences : M/S*, 23, 75-80.
- Lee, G. M., J. M. Ko, C. H. Shin and S. W. Yang, 2014: A Korean boy with 46,XX testicular disorder of sex development caused by SOX9 duplication. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, 19, 108-112.
- Lee, I. W., P. H. Kuo, M. T. Su, L. C. Kuan, C. C. Hsu and P. L. Kuo, 2011: Quantitative trait analysis suggests polymorphisms of estrogen-related genes regulate human sperm concentrations and motility. *Hum Reprod*, 26, 1585-1596.
- Lefort, N., M. Feyeux, C. Bas, O. Feraud, A. Bennaceur-Griscelli, G. Tachdjian, M. Peschanski and A. L. Perrier, 2008: Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol*, 26, 1364-1366.
- Lefort, N., A. L. Perrier, Y. Laabi, C. Varela and M. Peschanski, 2009: Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med*, 4, 899-909.
- Lewellis, S. W. and H. Knaut, 2012: Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 333-340.
- Li, C., X. P. Ding, L. Fu and L. Chen, 2013: [Association between glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and idiopathic azoospermia]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, 30, 102-105.
- Li, S., Z. J. Lan, X. Li, J. Lin and Z. Lei, 2014a: Role of postnatal expression of fgfr1 and fgfr2 in testicular germ cells on spermatogenesis and fertility in mice. *Journal of reproduction & infertility*, 15, 122-133.
- Li, T. F., Q. Y. Wu, C. Zhang, W. W. Li, Q. Zhou, W. J. Jiang, Y. X. Cui, X. Y. Xia and Y. C. Shi, 2014b: 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC urology*, 14, 104.
- Li, W., W. Wei, S. Zhu, J. Zhu, Y. Shi, T. Lin, E. Hao, A. Hayek, H. Deng and S. Ding, 2009: Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 4, 16-19.
- Li, Z., T. Fei, J. Zhang, G. Zhu, L. Wang, D. Lu, X. Chi, Y. Teng, N. Hou, X. Yang, H. Zhang, J. D. Han and Y. G. Chen, 2012: BMP4 Signaling Acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 171-182.
- Lian, C., Q. Zuo, D. Li, L. Zhang, M. F. Ahmed, T. Xiao, B. Tang, Y. Wang, K. Jin, Y. Zhang and B. Li, 2015: Basing RNA-seq explored the regulatory mechanism of the carbohydrate metabolism pathways during chicken male germ cell differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51, 690-696.
- Liang, G., O. Taranova, K. Xia and Y. Zhang, 2010: Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *J Biol Chem*, 285, 25516-25521.



- Liao, J., Z. Wu, Y. Wang, L. Cheng, C. Cui, Y. Gao, T. Chen, L. Rao, S. Chen, N. Jia, H. Dai, S. Xin, J. Kang, G. Pei and L. Xiao, 2008: Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, 18, 600-603.
- Lin, T., R. Ambasudhan, X. Yuan, W. Li, S. Hilcove, R. Abujarour, X. Lin, H. S. Hahm, E. Hao, A. Hayek and S. Ding, 2009: A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*, 6, 805-808.
- Liu, P., C. M. Carvalho, P. J. Hastings and J. R. Lupski, 2012: Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev*, 22, 211-220.
- Liu, X. G., H. Y. Hu, Y. H. Guo and Y. P. Sun, 2016: Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genetics and molecular research : GMR*, 15.
- Liu, X. H., L. Y. Yan, C. L. Lu, R. Li, X. H. Zhu, H. Y. Jin, Y. Zhang, W. X. Zhang, S. H. Gao and J. Qiao, 2014: ART do not increase the risk of Y-chromosome microdeletion in 19 candidate genes at AZF regions. *Reprod Fertil Dev*, 26, 778-786.
- Lo, B. and L. Parham, 2009: Ethical issues in stem cell research. *Endocrine reviews*, 30, 204-213.
- Loh, Y. H., O. Hartung, H. Li, C. Guo, J. M. Sahalie, P. D. Manos, A. Urbach, G. C. Heffner, M. Grskovic, F. Vigneault, M. W. Lensch, I. H. Park, S. Agarwal, G. M. Church, J. J. Collins, S. Irion and G. Q. Daley, 2010: Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, 7, 15-19.
- Lourenco, D., R. Brauner, M. Rybczynska, C. Nihoul-Fekete, K. McElreavey and A. Bashamboo, 2011: Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 1597-1602.
- Lowry, W. E., L. Richter, R. Yachechko, A. D. Pyle, J. Tchieu, R. Sridharan, A. T. Clark and K. Plath, 2008: Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2883-2888.
- Ludes-Meyers, J. H., H. Kil, M. I. Nunez, C. J. Conti, J. Parker-Thornburg, M. T. Bedford and C. M. Aldaz, 2007: WWOX hypomorphic mice display a higher incidence of B-cell lymphomas and develop testicular atrophy. *Genes Chromosomes Cancer*, 46, 1129-1136.
- Lyssiotis, C. A., R. K. Foreman, J. Staerk, M. Garcia, D. Mathur, S. Markoulaki, J. Hanna, L. L. Lairson, B. D. Charette, L. C. Bouchez, M. Bollong, C. Kunick, A. Brinker, C. Y. Cho, P. G. Schultz and R. Jaenisch, 2009: Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8912-8917.
- Mackie Ogilvie, C. and P. N. Scriven, 2002: Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *European journal of human genetics : EJHG*, 10, 801-806.
- Maguire, S. M., W. A. Tribley and M. D. Griswold, 1997: Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod*, 56, 1106-1111.
- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath and K. Hochedlinger, 2007: Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1, 55-70.
- Maione, L., F. Albarel, P. Bouchard, M. Gallant, C. A. Flanagan, R. Bobe, J. Cohen-Tannoudji, R. Pivonello, A. Colao, T. Brue, R. P. Millar, M. Lombes, J. Young, A. Guiochon-Mantel and J. Bouligand, 2013: R31C GNRH1 mutation and congenital hypogonadotropic hypogonadism. *PLoS One*, 8, e69616.
- Majdic, G., M. Young, E. Gomez-Sanchez, P. Anderson, L. S. Szczepaniak, R. L. Dobbins, J. D. McGarry and K. L. Parker, 2002: Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143, 607-614.
- Malcher, A., N. Rozwadowska, T. Stokowy, T. Kolanowski, P. Jedrzejczak, W. Zietkowiak and M. Kurpisz, 2013: Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertil Steril*, 100, 1686-1694 e1681-1687.
- Malik, N. and M. S. Rao, 2013: A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol*, 997, 23-33.
- Mandel, H., R. Shemer, Z. U. Borochowitz, M. Okopnik, C. Knopf, M. Indelman, A. Drugan, D. Tiosano, R. Gershoni-Baruch, M. Choder and E. Sprecher, 2008: SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *American journal of human genetics*, 82, 39-47.
- Mantzouratou, A., A. Mania, M. Apergi, S. Laver, P. Serhal and J. Delhanty, 2009: Meiotic and mitotic behaviour of a ring/deleted chromosome 22 in human embryos determined by preimplantation genetic diagnosis for a maternal carrier. *Molecular cytogenetics*, 2, 3.
- Manvelyan, M., M. Riegel, M. Santos, C. Fuster, F. Pellestor, M. L. Mazaurik, B. Schulze, A. Polityko, H. Tittelbach, G. Reising-Ackermann, B. Belitz, U. Hehr, C. Kelbova, M. Volleth, E. Godde, J. Anderson, P. Kupferling, S. Kohler, H. C. Duba, A. Dufke, D. Aktas, T. Martin, I. Schreyer, E. Ewers, D. Reich, K. Mrasek, A. Weise and T. Liehr, 2008: Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *Int J Mol Med*, 21, 705-714.
- Marchetto, M. C., A. R. Muotri, Y. Mu, A. M. Smith, G. G. Cezar and F. H. Gage, 2008: Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 649-657.



- Margari, L., A. L. Lamanna, F. Craig, M. Simone and M. Gentile, 2014: Autism spectrum disorders in XYY syndrome: two new cases and systematic review of the literature. *European journal of pediatrics*, 173, 277-283.
- Marks, H., T. Kalkan, R. Menafrá, S. Denissov, K. Jones, H. Hofemeister, J. Nichols, A. Kranz, A. F. Stewart, A. Smith and H. G. Stunnenberg, 2012: The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*, 149, 590-604.
- Martello, G., P. Bertone and A. Smith, 2013: Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J*, 32, 2561-2574.
- Marteyn, A., Y. Maury, M. M. Gauthier, C. Lecuyer, R. Vernet, J. A. Denis, G. Pietu, M. Peschanski and C. Martinat, 2011: Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell*, 8, 434-444.
- Martin, G. R., 1981: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-7638.
- Mascarenhas, M. N., S. R. Flaxman, T. Boerma, S. Vanderpoel and G. A. Stevens, 2012: National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9, e1001356.
- Matsui, Y., K. Zsebo and B. L. Hogan, 1992: Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 841-847.
- Matzuk, M. M. and D. J. Lamb, 2008: The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature medicine*, 14, 1197-1213.
- Maures, T. J., J. H. Kurzer and C. Carter-Su, 2007: SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18, 38-45.
- Mauritz, C., K. Schwanke, M. Reppel, S. Neef, K. Katsirntaki, L. S. Maier, F. Nguemo, S. Menke, M. Haustein, J. Hescheler, G. Hasenfuss and U. Martin, 2008: Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118, 507-517.
- Mayshar, Y., U. Ben-David, N. Lavon, J. C. Biancotti, B. Yakir, A. T. Clark, K. Plath, W. E. Lowry and N. Benvenisty, 2010: Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 521-531.
- McDonald, M. T., W. Flejter, S. Sheldon, M. J. Putzi and J. L. Gorski, 1997: XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *American journal of medical genetics*, 73, 321-326.
- McElreavey, K., C. Ravel, S. Chantot-Bastaraud and J. P. Siffroi, 2006: Y chromosome variants and male reproductive function. *International journal of andrology*, 29, 298-303; discussion 304-296.
- Meeks, J. J., S. E. Crawford, T. A. Russell, K. Morohashi, J. Weiss and J. L. Jameson, 2003: Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development*, 130, 1029-1036.
- Mekhoubad, S., C. Bock, A. S. de Boer, E. Kiskinis, A. Meissner and K. Eggan, 2012: Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell*, 10, 595-609.
- Meng, J., R. W. Holdcraft, J. E. Shima, M. D. Griswold and R. E. Braun, 2005: Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16696-16700.
- Mintz, B. and K. Illmensee, 1975: Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3585-3589.
- Mitalipova, M. M., R. R. Rao, D. M. Hoyer, J. A. Johnson, L. F. Meisner, K. L. Jones, S. Dalton and S. L. Stice, 2005: Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23, 19-20.
- Miyamoto, T., H. Sato, L. Yogev, S. Kleiman, M. Namiki, E. Koh, N. Sakugawa, H. Hayashi, M. Ishikawa, D. J. Lamb and K. Sengoku, 2006: Is a genetic defect in Fkbp6 a common cause of azoospermia in humans? *Cellular & molecular biology letters*, 11, 557-569.
- Miyamoto, N., M. Yoshida, S. Kuratani, I. Matsuo and S. Aizawa, 1997: Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, 124, 1653-1664.
- Miyamoto, T., S. Hasuike, L. Yogev, M. R. Maduro, M. Ishikawa, H. Westphal and D. J. Lamb, 2003: Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet (London, England)*, 362, 1714-1719.
- Miyoshi, N., H. Ishii, H. Nagano, N. Haraguchi, D. L. Dewi, Y. Kano, S. Nishikawa, M. Tanemura, K. Mimori, F. Tanaka, T. Saito, J. Nishimura, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda, H. Yamamoto, M. Sekimoto, Y. Doki and M. Mori, 2011: Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 8, 633-638.
- Moalem, S., R. Babul-Hirji, D. J. Stavropoulos, D. Wherrett, D. J. Bagli, P. Thomas and D. Chitayat, 2012: XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication. *American journal of medical genetics. Part A*, 158A, 1759-1764.
- Mohnach, L., P. Y. Fechner and C. E. Keegan, 2016: Nonsyndromic Disorders of Testicular Development. *GeneReviews®*.
- Molyneaux, K. A., Y. Wang, K. Schaible and C. Wylie, 2004: Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Gene expression patterns : GEP*, 4, 167-181.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, P. S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M. J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie and R. Lehmann, 2003: The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*, 130, 4279-4286.





- Monk, M., 1981: A stem-line model for cellular and chromosomal differentiation in early mouse-development. *Differentiation*, 19, 71-76.
- Morgani, S. M. and J. M. Brickman, 2015: LIF supports primitive endoderm expansion during pre-implantation development. *Development*, 142, 3488-3499.
- Mori, T., H. Kurahashi, T. Shinka, Y. Nakahori, M. Taniguchi, T. Toda and T. Iwamoto, 2006: Candidate genes for male factor infertility--validation. *Fertil Steril*, 86, 1553-1554; author reply 1554.
- Morris, J. K., E. Alberman, C. Scott and P. Jacobs, 2008: Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *European journal of human genetics : EJHG*, 16, 163-170.
- Mostafa, T. and M. Taymour, 2016: TNF-alpha -308 polymorphisms and male infertility risk: A meta-analysis and systematic review. *Journal of advanced research*, 7, 185-192.
- Mou, L., Y. Wang, H. Li, Y. Huang, T. Jiang, W. Huang, Z. Li, J. Chen, J. Xie, Y. Liu, Z. Jiang, X. Li, J. Ye, Z. Cai and Y. Gui, 2013: A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Human genetics*, 132, 159-165.
- Mouka, A., G. Tachdjian, J. Dupont, L. Drevillon and L. Tosca, 2016: In Vitro Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility. *Stem Cells Dev*, 25, 509-521.
- Mullen, R. D. and R. R. Behringer, 2014: Molecular genetics of Mullerian duct formation, regression and differentiation. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 8, 281-296.
- Nachtigal, M. W., Y. Hirokawa, D. L. Enyeart-VanHouten, J. N. Flanagan, G. D. Hammer and H. A. Ingraham, 1998: Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, 93, 445-454.
- Nagaoka, M., U. Koshimizu, S. Yuasa, F. Hattori, H. Chen, T. Tanaka, M. Okabe, K. Fukuda and T. Akaike, 2006: E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS One*, 1, e15.
- Nailwal, M. and J. B. Chauhan, 2017: In silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DAZL gene associated with male infertility. *Syst Biol Reprod Med*, 63, 248-258.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka, 2008: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26, 101-106.
- Nakagawa, M., N. Takizawa, M. Narita, T. Ichisaka and S. Yamanaka, 2010: Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14152-14157.
- Narsinh, K. H., F. Jia, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker and J. C. Wu, 2011a: Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc*, 6, 78-88.
- Narsinh, K. H., J. Plews and J. C. Wu, 2011b: Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins? *Mol Ther*, 19, 635-638.
- Navarro-Costa, P., C. E. Plancha and J. Goncalves, 2010: Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 936569.
- Navarro, J., F. Vidal, J. Benet, C. Templado, S. Marina and J. Egozcue, 1991: XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod*, 6, 376-381.
- Ng, C. C., K. Koyama, S. Okamura, H. Kondoh, Y. Takei and Y. Nakamura, 1999: Isolation and characterization of a novel TP53-inducible gene, TP53TG3. *Genes Chromosomes Cancer*, 26, 329-335.
- Nicholl, R. M., L. Grimsley, L. Butler, R. W. Palmer, H. C. Rees, M. O. Savage and K. Costeloe, 1994: Trisomy 22 and intersex. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 71, F57-58.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith, 1998: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-391.
- Niederberger, B. A., J. T. Busada and C. B. Geyer, 2015: Marker expression reveals heterogeneity of spermatogonia in the neonatal mouse testis. *Reproduction*, 149, 329-338.
- Niederberger, C., 2012: Re: Analysis of GSTM1, GSTT1, and CYP1A1 in Idiopathic Male Infertility. *The Journal of urology*, 187, 1376.
- Nishimura, K., M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi and M. Nakanishi, 2011: Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*, 286, 4760-4771.
- Nixon, B. J., A. L. Katen, S. J. Stanger, J. E. Schjenken, B. Nixon and S. D. Roman, 2014: Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *PLoS One*, 9, e94904.
- Nora, E. P., B. R. Lajoie, E. G. Schulz, L. Giorgetti, I. Okamoto, N. Servant, T. Piolot, N. L. van Berkum, J. Meisig, J. Sedat, J. Gribnau, E. Barillot, N. Bluthgen, J. Dekker and E. Heard, 2012: Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 485, 381-385.
- O'Donnell, L., 2014: Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4, e979623.



- O'Donnell, L., R. I. McLachlan, N. G. Wreford, D. M. de Kretser and D. M. Robertson, 1996: Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 55, 895-901.
- Oates, R. D., 2012: The natural history of endocrine function and spermatogenesis in Klinefelter syndrome: what the data show. *Fertil Steril*, 98, 266-273.
- Odet, F., C. Duan, W. D. Willis, E. H. Goulding, A. Kung, E. M. Eddy and E. Goldberg, 2008: Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. *Biol Reprod*, 79, 26-34.
- Ogata, T., K. Muroya, N. Matsuo, J. Hata, Y. Fukushima and Y. Suzuki, 1997: Impaired male sex development in an infant with molecularly defined partial 9p monosomy: implication for a testis forming gene(s) on 9p. *Journal of medical genetics*, 34, 331-334.
- Ohinata, Y., H. Ohta, M. Shigeta, K. Yamanaka, T. Wakayama and M. Saitou, 2009: A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137, 571-584.
- Ohinata, Y., B. Payer, D. O'Carroll, K. Ancelin, Y. Ono, M. Sano, S. C. Barton, T. Obukhanych, M. Nussenzweig, A. Tarakhovsky, M. Saitou and M. A. Surani, 2005: Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436, 207-213.
- Ohtsuka, S., Y. Nakai-Futatsugi and H. Niwa, 2015: LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAKSTAT*, 4, e1086520.
- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka, 2007: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 313-317.
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka, 2008: Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322, 949-953.
- Okita, K. and S. Yamanaka, 2011: Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366, 2198-2207.
- Park, I. H., N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M. W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger and G. Q. Daley, 2008a: Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134, 877-886.
- Park, I. H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley, 2008b: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141-146.
- Park, T. S., Z. Galic, A. E. Conway, A. Lindgren, B. J. van Handel, M. Magnusson, L. Richter, M. A. Teitell, H. K. A. Mikkola, W. E. Lowry, K. Plath and A. T. Clark, 2009: Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *Stem Cells*, 27, 783-795.
- Parma, P., O. Radi, V. Vidal, M. C. Chaboissier, E. Dellambra, S. Valentini, L. Guerra, A. Schedl and G. Camerino, 2006: R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet*, 38, 1304-1309.
- Pasi, C. E., A. Derehi-Oz, S. Negrini, M. Friedli, G. Fragola, A. Lombardo, G. Van Houwe, L. Naldini, S. Casola, G. Testa, D. Trono, P. G. Pelicci and T. D. Halazonetis, 2011: Genomic instability in induced stem cells. *Cell death and differentiation*, 18, 745-753.
- Pauls, K., R. Jager, S. Weber, E. Wardelmann, A. Koch, R. Buttner and H. Schorle, 2005: Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int J Cancer*, 115, 470-477.
- Pearlman, A., J. Loke, C. Le Caignec, S. White, L. Chin, A. Friedman, N. Warr, J. Willan, D. Brauer, C. Farmer, E. Brooks, C. Oddoux, B. Riley, S. Shajahan, G. Camerino, T. Homfray, A. H. Crosby, J. Couper, A. David, A. Greenfield, A. Sinclair and H. Ostrer, 2010: Mutations in MAP3K1 cause 46,XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination. *American journal of human genetics*, 87, 898-904.
- Pellestor, F., I. Imbert, B. Andreo and G. Lefort, 2001: Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod*, 16, 1155-1164.
- Pelletier, G. and M. El-Alfy, 2000: Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85, 4835-4840.
- Pelletier, J., W. Bruening, F. P. Li, D. A. Haber, T. Glaser and D. E. Housman, 1991: WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature*, 353, 431-434.
- Pera, M. F., J. Andrade, S. Houssami, B. Reubinoff, A. Trounson, E. G. Stanley, D. Ward-van Oostwaard and C. Mummery, 2004: Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci*, 117, 1269-1280.
- Pesce, M., M. G. Farrace, M. Piacentini, S. Dolci and M. De Felici, 1993: Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*, 118, 1089-1094.
- Philibert, P., D. Zenaty, L. Lin, S. Soskin, F. Audran, J. Leger, J. C. Achermann and C. Sultan, 2007: Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Hum Reprod*, 22, 3255-3261.



- Pierce, G. B., 1967: Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol*, 2, 223-246.
- Pinkel, D., R. Seagraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole, D. Kowbel, C. Collins, W. L. Kuo, C. Chen, Y. Zhai, S. H. Dairkee, B. M. Ljung, J. W. Gray and D. G. Albertson, 1998: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20, 207-211.
- Piprek, R. P., M. Kloc and J. Z. Kubiak, 2016: Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. *Results and problems in cell differentiation*, 58, 1-22.
- Plaiasu, V., D. Ochiana, G. Motei and A. Georgescu, 2011: A rare chromosomal disorder - isochromosome 18p syndrome. *Maedica*, 6, 132-136.
- Plante, B. J. and M. A. Fritz, 2008: A case report of successful pregnancy in a patient with pure 46,XY gonadal dysgenesis. *Fertil Steril*, 90, 2015 e2011-2012.
- Plath, K. and W. E. Lowry, 2011: Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nature reviews. Genetics*, 12, 253-265.
- Podlasek, C. A., J. Q. Clemens and W. Bushman, 1999: Hoxa-13 gene mutation results in abnormal seminal vesicle and prostate development. *The Journal of urology*, 161, 1655-1661.
- Polonikov, A. V., S. L. Yarosh, E. V. Kokhtenko, N. I. Starodubova, S. P. Pakhomov and V. S. Orlova, 2010: The functional genotype of glutathione S-transferase T1 gene is strongly associated with increased risk of idiopathic infertility in Russian men. *Fertil Steril*, 94, 1144-1147.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey and A. Wellstein, 2000: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer*, 7, 165-197.
- Puffenberger, E. G., D. Hu-Lince, J. M. Parod, D. W. Craig, S. E. Dobrin, A. R. Conway, E. A. Donarum, K. A. Strauss, T. Duncley, J. F. Cardenas, K. R. Melmed, C. A. Wright, W. Liang, P. Stafford, C. R. Flynn, D. H. Morton and D. A. Stephan, 2004: Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of TSPYL loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11689-11694.
- Puri, P. and W. H. Walker, 2016: The regulation of male fertility by the PTPN11 tyrosine phosphatase. *Semin Cell Dev Biol*, 59, 27-34.
- Ramathal, C., J. Durruthy-Durruthy, M. Sukhwani, J. E. Arakaki, P. J. Turek, K. E. Orwig and R. A. Reijo Pera, 2014: Fate of iPSCs derived from azoospermic and fertile men following xenotransplantation to murine seminiferous tubules. *Cell Rep*, 7, 1284-1297.
- Ravel, C., S. Chantot-Bastarud, K. McElreavey and J. P. Siffroi, 2006: [Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 34, 885-893.
- Ravel, C. and J.-P. Siffroi, 2009: Gynécologie Obstétrique & Fertilité. Chromosome Y et spermatogénèse. *Elsevier Masson*, 37, 901-907.
- Redon, R., S. Ishikawa, K. R. Fitch, L. Feuk, G. H. Perry, T. D. Andrews, H. Fiegler, M. H. Shapero, A. R. Carson, W. Chen, E. K. Cho, S. Dallaire, J. L. Freeman, J. R. Gonzalez, M. Gratacos, J. Huang, D. Kalaitzopoulos, D. Komura, J. R. MacDonald, C. R. Marshall, R. Mei, L. Montgomery, K. Nishimura, K. Okamura, F. Shen, M. J. Somerville, J. Tchinda, A. Valsesia, C. Woodwark, F. Yang, J. Zhang, T. Zerjal, J. Zhang, L. Armengol, D. F. Conrad, X. Estivill, C. Tyler-Smith, N. P. Carter, H. Aburatani, C. Lee, K. W. Jones, S. W. Scherer and M. E. Hurles, 2006: Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-454.
- Repping, S., H. Skaletsky, J. Lange, S. Silber, F. Van Der Veen, R. D. Oates, D. C. Page and S. Rozen, 2002: Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *American journal of human genetics*, 71, 906-922.
- Resnick, J. L., M. Ortiz, J. R. Keller and P. J. Donovan, 1998: Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol Reprod*, 59, 1224-1229.
- Rey, R., N. Josso and C. Racine, 2000: Sexual Differentiation. In: L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer and A. Vinik (eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth MA.
- Richmond, E. J. and A. D. Rogol, 2007: Male pubertal development and the role of androgen therapy. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, 3, 338-344.
- Robertson, E., 1986: Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet*, 2, 9-13.
- Rodriguez, A., C. Allegrucci and R. Alberio, 2012: Modulation of pluripotency in the porcine embryo and iPS cells. *PLoS One*, 7, e49079.
- Roelen, B. A. and S. M. Chuva De Sousa Lopes, 2011: Origins of pluripotent stem cells. *Minerva ginecologica*, 63, 351-363.
- Rohwedel, J., U. Sehmeyer, J. Shan, A. Meister and A. M. Wobus, 1996: Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int*, 20, 579-587.
- Ropke, A., A. C. Tewes, J. Gromoll, S. Kliesch, P. Wieacker and F. Tuttmann, 2013: Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *European journal of human genetics : EJHG*, 21, 1012-1015.
- Roscoe, W. A., K. J. Barr, A. A. Mhawi, D. K. Pomerantz and G. M. Kidder, 2001: Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod*, 65, 829-838.



- Roshdy, O. H., T. M. Hussein, N. H. Zakaria and A. A. Sabry, 2015: Glutathione S-transferase Mu-1 gene polymorphism in Egyptian patients with idiopathic male infertility. *Andrologia*, 47, 587-593.
- Rosner, M. H., M. A. Vigano, K. Ozato, P. M. Timmons, F. Poirier, P. W. Rigby and L. M. Staudt, 1990: A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345, 686-692.
- Rudigier, L. J., C. Dame, H. Scholz and K. M. Kirschner, 2017: Ex vivo cultures combined with vivomorpholino induced gene knockdown provide a system to assess the role of WT1 and GATA4 during gonad differentiation. *PLoS One*, 12, e0176296.
- Rungarunlert, S., M. Techakumphu, M. K. Pirty and A. Dinnyes, 2009: Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World journal of stem cells*, 1, 11-21.
- Russell, L. B. and E. H. Chu, 1961: An XXY male in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47, 571-575.
- Safarinejad, M. R., N. Shafiei and S. Safarinejad, 2010: Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 122, 193-203.
- Saitou, M., S. C. Barton and M. A. Surani, 2002: A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, 418, 293-300.
- Saitou, M., S. Kagiwada and K. Kurimoto, 2012: Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 139, 15-31.
- Salehi, Z., L. Gholizadeh, H. Vaziri and A. H. Madani, 2012: Analysis of GSTM1, GSTT1, and CYP1A1 in idiopathic male infertility. *Reproductive sciences*, 19, 81-85.
- Salzberg, Y., T. Eldar, O. D. Karminsky, S. B. Itach, S. Pietrokovski and J. Don, 2010: Meig1 deficiency causes a severe defect in mouse spermatogenesis. *Dev Biol*, 338, 158-167.
- Sanborn, B. M., L. A. Caston, C. Chang, S. Liao, R. Speller, L. D. Porter and C. Y. Ku, 1991: Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular cells. *Biol Reprod*, 45, 634-641.
- Sanderson, M. L., T. J. Hassold and D. T. Carrell, 2008: Proteins involved in meiotic recombination: a role in male infertility? *Syst Biol Reprod Med*, 54, 57-74.
- Sarkar, P. S., S. Paul, J. Han and S. Reddy, 2004: Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum Mol Genet*, 13, 1421-1431.
- Sasagawa, Y., T. Urano, Y. Kohara, H. Takahashi and A. Higashitani, 2003: Caenorhabditis elegans RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes Cells*, 8, 857-872.
- Sasaki, T., E. Marcon, T. McQuire, Y. Arai, P. B. Moens and H. Okada, 2008: Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol*, 182, 449-458.
- Schimmer, B. P. and P. C. White, 2010: Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*, 24, 1322-1337.
- Schrans-Stassen, B. H., P. T. Saunders, H. J. Cooke and D. G. de Rooij, 2001: Nature of the spermatogenic arrest in Dazl<sup>-/-</sup> mice. *Biol Reprod*, 65, 771-776.
- Schurmann, A., S. Koling, S. Jacobs, P. Saftig, S. Krauss, G. Wennemuth, R. Kluge and H. G. Joost, 2002: Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol*, 22, 2761-2768.
- Scudellari, M., 2016: How iPS cells changed the world. *Nature*, 534, 310-312.
- Seeherunvong, T., E. M. Perera, Y. Bao, P. J. Benke, A. Benigno, R. P. Donahue and G. D. Berkovitz, 2004: 46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q. *American journal of medical genetics. Part A*, 127A, 149-151.
- Seki, T., S. Yuasa, M. Oda, T. Egashira, K. Yae, D. Kusumoto, H. Nakata, S. Tohyama, H. Hashimoto, M. Kodaira, Y. Okada, H. Seimiya, N. Fusaki, M. Hasegawa and K. Fukuda, 2010: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 7, 11-14.
- Sekido, R. and R. Lovell-Badge, 2008: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453, 930-934.
- Sekido, R. and R. Lovell-Badge, 2009: Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends in genetics : TIG*, 25, 19-29.
- Sen, S., P. Ambulkar, I. Hinduja, K. Zaveri, J. Gokral, A. Pal and D. Modi, 2015: Susceptibility of gr/gr rearrangements to azoospermia or oligozoospermia is dependent on DAZ and CDY1 gene copy deletions. *J Assist Reprod Genet*, 32, 1333-1341.
- Sexton, T., E. Yaffe, E. Kenigsberg, F. Bantignies, B. Leblanc, M. Hoichman, H. Parrinello, A. Tanay and G. Cavalli, 2012: Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell*, 148, 458-472.
- Sharlip, I. D., J. P. Jarow, A. M. Belker, L. I. Lipshultz, M. Sigman, A. J. Thomas, P. N. Schlegel, S. S. Howards, A. Nehra, M. D. Damewood, J. W. Overstreet and R. Sadovsky, 2002: Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*, 77, 873-882.
- Sharma, R., K. R. Biedenharn, J. M. Fedor and A. Agarwal, 2013: Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 66.
- Sharpe, R. M., C. McKinnell, C. Kivlin and J. S. Fisher, 2003: Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-784.





- She, Z. Y. and W. X. Yang, 2014: Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of molecular endocrinology*, 53, R21-37.
- Shi, Y., C. Desponts, J. T. Do, H. S. Hahm, H. R. Scholer and S. Ding, 2008: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3, 568-574.
- Shi, Y., H. Inoue, J. C. Wu and S. Yamanaka, 2017: Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews. Drug discovery*, 16, 115-130.
- Shimizu, T., M. Shiohara, T. Tai, K. Nagao, K. Nakajima and H. Kobayashi, 2016: Derivation of integration-free iPSCs from a Klinefelter syndrome patient. *Reproductive medicine and biology*, 15, 35-43.
- Shimizu, T., J. Ueda, J. C. Ho, K. Iwasaki, L. Poellinger, I. Harada and Y. Sawada, 2012: Dual inhibition of Src and GSK3 maintains mouse embryonic stem cells, whose differentiation is mechanically regulated by Src signaling. *Stem Cells*, 30, 1394-1404.
- Siffroi, J. P., 2015: Où en est la génétique de l'infertilité masculine ? *Gynécologie Endocrinologie*, 17, 281-289.
- Siffroi, J. P., S. Chantot-Bastarud and C. Ravel, 2003: [Genetic origin of spermatogenesis impairments: clinical aspects and relationships with mouse models of infertility]. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 31, 504-515.
- Silva, J., J. Nichols, T. W. Theunissen, G. Guo, A. L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers and A. Smith, 2009: Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 138, 722-737.
- Silva, S. S., R. K. Rowntree, S. Mekhoubad and J. T. Lee, 2008: X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4820-4825.
- Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischau, R. Lovell-Badge and P. N. Goodfellow, 1990: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- Singh, A. M., M. Bechard, K. Smith and S. Dalton, 2012: Reconciling the different roles of Gsk3beta in "naive" and "primed" pluripotent stem cells. *Cell Cycle*, 11, 2991-2996.
- Skinner, M., 2005: Sertoli Cell Secreted Regulatory Factors. *Elsevier Science (USA)*, Chapter 8.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl and D. Rogers, 1988: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-690.
- Smith, L. B. and W. H. Walker, 2014: The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol*, 30, 2-13.
- Smith, Z. D., M. M. Chan, K. C. Humm, R. Karnik, S. Mekhoubad, A. Regev, K. Eggan and A. Meissner, 2014: DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature*, 511, 611-615.
- Solari, A. J., 1974: The behavior of the XY pair in mammals. *International review of cytology*, 38, 273-317.
- Soldner, F., D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G. W. Bell, E. G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson and R. Jaenisch, 2009: Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 136, 964-977.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer and P. Lichter, 1997: Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20, 399-407.
- Solter, D. and B. B. Knowles, 1978: Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5565-5569.
- Sommer, C. A., A. G. Sommer, T. A. Longmire, C. Christodoulou, D. D. Thomas, M. Gostissa, F. W. Alt, G. J. Murphy, D. N. Kotton and G. Mostoslavsky, 2010: Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*, 28, 64-74.
- Sommer, C. A., M. Stadtfeld, G. J. Murphy, K. Hochedlinger, D. N. Kotton and G. Mostoslavsky, 2009: Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 27, 543-549.
- Song, S. H., S. H. Shim, J. K. Bang, J. E. Park, S. R. Sung and D. H. Cha, 2012: Genome-wide screening of severe male factor infertile patients using BAC-array comparative genomic hybridization (CGH). *Gene*, 506, 248-252.
- Song, X., Y. Zhao, Q. Cai, Y. Zhang and Y. Niu, 2013: Association of the Glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphism with male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 30, 131-141.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir and K. Hochedlinger, 2008: Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322, 945-949.
- Staerk, J., M. M. Dawlaty, Q. Gao, D. Maetzel, J. Hanna, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky and R. Jaenisch, 2010: Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 20-24.
- Steinemann, D., G. Gohring and B. Schlegelberger, 2013: Genetic instability of modified stem cells - a first step towards malignant transformation? *American journal of stem cells*, 2, 39-51.
- Stevens, L. C., 1967: The biology of teratomas. *Adv Morphog*, 6, 1-31.
- Stewart, C. L., I. Gadi and H. Bhatt, 1994: Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol*, 161, 626-628.



- Stock, J. K., S. Giadrossi, M. Casanova, E. Brookes, M. Vidal, H. Koseki, N. Brockdorff, A. G. Fisher and A. Pombo, 2007: Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, 9, 1428-1435.
- Stouffs, K., D. Vandermaelen, A. Massart, B. Menten, S. Vergult, H. Tournaye and W. Lissens, 2012: Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Hum Reprod*, 27, 921-929.
- Subramanyam, D., S. Lamouille, R. L. Judson, J. Y. Liu, N. Bucay, R. Derynck and R. Blelloch, 2011: Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 29, 443-448.
- Sumida, C., N. Kondoh, M. Kurajoh, H. Koyama, Z. Tsutsumi, Y. Moriwaki and T. Yamamoto, 2011: 21-hydroxylase deficiency associated with male infertility: report of 2 cases with gene analyses. *Internal medicine*, 50, 1317-1321.
- Sunnotel, O., L. Hiripi, K. Lagan, J. R. McDaid, J. M. De Leon, Y. Miyagawa, H. Crowe, S. Kaluskar, M. Ward, C. Scullion, A. Campbell, C. S. Downes, D. Hirst, D. Barton, E. Mocanu, A. Tsujimura, M. B. Cox, T. Robson and C. P. Walsh, 2010: Alterations in the steroid hormone receptor co-chaperone FKBP1 are associated with male infertility: a case-control study. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 22.
- Surani, M. A., K. Hayashi and P. Hajkova, 2007: Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, 128, 747-762.
- Suzuki, T., N. Kosaka-Suzuki, S. Pack, D. M. Shin, J. Yoon, Z. Abdullaev, E. Pugacheva, H. C. Morse, 3rd, D. Loukinov and V. Lobanenko, 2010: 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.
- Suzuki, Y., I. Sasagawa, K. Itoh, J. Ashida, K. Muroya and T. Ogata, 2002: Estrogen receptor alpha gene polymorphism is associated with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril*, 78, 1341-1343.
- Swain, A., V. Narvaez, P. Burgoyne, G. Camerino and R. Lovell-Badge, 1998: Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*, 391, 761-767.
- Syrjanen, J. L., L. Pellegrini and O. R. Davies, 2014: A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife*, 3.
- Taapken, S. M., B. S. Nisler, M. A. Newton, T. L. Sampsell-Barron, K. A. Leonhard, E. M. McIntire and K. D. Montgomery, 2011: Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 29, 313-314.
- Tachdjian, G., S. Brisset, A.-M. Courtot, D. Schoëvaert and L. Tosca, 2016: Embryologie et histologie humaines. *ELSEVIER MASSON*.
- Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji and T. Tada, 2001: Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 11, 1553-1558.
- Tahmasbpour, E., D. Balasubramanian and A. Agarwal, 2014: A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet*, 31, 1115-1137.
- Tai, C. I. and Q. L. Ying, 2013: Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J Cell Sci*, 126, 1093-1098.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, 2007: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-872.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka, 2006: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676.
- Takashima, Y., G. Guo, R. Loos, J. Nichols, G. Ficz, F. Krueger, D. Oxley, F. Santos, J. Clarke, W. Mansfield, W. Reik, P. Bertone and A. Smith, 2014: Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, 158, 1254-1269.
- Taketo, T., 2015: The role of sex chromosomes in mammalian germ cell differentiation: can the germ cells carrying X and Y chromosomes differentiate into fertile oocytes? *Asian J Androl*, 17, 360-366.
- Takeuchi, Y., K. Molyneaux, C. Runyan, K. Schaible and C. Wylie, 2005: The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse. *Development*, 132, 5399-5409.
- Tang, M., S. Wang, W. Wang, Q. Cao, C. Qin, B. Liu, P. Li and W. Zhang, 2012: The glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) and idiopathic male infertility risk: a meta-analysis. *Gene*, 511, 218-223.
- Tang, P., A. Argentaro, A. J. Pask, L. O'Donnell, J. Marshall-Graves, M. Familari and V. R. Harley, 2011: Localization of the chromatin remodelling protein, ATRX in the adult testis. *The Journal of reproduction and development*, 57, 317-321.
- Tang, W. W., T. Kobayashi, N. Irie, S. Dietmann and M. A. Surani, 2016: Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat Rev Genet*, 17, 585-600.
- Tesar, P. J., J. G. Chenoweth, F. A. Brook, T. J. Davies, E. P. Evans, D. L. Mack, R. L. Gardner and R. D. McKay, 2007: New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 196-199.
- Teves, M. E., K. N. Jha, J. Song, D. R. Nagarkatti-Gude, J. C. Herr, J. A. Foster, J. F. Strauss, 3rd and Z. Zhang, 2013: Germ cell-specific disruption of the Meig1 gene causes impaired spermiogenesis in mice. *Andrology*, 1, 37-46.
- Tevosian, S. G. and N. L. Manuylov, 2008: To beta or not to beta: canonical beta-catenin signaling pathway and ovarian development. *Dev Dyn*, 237, 3672-3680.



- Theunissen, T. W., B. E. Powell, H. Wang, M. Mitalipova, D. A. Faddah, J. Reddy, Z. P. Fan, D. Maetzel, K. Ganz, L. Shi, T. Lungjangwa, S. Imsoonthornruksa, Y. Stelzer, S. Rangarajan, A. D'Alessio, J. Zhang, Q. Gao, M. M. Dawlaty, R. A. Young, N. S. Gray and R. Jaenisch, 2014: Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, 15, 471-487.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones, 1998: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker and J. P. Hearn, 1995: Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7844-7848.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris and J. P. Hearn, 1996: Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55, 254-259.
- Thonneau, P., S. Marchand, A. Tallec, M. L. Ferial, B. Ducot, J. Lansac, P. Lopes, J. M. Tabaste and A. Spira, 1991: Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod*, 6, 811-816.
- Tirumala Vani, G., N. Mukesh, B. Siva Prasad, P. Rama Devi, M. Hema Prasad, P. Usha Rani and P. Pardhanandana Reddy, 2010: Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males. *Andrologia*, 42, 213-217.
- Tomaselli, S., F. Megiorni, L. Lin, M. C. Mazzilli, D. Gerrelli, S. Majore, P. Grammatico and J. C. Achermann, 2011: Human RSP01/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments beta-catenin signaling. *PLoS One*, 6, e16366.
- Tommerup, N., M. B. Rasmussen, M. M. Mehrjouy, I. Bache, A. Lind-Thomsen, A. Carolina dos Santos Fonseca, C. Halgren, M. Bak and P. Jacky, 2015: International Breakpoint Mapping Consortium (IBMC). Systematic Mapping of Chromosomal Breakpoints in the Context of Phenotypes and Nuclear Genome Organization. *Cancer Genetics*, 208, 359-360.
- Tommerup, N., W. Schempp, P. Meinecke, S. Pedersen, L. Bolund, C. Brandt, C. Goodpasture, P. Guldberg, K. R. Held, H. Reinwein and et al., 1993: Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet*, 4, 170-174.
- Tosca, L., A.-M. Courtot, A. Bennaceur-Griscelli and G. Tachdjian, 2011: Production in vitro de cellules germinales murines et humaines à partir de cellules souches pluripotentes. *Médecine sciences*, 27, 866-874.
- Tosca, L., O. Feraud, A. Magniez, C. Bas, F. Griscelli, A. Bennaceur-Griscelli and G. Tachdjian, 2015: Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. *Molecular cytogenetics*, 8, 30.
- Tumer, Z., T. L. Harboe, E. Blennow, V. M. Kalscheuer, N. Tommerup and K. Brondum-Nielsen, 2004: Molecular cytogenetic characterization of ring chromosome 15 in three unrelated patients. *American journal of medical genetics. Part A*, 130A, 340-344.
- Turner, J. M., 2007: Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, 134, 1823-1831.
- Tuttelmann, F., M. Simoni, S. Kliesch, S. Ledig, B. Dworniczak, P. Wieacker and A. Ropke, 2011: Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS One*, 6, e19426.
- Uhlenhaut, N. H., S. Jakob, K. Anlag, T. Eisenberger, R. Sekido, J. Kress, A. C. Treier, C. Klugmann, C. Klasen, N. I. Holter, D. Riethmacher, G. Schutz, A. J. Cooney, R. Lovell-Badge and M. Treier, 2009: Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139, 1130-1142.
- Utikal, J., N. Maherali, W. Kulalert and K. Hochedlinger, 2009: Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*, 122, 3502-3510.
- Valamehr, B., M. Robinson, R. Abujarour, B. Reznier, F. Vranceanu, T. Le, A. Medcalf, T. T. Lee, M. Fitch, D. Robbins and P. Flynn, 2014: Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2, 366-381.
- Valetto, A., V. Bertini, E. Rapalini and P. Simi, 2005: A 46,XX SRY-negative man with complete virilization and infertility as the main anomaly. *Fertil Steril*, 83, 216-219.
- Vallier, L., M. Alexander and R. A. Pedersen, 2005: Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 118, 4495-4509.
- Van Assche, E., M. Bonduelle, H. Tournaye, H. Joris, G. Verheyen, P. Devroey, A. Van Steirteghem and I. Liebaers, 1996: Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*, 11 Suppl 4, 1-24; discussion 25-26.
- van Oosten, A. L., Y. Costa, A. Smith and J. C. Silva, 2012: JAK/STAT3 signalling is sufficient and dominant over antagonistic cues for the establishment of naive pluripotency. *Nat Commun*, 3, 817.
- Veillard, A. C., H. Marks, A. S. Bernardo, L. Jouneau, D. Laloe, L. Boulanger, A. Kaan, V. Brochard, M. Tosolini, R. Pedersen, H. Stunnenberg and A. Jouneau, 2014: Stable methylation at promoters distinguishes epiblast stem cells from embryonic stem cells and the in vivo epiblasts. *Stem Cells Dev*, 23, 2014-2029.
- Verlinsky, Y., N. Strelchenko, V. Kukharensko, S. Rechitsky, O. Verlinsky, V. Galat and A. Kuliev, 2005: Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online*, 10, 105-110.
- Vermeesch, J. R., E. Baten, J. P. Fryns and K. Devriendt, 2002: Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences. *Clinical genetics*, 62, 415-417.



- Vetro, A., R. Ciccone, R. Giorda, M. G. Patricelli, E. Della Mina, A. Forlino and O. Zuffardi, 2011: XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *Journal of medical genetics*, 48, 710-712.
- Vetro, A., M. R. Dehghani, L. Kraoua, R. Giorda, S. Beri, L. Cardarelli, M. Merico, E. Manolakos, A. Parada-Bustamante, A. Castro, O. Radi, G. Camerino, A. Brusco, M. Sabaghian, C. Sofocleous, F. Forzano, P. Palumbo, O. Palumbo, S. Calvano, L. Zelante, P. Grammatico, S. Giglio, M. Basly, M. Chaabouni, M. Carella, G. Russo, M. C. Bonaglia and O. Zuffardi, 2015: Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *European journal of human genetics : EJHG*, 23, 1025-1032.
- Vinci, G., R. Brauner, A. Tar, H. Rouba, J. Sheth, F. Sheth, C. Ravel, K. McElreavey and A. Bashamboo, 2009: Mutations in the TSPYL1 gene associated with 46,XY disorder of sex development and male infertility. *Fertil Steril*, 92, 1347-1350.
- Virtanen, H. E., N. Jorgensen and J. Toppari, 2017: Semen quality in the 21st century. *Nature reviews. Urology*, 14, 120-130.
- Visootsak, J. and J. M. Graham, Jr., 2006: Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet journal of rare diseases*, 1, 42.
- Vloeberghs, V., G. Verheyen, P. Haentjens, A. Goossens, N. P. Polyzos and H. Tournaye, 2015: How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod*, 30, 1790-1796.
- Walker, W. H. and J. Cheng, 2005: FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130, 15-28.
- Wang, J., G. Xie, M. Singh, A. T. Ghanbarian, T. Rasko, A. Szvetnik, H. Cai, D. Besser, A. Prigione, N. V. Fuchs, G. G. Schumann, W. Chen, M. C. Lorincz, Z. Ivics, L. D. Hurst and Z. Izsvak, 2014: Primate-specific endogenous retrovirus-driven transcription defines naive-like stem cells. *Nature*, 516, 405-409.
- Ware, C. B., A. M. Nelson, B. Mecham, J. Hesson, W. Zhou, E. C. Jonlin, A. J. Jimenez-Caliani, X. Deng, C. Cavanaugh, S. Cook, P. J. Tesar, J. Okada, L. Margaretha, H. Sperber, M. Choi, C. A. Blau, P. M. Treuting, R. D. Hawkins, V. Cirulli and H. Ruohola-Baker, 2014: Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4484-4489.
- Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger and D. J. Rossi, 2010: Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618-630.
- Wei, W., T. W. Fitzgerald, Q. Ayub, A. Massaia, B. H. Smith, A. F. Dominiczak, A. D. Morris, D. J. Porteous, M. E. Hurler, C. Tyler-Smith and Y. Xue, 2015: Copy number variation in the human Y chromosome in the UK population. *Human genetics*, 134, 789-800.
- Weinberger, L., M. Ayyash, N. Novershtern and J. H. Hanna, 2016: Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17, 155-169.
- Welshons, W. J. and L. B. Russell, 1959: The Y-Chromosome as the Bearer of Male Determining Factors in the Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 45, 560-566.
- Wernig, M., C. J. Lengner, J. Hanna, M. A. Lodato, E. Steine, R. Foreman, J. Staerk, S. Markoulaki and R. Jaenisch, 2008a: A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*, 26, 916-924.
- Wernig, M., A. Meissner, J. P. Cassady and R. Jaenisch, 2008b: c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2, 10-12.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein and R. Jaenisch, 2007: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448, 318-324.
- Westerveld, G. H., S. Repping, M. P. Lombardi and F. van der Veen, 2005: Mutations in the chromosome pairing gene FKBP6 are not a common cause of non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 11, 673-675.
- White, M. K., W. Hu and K. Khalili, 2015: The CRISPR/Cas9 genome editing methodology as a weapon against human viruses. *Discov Med*, 19, 255-262.
- White, S., J. Hewitt, E. Turbitt, Y. van der Zwan, R. Hersmus, S. Drop, P. Koopman, V. Harley, M. Cools, L. Looijenga and A. Sinclair, 2012: A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46,XY disorder of sex development. *European journal of human genetics : EJHG*, 20, 348-351.
- Wilkie, A. O., F. M. Campbell, P. Daubeney, D. B. Grant, R. J. Daniels, M. Mullarkey, N. A. Affara, M. Fitchett and S. M. Huson, 1993: Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. *American journal of medical genetics*, 46, 597-600.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola and N. M. Gough, 1988: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-687.
- Wilmot, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell, 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813.
- Woltjen, K., I. P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H. K. Sung and A. Nagy, 2009: piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458, 766-770.





- Wray, J., T. Kalkan, S. Gomez-Lopez, D. Eckardt, A. Cook, R. Kemler and A. Smith, 2011: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol*, 13, 838-845.
- Wu, W., J. Lu, Q. Tang, S. Zhang, B. Yuan, J. Li, W. Di, H. Sun, C. Lu, Y. Xia, D. Chen, J. Sha and X. Wang, 2013: GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and male infertility risk: an updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. *Sci Rep*, 3, 2258.
- Wu, X. and H. H. Freeze, 2002: GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80, 553-557.
- Xiao, B., X. Ji, Y. Xing, Y. W. Chen and J. Tao, 2013: A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet*, 56, 695-698.
- Xiao, J., D. H. Mai and L. Xie, 2016: Resetting Human Naive Pluripotency. *Genetics & epigenetics*, 8, 37-41.
- Xiong, D. K., H. H. Chen, X. P. Ding, S. H. Zhang and J. H. Zhang, 2015: Association of polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic azoospermia or oligospermia in Sichuan, China. *Asian J Androl*, 17, 481-486.
- Xu, A. M., B. J. Liu and Z. J. Wang, 2014: [DAZL and male infertility: an update]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*, 20, 647-650.
- Xu, C., M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J. D. Gold and M. K. Carpenter, 2001: Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19, 971-974.
- Xu, K., T. Lu, H. Zhou, L. Bai and Y. Xiang, 2010: The role of MSH5 C85T and MLH3 C2531T polymorphisms in the risk of male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411, 49-52.
- Xu, R. H., X. Chen, D. S. Li, R. Li, G. C. Addicks, C. Glennon, T. P. Zwaka and J. A. Thomson, 2002: BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, 20, 1261-1264.
- Xu, R. H., T. L. Sampsel-Barron, F. Gu, S. Root, R. M. Peck, G. Pan, J. Yu, J. Antosiewicz-Bourget, S. Tian, R. Stewart and J. A. Thomson, 2008: NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell*, 3, 196-206.
- Xu, S., W. Xia, Y. Zohar and J. F. Gui, 2013a: Zebrafish dmrta2 regulates the expression of cdkn2c in spermatogenesis in the adult testis. *Biol Reprod*, 88, 14.
- Xu, X. B., S. R. Liu, H. Q. Ying and Z. C. A, 2013b: Null genotype of GSTM1 and GSTT1 may contribute to susceptibility to male infertility with impaired spermatogenesis in Chinese population. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 18, 151-154.
- Xu, X. B., D. V. K. Pantakani, S. Lührig, X. Y. Tan, T. Khromov, J. Nolte, R. Dressel, U. Zechner and W. Engel, 2011: Stage-Specific Germ-Cell Marker Genes Are Expressed in All Mouse Pluripotent Cell Types and Emerge Early during Induced Pluripotency. *Plos One*, 6.
- Yamaji, M., Y. Seki, K. Kurimoto, Y. Yabuta, M. Yuasa, M. Shigeta, K. Yamanaka, Y. Ohinata and M. Saitou, 2008: Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet*, 40, 1016-1022.
- Yamashita, A., M. Morioka, H. Kishi, T. Kimura, Y. Yahara, M. Okada, K. Fujita, H. Sawai, S. Ikegawa and N. Tsumaki, 2014: Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*, 513, 507-511.
- Yan, H. H., D. D. Mruk, W. M. Lee and C. Y. Cheng, 2008: Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J*, 22, 1945-1959.
- Yang, F., R. De La Fuente, N. A. Leu, C. Baumann, K. J. McLaughlin and P. J. Wang, 2006: Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*, 173, 497-507.
- Yang, F., S. Silber, N. A. Leu, R. D. Oates, J. D. Marszalek, H. Skaletsky, L. G. Brown, S. Rozen, D. C. Page and P. J. Wang, 2015: TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO molecular medicine*, 7, 1198-1210.
- Yang, Y., X. Zhang, L. Yi, Z. Hou, J. Chen, X. Kou, Y. Zhao, H. Wang, X. F. Sun, C. Jiang, Y. Wang and S. Gao, 2016: Naive Induced Pluripotent Stem Cells Generated From beta-Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*, 5, 8-19.
- Yao, H. H., M. M. Matzuk, C. J. Jorgez, D. B. Menke, D. C. Page, A. Swain and B. Capel, 2004: Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*, 230, 210-215.
- Yao, H. H., W. Whoriskey and B. Capel, 2002: Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*, 16, 1433-1440.
- Yatsenko, A. N., A. P. Georgiadis, A. Ropke, A. J. Berman, T. Jaffe, M. Olszewska, B. Westernstroer, J. Sanfilippo, M. Kurpysz, A. Rajkovic, S. A. Yatsenko, S. Kliesch, S. Schlatt and F. Tuttlmann, 2015: X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *The New England journal of medicine*, 372, 2097-2107.
- Ye, J. J., L. Ma, L. J. Yang, J. H. Wang, Y. L. Wang, H. Guo, N. Gong, W. H. Nie and S. H. Zhao, 2013: Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14, 807-815.
- Ye, S., D. Liu and Q. L. Ying, 2014: Signaling pathways in induced naive pluripotency. *Curr Opin Genet Dev*, 28, 10-15.



- Ye, Z., H. Zhan, P. Mali, S. Dowey, D. M. Williams, Y. Y. Jang, C. V. Dang, J. L. Spivak, A. R. Moliterno and L. Cheng, 2009: Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*, 114, 5473-5480.
- Yeh, S., M. Y. Tsai, Q. Xu, X. M. Mu, H. Lardy, K. E. Huang, H. Lin, S. D. Yeh, S. Altuwajri, X. Zhou, L. Xing, B. F. Boyce, M. C. Hung, S. Zhang, L. Gan and C. Chang, 2002: Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13498-13503.
- Yen, P., 2001: The fragility of fertility. *Nat Genet*, 29, 243-244.
- Ying, H. Q., Y. Qi, X. Y. Pu, S. R. Liu and Z. C. A., 2013: Association of GSTM1 and GSTT1 genes with the susceptibility to male infertility: result from a meta-analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17, 535-542.
- Ying, H. Q., M. B. Scott and A. Zhou-Cun, 2012: Relationship of SNP of H2BFWT gene to male infertility in a Chinese population with idiopathic spermatogenesis impairment. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 17, 402-406.
- Ying, Q. L., J. Nichols, I. Chambers and A. Smith, 2003: BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115, 281-292.
- Ying, Q. L., J. Wray, J. Nichols, L. Batlle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen and A. Smith, 2008: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453, 519-523.
- Ying, Y. and G. Q. Zhao, 2001: Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*, 232, 484-492.
- Yip, M. Y., 2015: Autosomal ring chromosomes in human genetic disorders. *Translational pediatrics*, 4, 164-174.
- Young, J., 2016: Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration. *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète*, 80.
- Young, M. A., D. E. Larson, C. W. Sun, D. R. George, L. Ding, C. A. Miller, L. Lin, K. M. Pawlik, K. Chen, X. Fan, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, L. L. Cook, G. W. Swift, R. T. Demeter, M. C. Wendl, M. S. Sands, E. R. Mardis, R. K. Wilson, T. M. Townes and T. J. Ley, 2012: Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 570-582.
- Yu, J., K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson, 2009: Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324, 797-801.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson, 2007: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.
- Yu, X. W., Z. T. Wei, Y. T. Jiang and S. L. Zhang, 2015: Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8, 14634-14646.
- Yuan, L., J. G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt and C. Hoog, 2000: The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5, 73-83.
- Zariwala, M. A., M. R. Knowles and M. W. Leigh, 2015: GeneReviews. Primary Ciliary Dyskinesia.
- Zenteno, J. C., M. Lopez, C. Vera, J. P. Mendez and S. Kofman-Alfaro, 1997: Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Human genetics*, 100, 606-610.
- Zhang, J., G. F. Wilson, A. G. Soerens, C. H. Koonce, J. Yu, S. P. Palecek, J. A. Thomson and T. J. Kamp, 2009: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 104, e30-41.
- Zhang, S. and W. Cui, 2014: Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, 6, 305-311.
- Zhang, W., Y. Yang, D. Su, Y. Ma and S. Zhang, 2008: Absence of the H2AX mutations in idiopathic infertile men with spermatogenic impairment. *Syst Biol Reprod Med*, 54, 93-95.
- Zhang, W., S. Z. Zhang and Z. C. A., 2006: [Synaptonemal complex--an essential role in etiology of idiopathic azoospermia]. *Yi chuan = Hereditas*, 28, 231-235.
- Zhang, Y. Q., X. Z. He, J. S. Zhang, R. A. Wang, J. Zhou and R. J. Xu, 2004: Stage-specific localization of transforming growth factor beta1 and beta3 and their receptors during spermatogenesis in men. *Asian J Androl*, 6, 105-109.
- Zhao, H., J. Xu, H. Zhang, J. Sun, Y. Sun, Z. Wang, J. Liu, Q. Ding, S. Lu, R. Shi, L. You, Y. Qin, X. Zhao, X. Lin, X. Li, J. Feng, L. Wang, J. M. Trent, C. Xu, Y. Gao, B. Zhang, X. Gao, J. Hu, H. Chen, G. Li, J. Zhao, S. Zou, H. Jiang, C. Hao, Y. Zhao, J. Ma, S. L. Zheng and Z. J. Chen, 2012: A genome-wide association study reveals that variants within the HLA region are associated with risk for nonobstructive azoospermia. *American journal of human genetics*, 90, 900-906.
- Zhao, L., T. Svingen, E. T. Ng and P. Koopman, 2015a: Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of Dmrt1. *Development*, 142, 1083-1088.
- Zhao, Q. G., B. S. Lu and P. T. Huang, 2005: [Functions of FANCL in primordial germ cell formation and Fanconi anemia]. *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica*, 32, 993-1000.
- Zhao, T., Z. N. Zhang, Z. Rong and Y. Xu, 2011: Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474, 212-215.



- Zhao, W. W., M. Wu, F. Chen, S. Jiang, H. Su, J. Liang, C. Deng, C. Hu and S. Yu, 2015b: Robertsonian translocations: an overview of 872 Robertsonian translocations identified in a diagnostic laboratory in China. *PLoS One*, 10, e0122647.
- Zhou, H., S. Wu, J. Y. Joo, S. Zhu, D. W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H. R. Scholer, L. Duan and S. Ding, 2009: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4, 381-384.
- Zhou, W. and C. R. Freed, 2009: Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27, 2667-2674.



## **ANNEXES**





## ANNEXE 1



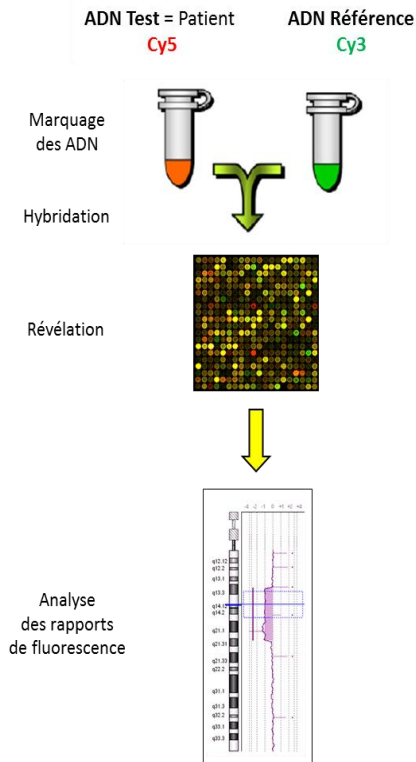
Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique (Pr Gérard Tachdjian)  
Unité fonctionnelle de Cytogénétique  
Hôpital Antoine Bécère, Clamart

### Notice d'information concernant l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) dans le cadre de la recherche

Il vous est proposé dans le cadre de la recherche une étude de vos chromosomes par une analyse biologique appelée ACPA. Cette analyse nécessite des informations qui vous soient transmises et expliquées par un professionnel de la santé (conseiller en génétique, médecin, sage-femme) qui propose l'analyse afin de vous aider à mieux comprendre les investigations entreprises.

#### Qu'est-ce que l'ACPA ?

Cet acronyme signifie **A**nalyse **C**hromosomique sur **P**uce à **A**DN, appelé aussi CGH-array en anglais ou Hybridation Génomique Comparative sur micro-réseau d'ADN. Vous pouvez trouver d'autres termes pour cette technique, comme étude génomique sur puce à ADN ou caryotype moléculaire. C'est une technique d'étude des chromosomes qui permet de détecter des anomalies chromosomiques non visibles sur le caryotype. Dans une ACPA, c'est le génome, c'est à dire l'ADN de tous les chromosomes, qui est étudié. Cette notice a pour objectif de vous expliquer le bénéfice et les limites de l'examen de l'ACPA.



#### Quels sont les avantages d'une ACPA par rapport au caryotype ?

L'ACPA permet de rechercher des anomalies chromosomiques de petite taille, difficiles ou impossibles à voir sur un caryotype. Il s'agit donc d'une analyse de l'ensemble du génome comme le caryotype, mais avec un zoom 10 à 100 fois plus important, c'est-à-dire que cet examen permet de voir des anomalies 10 à 100 fois plus petites que les anomalies visibles sur un caryotype. L'ACPA permet donc d'augmenter la détection d'anomalies chromosomiques.

#### Comment fait-on une ACPA ?

À partir d'un prélèvement de vos cellules, l'ADN à tester va être extrait et analysé. Grâce à l'ACPA, le contenu du génome (c'est-à-dire l'ensemble des chromosomes) va être comparé à celui d'un témoin. L'objectif est de déterminer s'il existe ou non des régions du génome qui seraient présentes en excès ou absentes. Ces gains ou ces pertes de matériel chromosomique sont appelés CNV pour Variations du Nombre de Copies (d'ADN). En pratique, on étudie des milliers voire des dizaines de milliers de régions sur l'ensemble du génome.



**N'est-il pas parfois normal d'avoir des gains ou des pertes de matériel chromosomique dans le génome ?**

Effectivement, il existe chez toutes les personnes des pertes ou des gains de matériel chromosomique dans certaines régions du génome. Ce sont des CNV bénins ou polymorphiques qui n'ont pas de conséquence délétère pour l'individu porteur.

**Quelles sont les limites de l'ACPA ?**

La technique d'ACPA ne permet pas de voir les remaniements chromosomiques équilibrés c'est-à-dire sans gain ou perte de matériel chromosomique. En cas de remaniement chromosomique équilibré, les segments chromosomiques ne sont pas à la « bonne place » : par exemple un morceau de chromosome 3 est sur le chromosome 8 et un morceau de chromosome 8 est sur le chromosome 3 : il y a juste un « échange de matériel chromosomique ». Ce type de remaniement n'est pratiquement jamais à l'origine d'anomalies du développement.

L'ACPA ne permet pas de détecter une anomalie en faible mosaïque (c'est à dire la présence d'une anomalie chromosomique dans moins de 10-20% des cellules).

L'ACPA ne détecte pas les mutations dans les gènes. Les mutations ne sont mises en évidence que par des techniques de biologie moléculaire.

**Est-ce qu'un traitement est possible lorsqu'une anomalie chromosomique pathogène est identifiée ?**

Le diagnostic d'une anomalie chromosomique est important car cela permet de connaître la cause de sa pathologie. Cependant, actuellement une anomalie génétique ne peut pas être traitée directement dans les cellules de l'organisme. En fonction de la pathologie, la connaissance d'une anomalie chromosomique peut permettre de proposer une prise en charge médicale spécifique.

Si vous avez des interrogations sur cette analyse, les médecins généticiens et biologistes sont à votre disposition pour répondre à vos questions.



## ANNEXE 2



**TOUTE DEMANDE INCOMPLETE (NON REMPLIE ET/OU NON SIGNEE) ET/OU L'ABSENCE DES DOCUMENTS A JOINDRE IMPERATIVEMENT DONNERA LIEU A UNE PROCEDURE DE NON-CONFORMITE.**

### IDENTIFICATION

Nom : Nom de JF : Prénom :  Date de naissance :	Hôpital :  Service :  Prescripteur (Nom et signature obligatoires) :
---	--

### ANALYSE CYTOGENETIQUE POSTNATALE

Prélèvement : Date : \_\_\_\_\_ Heure : \_\_\_\_\_  
Identité du préleveur : \_\_\_\_\_  
Nature :  Sang  Tissu : \_\_\_\_\_  Autre : \_\_\_\_\_

Demande d'analyse :  *Caryotype conventionnel standard*  
 *CGH-array*  
 Hybridation *in situ* (FISH) : \_\_\_\_\_  
 Vérification post-CGH-array :  FISH  q-PCR  
 Autre : \_\_\_\_\_

### RENSEIGNEMENTS CLINIQUES ET DOCUMENTS A JOINDRE IMPERATIVEMENT

Indication de la demande (cocher 1 seule case) :

Retard mental / Malformations / Indication psychiatrique / Indication neurologique  
 Anomalie du développement / Anomalie de la croissance isolée  
 Anomalie de la reproduction / Fausse couche spontanée / Mort fœtale *in utero*  
 DPI cytogénétique  DPI moléculaire  
 Etude familiale  Autre : \_\_\_\_\_

Description clinique détaillée (ou compte-rendu d'hospitalisation ou de consultation) :

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### DOCUMENTS A JOINDRE IMPERATIVEMENT

- ⇒ la présente feuille de demande remplie et signée par le prescripteur (Recto)
- ⇒ le formulaire "Attestation médicale et Consentement génétique" signé par le patient ou le responsable légal, et par le médecin prescripteur (Verso)
- ⇒ description clinique détaillée : Compte-rendu d'hospitalisation ou de consultation
- ⇒ demande de CGH-array : Fiche de renseignement clinique
- ⇒ 10 étiquettes "patient"

**Ne pas oublier de renseigner le verso**



**ECHANTILLONS ET TRANSPORTS DES PRELEVEMENTS**

Les prélèvements doivent être stériles (culture)

Analyses	Type d'échantillon	Acheminement et Délai
Caryotype / FISH	2 tubes héparine lithium de 5 ml (minimum 1 pour les enfants), tissus dans du milieu de culture, culots cellulaires, lames blanches	Transport immédiat à température ambiante, dans les 24 heures si nécessaire, conservation à +4°C
CGH-array	2 tubes EDTA de 5 ml (minimum 1 pour les enfants), ADN extrait, Tissus (congelés)	

**ATTESTATION DE CONSULTATION MEDICALE INDIVIDUELLE**  
(Préalable à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne)

Je soussigné(e) \_\_\_\_\_, certifie avoir reçu en consultation, ce jour, le(la) patient(e) susnommé(e) afin de lui apporter les informations sur :

- les caractéristiques de la maladie recherchée,
- les moyens de la détecter dans les limites des analyses biologiques,
- les possibilités de prévention et de traitement.

Fait à \_\_\_\_\_ Signature du prescripteur  
Le \_\_\_\_\_

**CONSENTEMENT POUR LA REALISATION D'EXAMENS  
DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES D'UNE PERSONNE**

Je soussigné(e) (patient, titulaire de l'autorité parentale ou représentant légal) :

Nom – Prénom : \_\_\_\_\_

Date de naissance : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Demeurant à : \_\_\_\_\_

Reconnais avoir été informé par \_\_\_\_\_, des examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisés afin de poser, confirmer ou infirmer le diagnostic d'une maladie génétique, chez la personne prélevée ou un membre de la famille.

Suis informé que les résultats de cette étude me seront personnellement transmis par le médecin prescripteur dans le cadre d'une consultation.

Cette analyse peut révéler des anomalies génétiques sans lien avec la pathologie recherchée chez moi-même. J'en serai informé par le médecin prescripteur si elles comportent un bénéfice direct, en l'état actuel de nos connaissances ; c'est-à-dire si elles apportent une possibilité de prévention et/ou de traitement pour moi-même ou ma famille.

Donne mon consentement à l'analyse à partir de :  sang  tissu (à préciser) \_\_\_\_\_  
 Acide nucléique extrait

effectué sur :  moi-même  
 mon enfant  
 la personne majeure dont j'ai la tutelle } Nom : \_\_\_\_\_  
Prénom : \_\_\_\_\_  
Date de naissance : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Peut à tout moment décider de ne pas poursuivre cette demande et demander que le matériel biologique soit détruit ou me soit éventuellement restitué.

Accepte que les échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de diagnostic complémentaire ou de recherche médicale, sans limitation de temps.  OUI  NON

Date : \_\_\_\_\_

Signature de l'intéressé(e)

Signature de l'enfant ou du majeur sous tutelle (facultatif)

**Ne pas oublier de renseigner le recto**





### ANNEXE 3

#### Liste des gènes inclus dans le design CGH-array personnalisé

##### « Infertilité et désordre du développement sexuel »

Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
ACE	chr17	61554422	61575741
ACR	chr22	51176652	51183727
ACVR2A	chr2	148602086	148688396
ADAD1	chr4	123300121	123350957
ADAM3A	chr8	39308564	39380508
ADAMTS2	chr5	178537852	178772431
ADCY10	chr1	167778357	167883608
ADCY3	chr2	25042038	25142602
ADORA1	chr1	203096833	203136533
ADRA1B	chr5	159343740	159400017
AGFG1	chr2	228336853	228425938
AHR	chr7	17338276	17385775
AIRE	chr21	45705721	45718102
AKAP3	chr12	4723837	4758213
AKAP4	chrX	49955411	49965664
AMHR2	chr12	53817594	53825439
ANOS1	chrX	8496915	8700227
APAF1	chr12	99039078	99129211
APOB	chr2	21224301	21266945
ARL4A	chr7	12726452	12730559
ART3	chr4	76932333	77033955
ATF4	chr22	39916569	39918691
ATM	chr11	108093559	108239829
AURKc	chr19	57741750	57746916
B4GALNT1	chr12	58019678	58027022
BAG6	chr6	31606805	31620953
BAX	chr19	49458117	49465055
BBS1	chr11	66278077	66301084
BBS2	chr16	56504301	56554008
BBS4	chr15	72978520	73030817
BCL2	chr18	60790579	60987011
BCL2L1	chr20	30252261	30311752
BCL2L2	chr14	23775971	23790241
BCL6	chr3	187439165	187463513
BMP4	chr14	54416454	54423554
BMP8A	chr1	39957318	39995541
BMP8B	chr1	40223903	40254533
BOLL	chr2	198591603	198651036
BPY2	chrY	25130410	25151612
BPY2B	chrY	26764151	26785354
BPY2C	chrY	27177048	27198251
BRCA2	chr13	32889617	32973809
BSG	chr19	571277	583493
BTRC	chr10	103113790	103317078
BUB1	chr2	111395275	111435684

Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
BUB1B	chr15	40453210	40513337
CAPN11	chr6	44126548	44152139
CASP3	chr4	185548850	185570629
CATSPER1	chr11	65784223	65793988
CATSPER2	chr15	43922772	43941039
CATSPER3	chr5	134303596	134347397
CATSPER4	chr1	26517119	26529033
CCNA1	chr13	37005257	37017019
CCND2	chr12	4382901	4414522
CD81	chr11	2397391	2418649
CDK2	chr12	56360556	56366573
CDKN1B	chr12	12870302	12875305
CDKN1C	chr11	2904448	2907063
CDKN2C	chr1	51434367	51440309
CDKN2D	chr19	10677138	10679655
CDY1	chrY	27768264	27771049
CDY1B	chrY	26191376	26194161
CDY2A	chrY	20137667	20139626
CDY2B	chrY	19990140	19992099
CFTR	chr7	117120017	117308719
CGA	chr6	87795216	87804865
CIB1	chr15	90773477	90808991
CKS2	chr9	91926113	91931618
CLDN11	chr3	170136653	170152479
CLGN	chr4	141309607	141348815
CNOT7	chr8	17086737	17104387
CPEB1	chr15	83211948	83316762
CREM	chr10	35415769	35501886
CRISP1	chr6	49801970	49844809
CRISP2	chr6	49660071	49681911
CRISP3	chr6	49695089	49712168
CRYBB2	chr22	25615612	25627836
CSF1	chr1	110453233	110473616
CSF2	chr5	131409485	131411863
CSNK2A1	chr20	463338	524482
CSNK2A2	chr16	58191811	58231782
CSNK2A3	chr11	11373489	11374904
CSTF2T	chr10	53455246	53459355
CYP1A1	chr15	75011883	75017951
DAZ1	chrY	25275502	25345239
DAZ2	chrY	25365604	25437503
DAZ3	chrY	26909216	26959639
DAZ4	chrY	26979967	27053187
DAZAP1	chr19	1407584	1435683
DAZL	chr3	16628299	16647006



Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>DDX25</i>	chr11	125774261	125793005
<i>DDX25</i>	chr11	125774261	125793005
<i>DDX3Y</i>	chrY	15016019	15032390
<i>DDX4</i>	chr5	55033845	55112975
<i>DHCR24</i>	chr1	55315300	55352921
<i>DHH</i>	chr12	49483204	49488602
<i>DIAPH2</i>	chrX	95939650	96855597
<i>DMC1</i>	chr22	38914954	38966201
<i>DNAH11</i>	chr7	21582833	21941451
<i>DNAH5</i>	chr5	13690437	14011841
<i>DNAI1</i>	chr9	34458750	34520987
<i>DNAJA1</i>	chr9	33025209	33039905
<i>DNMT3b</i>	chr20	31350191	31397162
<i>DNMT3L</i>	chr21	55033845	55112975
<i>DPY19L2</i>	chr12	63952693	64062354
<i>EGR1</i>	chr5	137801181	137805004
<i>EGR4</i>	chr2	73518057	73520829
<i>EIF1AY</i>	chrY	22737597	22755040
<i>EPPIN</i>	chr20	44169265	44176516
<i>ERCC1</i>	chr19	45910591	45982241
<i>ESR1</i>	chr6	152011631	152424409
<i>EXO1</i>	chr1	242011491	242053241
<i>FAM71F1</i>	chr7	128349115	128371797
<i>FANCA</i>	chr16	89803959	89883066
<i>FANCG</i>	chr9	35073833	35080043
<i>FANCL</i>	chr2	58386378	58468515
<i>FAS</i>	chr10	90750288	90775542
<i>FASLG</i>	chr1	172628185	172636013
<i>FKBP4</i>	chr12	2904108	2914589
<i>FKBP6</i>	chr7	72742155	72772646
<i>FKBPL</i>	chr6	32096484	32098067
<i>FMR1</i>	chrX	146993469	147032647
<i>FOS</i>	chr14	75745477	75748937
<i>FOXA3</i>	chr19	46367518	46377055
<i>FSCN3</i>	chr7	127233689	127241851
<i>FUS</i>	chr16	31191431	31206192
<i>GAL3ST1</i>	chr22	30950622	30970572
<i>GALT</i>	chr9	34646586	34650595
<i>GAMT</i>	chr19	1397025	1401569
<i>GAMT</i>	chr19	1397025	1401569
<i>GAPDHS</i>	chr19	36024314	36036221
<i>GBA2</i>	chr9	35736863	35749925
<i>GDF7</i>	chr2	20866424	20871250
<i>GDI1</i>	chrX	153665259	153671814
<i>GDNF</i>	chr5	37812779	37839782

Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>GGN</i>	chr19	38874992	38879096
<i>GJA1</i>	chr6	121756745	121770873
<i>GNPAT</i>	chr1	231376919	231413719
<i>GOPC</i>	chr6	117881432	117923705
<i>GSG1</i>	chr12	13236471	13256659
<i>GSTM1</i>	chr1	110230418	110240828
<i>GSTP1</i>	chr11	67351066	67354125
<i>GSTT1</i>	chr22	24376135	24384284
<i>GTSF1L</i>	chr20	42354801	42355647
<i>H1FNT</i>	chr12	48722763	48724062
<i>H2AFX</i>	chr11	118964580	118966177
<i>H2BFWT</i>	chrX	103265719	103268259
<i>H3F3A</i>	chr1	226250408	226259703
<i>HESX1</i>	chr3	57231866	57261656
<i>HFE</i>	chr6	26087422	26096438
<i>HFE</i>	chr6	26087422	26096438
<i>HMGA1</i>	chr6	34204577	34214008
<i>HMGB2</i>	chr4	174252527	174255595
<i>HNF1A</i>	chr12	121415861	121440315
<i>HOOK1</i>	chr1	60280458	60342050
<i>HOXA11</i>	chr7	27220776	27224835
<i>HOXA13</i>	chr7	27236499	27239725
<i>HSF1</i>	chr8	145515270	145538385
<i>HSF2</i>	chr6	122720696	122754264
<i>HSFY1</i>	chrY	20708574	20750849
<i>HSFY2</i>	chrY	20893326	20935621
<i>HSP90AA1</i>	chr14	102547075	102606086
<i>HSPA4L</i>	chr4	128703453	128755228
<i>INHA</i>	chr2	220436954	220440435
<i>INPP5B</i>	chr1	38326369	38412729
<i>INSL3</i>	chr19	17927322	17932383
<i>JAM3</i>	chr11	133938820	134021652
<i>JUND</i>	chr19	18390563	18392432
<i>KDM5D</i>	chrY	21867301	21906825
<i>KIT</i>	chr4	55524095	55606881
<i>KITLG</i>	chr12	88886570	88974250
<i>KLHL10</i>	chr17	39992572	40004599
<i>KRT9</i>	chr17	39722093	39728310
<i>LDHC</i>	chr11	18433851	18472798
<i>LEP</i>	chr7	127881241	127897682
<i>LEPR</i>	chr1	65886335	66103176
<i>LFNG</i>	chr7	2552163	2568811
<i>LGR4</i>	chr11	27387508	27494338
<i>LIMK2</i>	chr22	31608225	31676066
<i>LIPE</i>	chr19	42905664	42931578



Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>LMNA</i>	chr1	156052369	156109880
<i>LMTK2</i>	chr7	97736197	97838945
<i>LRP8</i>	chr1	53708036	53793821
<i>LRWD1</i>	chr7	102105335	102113615
<i>MAN2A2</i>	chr15	91447420	91465815
<i>MARK2</i>	chr11	63606400	63678492
<i>MEI1</i>	chr22	42095518	42195459
<i>MEIOC</i>	chr17	37812779	37839782
<i>MFGE8</i>	chr15	89441914	89456685
<i>MLH1</i>	chr3	37034841	37092337
<i>MLH3</i>	chr14	75480467	75518235
<i>MMEL1</i>	chr1	2522078	2564499
<i>MORC2</i>	chr22	31322598	31364483
<i>MORC3</i>	chr21	37692360	37749999
<i>MORC4</i>	chrX	106183964	106243474
<i>MSH4</i>	chr1	76262556	76379581
<i>MSH5</i>	chr6	31707725	31730455
<i>MTHFR</i>	chr1	11845787	11866160
<i>MTMR2</i>	chr11	95566044	95657371
<i>MTR</i>	chr1	236958581	237067281
<i>MTRR</i>	chr5	7851299	7901237
<i>NANOS2</i>	chr19	46416472	46418036
<i>NANOS3</i>	chr19	13988063	13991571
<i>NCOA6</i>	chr20	33302578	33413433
<i>NECTIN2</i>	chr19	45349393	45392485
<i>NHLH2</i>	chr1	116378998	116383747
<i>NLRP14</i>	chr11	7041700	7092757
<i>NOS3</i>	chr7	150688144	150711687
<i>NPC1</i>	chr18	21086148	21166581
<i>NRIP1</i>	chr21	16333556	16438224
<i>NSUN7</i>	chr4	40751914	40812002
<i>OAZ3</i>	chr1	151735445	151743806
<i>OTX1</i>	chr2	63277192	63284966
<i>OXT</i>	chr20	3052266	3053163
<i>OXTR</i>	chr3	8792094	8811300
<i>P2RX1</i>	chr17	3799885	3819960
<i>PACRG</i>	chr6	163148164	163736524
<i>PAFAH1B2</i>	chr11	117015000	117048889
<i>PARP2</i>	chr14	20811773	20826063
<i>PCSK4</i>	chr19	1481427	1490886
<i>PEBP1</i>	chr12	118573668	118583390
<i>PGAP1</i>	chr2	197697728	197791454
<i>PGS1</i>	chr17	76374705	76420740
<i>PICK1</i>	chr22	38453262	38471708
<i>PIGA</i>	chrX	15337573	15353676

Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>PIK3CB</i>	chr3	138371540	138553780
<i>PIN1</i>	chr19	9945883	9960365
<i>PIWIL1</i>	chr12	130822433	130856877
<i>PIWIL2</i>	chr8	22132810	22215560
<i>PIWIL4</i>	chr11	94279876	94354587
<i>PLA2G4C</i>	chr19	48551100	48614109
<i>PLA2G6</i>	chr22	38507502	38577857
<i>PLCD4</i>	chr2	219472488	219501909
<i>PLTP</i>	chr20	44527259	44541003
<i>PMS2</i>	chr7	6012870	6048737
<i>POLD4</i>	chr11	67118236	67121067
<i>POLG</i>	chr15	89859536	89878026
<i>PON1</i>	chr7	94927669	94953884
<i>PON2</i>	chr7	95034174	95064636
<i>PPP1CC</i>	chr12	111157613	111180783
<i>PRDM1</i>	chr6	106534195	106557814
<i>PRDM9</i>	chr5	23507724	23528706
<i>PRKACA</i>	chr19	14202500	14228559
<i>PRKAR1A</i>	chr17	66507921	66547457
<i>PRM1</i>	chr16	11374693	11375192
<i>PRM2</i>	chr16	11369493	11370337
<i>PRND</i>	chr20	4702556	4709106
<i>PROP1</i>	chr5	177419236	177423243
<i>PRY</i>	chrY	24636544	24660784
<i>PRY2</i>	chrY	24217903	24242154
<i>PRYP3</i>	chrY	25827487	25840828
<i>PRYP4</i>	chrY	28121542	28134883
<i>PSMC3IP</i>	chr17	40724328	40729849
<i>PTCH1</i>	chr9	98205264	98279247
<i>PTPN11</i>	chr12	112856536	112947717
<i>PUM2</i>	chr2	20448453	20550585
<i>PYGO2</i>	chr1	154929502	154934258
<i>RAD23B</i>	chr9	110045517	110094475
<i>RARA</i>	chr17	38465423	38513895
<i>RASIP1</i>	chr19	49223842	49244136
<i>RBMXL2</i>	chr11	7110165	7112379
<i>RBMY1A1</i>	chrY	23696724	23721586
<i>RBMY1B</i>	chrY	23673186	23687672
<i>RBMY1D</i>	chrY	24015849	24040715
<i>RBMY1E</i>	chrY	24049765	24064252
<i>RBMY1F</i>	chrY	24314689	24329172
<i>RBMY1J</i>	chrY	24549543	24564028
<i>RBP4</i>	chr10	95351593	95361101
<i>REC8</i>	chr14	24641062	24649735
<i>RPS4Y2</i>	chrY	22917954	22942918



Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>RXFP2</i>	chr13	32313679	32377009
<i>RXRB</i>	chr6	33161362	33168630
<i>SBF1</i>	chr22	50883429	50913467
<i>SBF1</i>	chr22	50883429	50913467
<i>SEPP1</i>	chr5	42799982	42812024
<i>SEPT12</i>	chr16	4827615	4838522
<i>SEPT14</i>	chr17	56597611	56618179
<i>SERPINA5</i>	chr14	95047706	95059457
<i>SERPINE2</i>	chr2	224839765	224904036
<i>SH2B1</i>	chr16	28872939	28885534
<i>SHBG</i>	chr17	7517382	7536700
<i>SIRT1</i>	chr10	69644427	69678147
<i>SIX5</i>	chr19	46268043	46272497
<i>SLC12A2</i>	chr5	127419483	127419483
<i>SLC19A2</i>	chr1	169433147	169455208
<i>SLC25A4</i>	chr4	186064417	186071538
<i>SLC4A2</i>	chr7	150755299	150773614
<i>SLC6A8</i>	chrX	152953752	152962048
<i>SMC1B</i>	chr22	45739944	45809500
<i>SMCP</i>	chr1	152850798	152857523
<i>SMPD1</i>	chr11	6411644	6416228
<i>SOHLH1</i>	chr9	138585253	138591374
<i>SPACA4</i>	chr19	49110000	49110971
<i>SPAG16</i>	chr2	214149103	215275225
<i>SPAG6</i>	chr10	22634345	22706539
<i>SPAM1</i>	chr7	123565286	123611464
<i>SPATA16</i>	chr3	172607147	172859058
<i>SPATA19</i>	chr11	133710517	133715433
<i>SPATA3</i>	chr2	231860839	231884572
<i>SPATS1</i>	chr6	44310383	44344904
<i>SPEM1</i>	chr17	7323652	7324956
<i>SPO11</i>	chr20	55904831	55919049
<i>STAT3</i>	chr17	40465342	40540586
<i>STRA8</i>	chr7	134916731	134943244
<i>SYCE1</i>	chr10	135367404	135381795
<i>SYCE2</i>	chr19	13009894	13030116
<i>SYCE3</i>	chr22	50989541	51001328
<i>SYCP1</i>	chr1	115397455	115537991
<i>SYCP2</i>	chr20	58438612	58508704
<i>SYCP3</i>	chr12	102122426	102133474
<i>TAF7L</i>	chrX	100523241	100548059
<i>TALDO1</i>	chr11	747417	765024
<i>TAP1</i>	chr6	32812986	32821748
<i>TBPL1</i>	chr6	134273308	134308638

Gènes de l'infertilité masculine			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>TCF21</i>	chr6	134210259	134216675
<i>TEKT2</i>	chr1	36549676	36553877
<i>TERT</i>	chr5	1253282	1295178
<i>TEX11</i>	chrX	69748790	70128567
<i>TEX12</i>	chr11	112004926	112043279
<i>TEX15</i>	chr8	30688939	30770512
<i>TGFB1</i>	chr19	41836812	41859831
<i>THEG</i>	chr19	361750	376688
<i>TIAL1</i>	chr10	121332977	121356541
<i>TMEM165</i>	chr4	56262080	56292342
<i>TMEM225</i>	chr11	123753633	123756340
<i>TNF</i>	chr6	31543344	31546113
<i>TNFRSF1B</i>	chr1	12227044	12269279
<i>TNP1</i>	chr2	217724181	217724782
<i>TNP2</i>	chr16	11361714	11363160
<i>TOP3B</i>	chr22	22311397	22337219
<i>TSN</i>	chr2	122513121	122525429
<i>TSPY1</i>	chrY	9304564	9307359
<i>TSPY2</i>	chrY	6114264	6117055
<i>TSPY3</i>	chrY	9236030	9238827
<i>TSPY4</i>	chrY	9175098	9177888
<i>TSSK2</i>	chr22	19118321	19120136
<i>TSSK6</i>	chr19	19625028	19626469
<i>UBE2B</i>	chr5	133706843	133727799
<i>UBQLN3</i>	chr11	5528530	5531153
<i>UBR2</i>	chr6	42531748	42661243
<i>USP26</i>	chrX	132158659	132231135
<i>USP9Y</i>	chrY	14813160	14972768
<i>UTP14C</i>	chr13	52598827	52607736
<i>UTY</i>	chrY	15360259	15592550
<i>VCY</i>	chrY	16097652	16098392
<i>VCY1B</i>	chrY	16168102	16168838
<i>VDAC3</i>	chr8	42249279	42263455
<i>WBSCR28</i>	chr7	73275489	73280223
<i>WT1</i>	chr11	32408789	32457104
<i>XKRY</i>	chrY	19880860	19882440
<i>XKRY2</i>	chrY	20297335	20298915
<i>YBX2</i>	chr17	7191571	7197876
<i>YBX3</i>	chr12	10851676	10876047
<i>ZBTB16</i>	chr11	113930289	114126702
<i>ZNF230</i>	chr19	44507077	44518072
<i>ZNF384</i>	chr12	6775643	6798738
<i>ZPBP</i>	chr7	49977023	50132860
<i>ZPBP2</i>	chr17	38024417	38034149





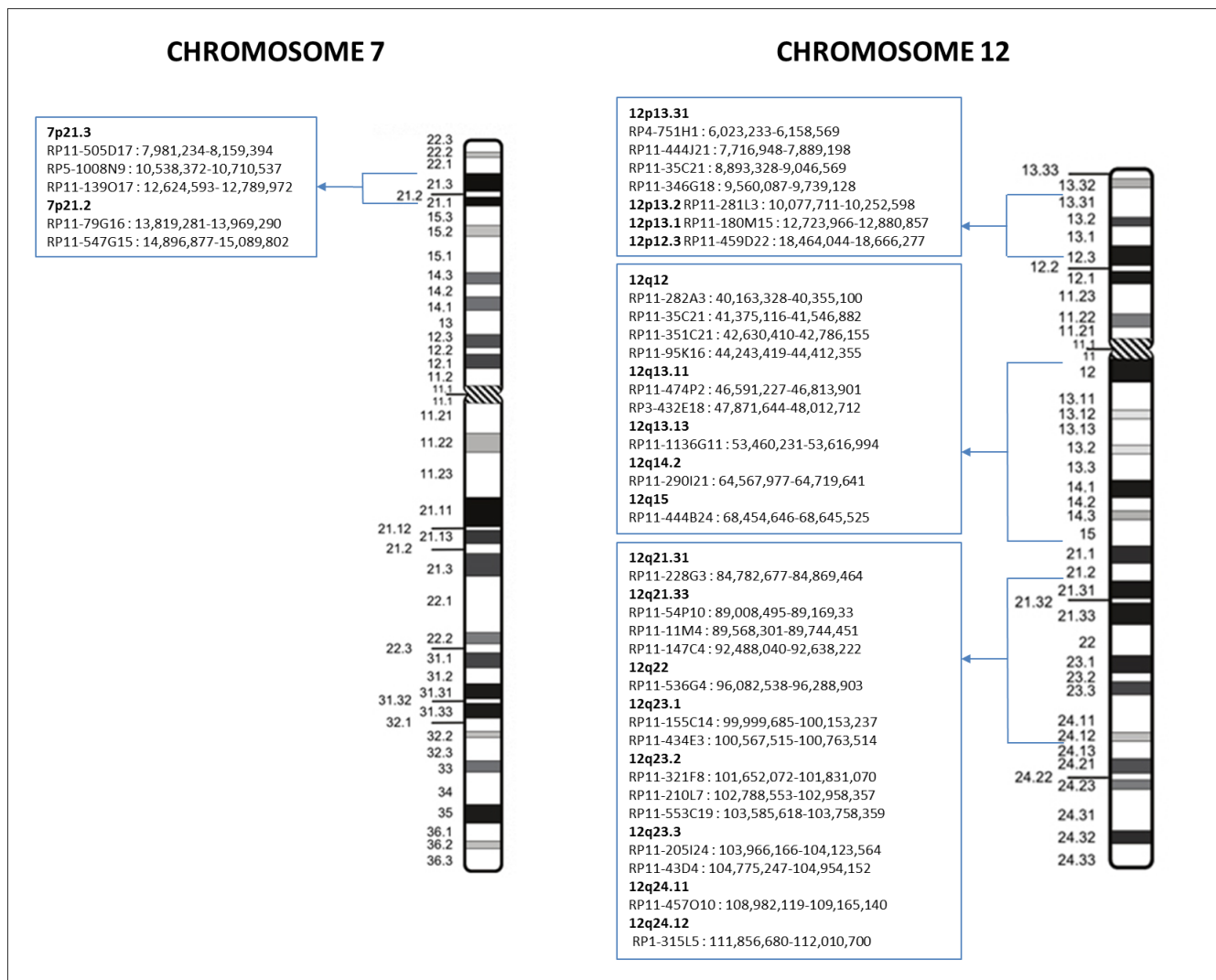
Désordre du développement sexuel			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>AKR1C2</i>	chr10	5029967	5060225
<i>AKR1C4</i>	chr10	5238798	5260910
<i>AMH</i>	chr19	2249113	2252072
<i>AR</i>	chrX	66763874	66950461
<i>ARX</i>	chrX	25021811	25034065
<i>ATF3</i>	chr1	212738676	212794119
<i>ATRX</i>	chrX	76760356	77041755
<i>BMP15</i>	chrX	50653735	50659641
<i>CBX2</i>	chr17	77751977	77761449
<i>CGA</i>	chr6	87795216	87804865
<i>CTNNB1</i>	chr3	41236401	41281939
<i>CYB5A</i>	chr18	71920527	71959251
<i>CYP11A1</i>	chr15	74630103	74660081
<i>CYP11B1</i>	chr8	143953773	143961236
<i>Cyp17A1</i>	chr10	104590288	104597290
<i>CYP19A1</i>	chr15	51500254	51630795
<i>CYP21A2</i>	chr6	32006093	32009447
<i>DHCR7</i>	chr11	71145457	71159477
<i>DHH</i>	chr12	49483204	49488602
<i>DMRT1</i>	chr9	841690	969090
<i>DMRT2</i>	chr9	1049858	1057554
<i>EMX2</i>	chr10	119301956	119309057
<i>ESR2</i>	chr14	64693751	64805268
<i>FGF8</i>	chr10	103529887	103540126
<i>FGF9</i>	chr13	22245215	22278640
<i>FGFR1</i>	chr8	38268656	38326352
<i>FGFR2</i>	chr10	123237844	123357972
<i>FOXC1</i>	chr6	1610681	1614132
<i>FOXL2</i>	chr3	138663066	138665982
<i>FSHB</i>	chr11	30252563	30256824
<i>FSHR</i>	chr2	49189296	49381666
<i>FST</i>	chr5	52776183	52782964
<i>FZD1</i>	chr7	90893783	90898132
<i>GATA4</i>	chr8	11534433	11617510
<i>GNRH1</i>	chr8	25276774	25282556
<i>GNRH2</i>	chr20	3024268	3026391
<i>GNRHR</i>	chr4	68603093	68621804
<i>GNRHR2</i>	chr1	145509820	145516076
<i>HESX1</i>	chr3	57231866	57261656
<i>HPGDS</i>	chr4	95219707	95264027
<i>HSD17B1</i>	chr17	40703984	40707232
<i>HSD17B10</i>	chrX	53458206	53461323
<i>HSD17B11</i>	chr4	88257691	88312455
<i>HSD17B12</i>	chr11	43702108	43878169

Désordre du développement sexuel			
Gène	Chromosome	Start (GRCh37)	Stop (GRCh37)
<i>HSD17B13</i>	chr4	88224941	88244056
<i>HSD17B14</i>	chr19	49316274	49339935
<i>HSD17B2</i>	chr16	82068842	82132139
<i>HSD17B3</i>	chr9	98997588	99064662
<i>HSD17B4</i>	chr5	118788138	118878030
<i>HSD17B6</i>	chr12	57146237	57181574
<i>HSD17B7</i>	chr1	162760496	162782608
<i>HSD17B8</i>	chr6	33172414	33174608
<i>HSD3B2</i>	chr1	119957554	119965662
<i>INHBB</i>	chr2	121103719	121109383
<i>KISS1</i>	chr1	204159469	204165619
<i>KISS1R</i>	chr19	917342	921015
<i>LHB</i>	chr19	49519237	49520350
<i>LHCGR</i>	chr2	48913913	48982880
<i>LHX3</i>	chr9	139088096	139096955
<i>LHX9</i>	chr1	197881635	197904606
<i>MAMLD1</i>	chrX	149529836	149682448
<i>MAP3K1</i>	chr5	56110900	56191979
<i>MID1</i>	chrX	10413350	10851829
<i>NR0B1</i>	chrX	30322539	30327495
<i>NR3C1</i>	chr5	142657496	143113322
<i>NR5A1</i>	chr9	127243515	127269769
<i>PAX6</i>	chr11	31806340	31839509
<i>PITX2</i>	chr4	111538579	111563279
<i>POR</i>	chr7	75544420	75616173
<i>PROK2</i>	chr3	71820806	71834357
<i>PROKR2</i>	chr20	5281711	5297378
<i>PTGDS</i>	chr9	139871898	139876194
<i>RSPO1</i>	chr1	38076821	38100595
<i>SOX10</i>	chr22	38368319	38380556
<i>SOX3</i>	chrX	139585152	139587225
<i>SOX8</i>	chr16	1031808	1036979
<i>SOX9</i>	chr17	70117161	70122561
<i>SRD5A1</i>	chr5	6633500	6669675
<i>SRD5A2</i>	chr2	31749656	31806040
<i>SRY</i>	chrY	2654896	2655782
<i>STAR</i>	chr8	38000218	38008783
<i>TAC3</i>	chr12	57403781	57410344
<i>TSPYL1</i>	chr6	116596022	116601280
<i>WDR11</i>	chr10	122610687	122669038
<i>WNT4</i>	chr1	22443798	22470474
<i>WWOX</i>	chr16	78133310	79246567
<i>ZFPM2</i>	chr8	106330917	106816767



## ANNEXE 4

**Sondes d'ADN BAC utilisées pour la caractérisation du remaniement chromosomique complexe chez le patient 1 et la localisation des points de cassure (GRCh37).**





**Titre :** Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles.

**Mots clés :** infertilité masculine, variation du nombre de copies d'ADN, anomalie chromosomique, anomalies du développement sexuel, cellules souches pluripotentes induites et cellules germinales primordiales.

**Résumé :** L'infertilité représente un problème majeur de santé publique en concernant 10 à 15% des couples en âge de procréer. Un facteur masculin est responsable de l'infertilité du couple dans près de la moitié des cas. Pour environ 30% d'entre eux, l'étiologie reste inexplicite.

Le premier axe du travail a concerné l'étude moléculaire d'une cohorte de patients infertiles (azoospermie non-obstructive/cryptozoospermie ou désordre du développement sexuel ou DSD) pour lesquels les analyses du caryotype standard et/ou des microdélétions des régions AZF par PCR n'ont pas permis d'expliquer le phénotype. L'impact des variations de nombre de copies de l'ADN (CNV) détectées par l'hybridation génomique comparative sur puce à ADN est peu documenté. Un design personnalisé de puce à ADN de format 400K, pangénomique et enrichi sur un large panel de 445 gènes liés à l'infertilité et à un DSD a été développé. Cette puce a permis l'identification de 171 CNV d'intérêt. Ces résultats soulignent l'intérêt de ce design comme outil diagnostique dans le cadre

du bilan de l'infertilité masculine.

Le second axe du travail a été de modéliser l'infertilité masculine *in vitro* dans un contexte d'anomalie génétique. Des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS) ont été générées à partir d'érythroblastes de deux patients infertiles porteurs d'un remaniement chromosomique complexe ou d'un caryotype 46,XX-SRY négatif avec mutation du gène de l'AMH. Dans un deuxième temps, la fonctionnalité des lignées de cellules hiPS générées a été testée par différenciation *in vitro* en cellules germinales primordiales (CGP). Elles expriment les marqueurs clés du stade CGP dont SOX17, le déterminant germinale le plus précoce des CGP.

Les perspectives de ce travail seront de poursuivre la différenciation germinale vers des stades plus matures et ainsi de pouvoir étudier le processus méiotique dans un contexte d'anomalie génétique.

**Title :** DNA copy number variations study in a cohort of infertile men and generation of an *in vitro* model for the study of meiosis from infertile patient's iPS cells.

**Keywords :** male infertility, DNA copy number variation, chromosomal anomaly, disorders of sex development, induced pluripotent stem cells and primordial germ cells.

**Abstract :** Infertility represents a major public health problem and concerns 10 to 15% of couples in the general population. A male factor is responsible for the infertility of the couple in about half of all cases. In approximately 30% of them, the etiology remains unexplained.

The first working axis concerned the molecular study of a cohort of infertile patients (non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia and disorder of the sex development or DSD) for whom analyses of standard karyotype and/or microdeletions of AZF regions were not able to explain the phenotype. The impact of copy number variations of DNA (CNVs) detected by comparative genomic hybridization (CGH-array) is poorly documented. A custom design 400K microarray, genome-wide and enriched on a wide panel of 445 genes linked with infertility and DSD has been achieved. This array allowed the identification of 171 CNVs of interest.

These results underline the potential of this design for diagnosis of male infertility.

The second objective of this work was the *in vitro* modelisation of male infertility in a context of genetic abnormality. For that purpose, human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were generated from erythroblasts by means of not integrative Sendai virus, in two patients carrying genetic abnormalities (complex chromosomal rearrangement and 46,XX-SRY negative karyotype associated with AMH gene mutation). Secondly, functionality of hiPSCs generated was tested by germ cells *in vitro* differentiation. Primordial germ cell (PGC) stage was successfully obtained. Cells expressed key PGC markers such as SOX17.

The perspectives of this work will be to continue the germinal differentiation towards more mature stages and so to be able studying the meiotic process in a context of genetic abnormality.