



HAL
open science

Exploration des causes génétiques des infertilités masculines sévères et implémentation d'une stratégie diagnostique par séquençage haut débit

Caroline Cazin

► **To cite this version:**

Caroline Cazin. Exploration des causes génétiques des infertilités masculines sévères et implémentation d'une stratégie diagnostique par séquençage haut débit. Biologie moléculaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALS023 . tel-04200211

HAL Id: tel-04200211

<https://theses.hal.science/tel-04200211v1>

Submitted on 8 Sep 2023

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 /CNRS UMR 5309)

Exploration des causes génétiques des infertilités masculines sévères et implémentation d'une stratégie diagnostique par séquençage haut débit

Investigation of the genetic causes of severe male infertility and implementation of a diagnostic strategy by high-throughput sequencing.

Présentée par :

Caroline CAZIN

Direction de thèse :

Charles COUTTON

Professeur des Univ. - Praticien hosp., Université Grenoble

Alpes **Pierre RAY**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., Université Grenoble

Alpes

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

JEAN-PIERRE SIFFROI

Professeur des Univ. - Praticien hosp., AP-HP - HÔPITAL ARMAND

TROUSSEAU

KENNETH MCELREAVEY

Directeur de recherche, INSTITUT PASTEUR

Thèse soutenue publiquement le **29 juin 2023**, devant le jury composé de :

PIERRE RAY

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Co-directeur de thèse

LAILA EL KHATTABI

Maître de conférences - Praticien hosp., AP-HP - HÔPITAUX UNIV PITIE

Examinatrice

SALPETRIERE

Examinatrice

NATHALIE SERMONDADE

Docteur en sciences, AP-HP - HÔPITAL TENON

Examineur

REINER VEITIA

Professeur des Universités, UNIVERSITE PARIS CITE

Rapporteur

JEAN-PIERRE SIFFROI

Professeur des Univ. - Praticien hosp., AP-HP - HÔPITAL ARMAND TROUSSEAU

Rapporteur

KENNETH MCELREAVEY

Directeur de recherche, INSTITUT PASTEUR

Président

JULIEN FAURE

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Invités :

ZINE EDDINE KHERRAF

Maître de conférences - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

CHARLES COUTTON

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES



Résumé

L'infertilité est définie comme l'incapacité pour un couple à concevoir après 1 an de rapports sexuels non protégés. On estime qu'un couple sur huit serait concerné par des problèmes de fertilité et la plupart aura recours à l'Aide Médicale à la Procréation. Dans plus de 50% des cas un facteur masculin est impliqué soit plus de 30 millions d'hommes à travers le monde ce qui représente un véritable enjeu de santé publique. L'infertilité masculine regroupe de nombreux phénotypes tels que des anomalies de la morphologie et/ou du nombre de spermatozoïdes produits. Ces anomalies sont liées à une multitude de causes allant du mode de vie à la présence d'anomalies génétiques. On estime qu'au moins 4 000 gènes sont impliqués dans la spermatogenèse humaine, mais seuls quelques-uns ont été étudiés de manière approfondie jusqu'à présent. Une compréhension complète de ces facteurs génétiques jouera un rôle important dans le diagnostic, le traitement et le conseil génétique de l'infertilité masculine. Actuellement, la découverte de nouveaux facteurs génétiques dans l'infertilité est un défi majeur dans les domaines de la médecine de la reproduction et de l'andrologie. L'objectif principal de ma thèse est d'identifier de nouveaux gènes responsables d'infertilité masculine afin d'améliorer le rendement des diagnostics génétiques des infertilités masculines sévères. La stratégie utilisée consiste à analyser les résultats du séquençage de l'exome entier (*Whole Exome Sequencing*, WES) de sujets infertiles, afin d'identifier les anomalies génétiques responsables des défauts spermatiques étudiés. La technique CRISPR/Cas9 est utilisée ensuite pour recréer ces variations génétiques sur le modèle murin pour étudier la fonction des gènes identifiés. Ce travail permet de mieux diagnostiquer et prendre en charge ces infertilités sévères. Ainsi, j'ai identifié de nombreuses causes monogéniques de l'infertilité masculine dans plusieurs phénotypes tels que l'azoospermie non obstructive (ANO), le syndrome des spermatozoïdes acéphales (SSA), la macrozoospermie ou le phénotype des anomalies morphologiques multiples des flagelles (AMMF). J'ai également étudié plus en détail l'implication de deux gènes candidats dont le rôle dans la spermatogenèse n'était pas connu grâce à la production de lignées murines invalidées pour ces gènes par la technique de CRISPR/Cas9, modèle utilisé en raison de sa facilité d'utilisation et de ses similitudes génétiques et physiologiques avec l'homme. Pour exemple, mon travail sur l'ANO qui a été réalisé sur une cohorte de 96 patients atteints d'ANO, a permis d'identifier une cause génétique chez 23% des sujets testés. Les variants identifiés concernent 22 gènes impliqués directement dans la spermatogenèse. Pour 6 de ces gènes aucune anomalie génétique n'avait encore été décrite chez l'homme. Pour ces patients, cette analyse a permis de multiplier par deux l'efficacité du diagnostic par rapport aux tests classiques effectués en routine. Ce travail collectif et personnel a donc permis l'identification ou la confirmation de l'implication de plus de 30 gènes candidats (*SUN5*, *C1orf185*, *CCT6B*...) dans l'infertilité masculine, augmentant ainsi l'efficacité du diagnostic génétique et permettant une amélioration de la prise en charge des patients infertiles.

Mots clés : Génétique de l'infertilité masculine, Séquençage de l'exome entier, anomalies sévères de la spermatogenèse

Abstract

Infertility is defined as the inability of a couple to conceive after one year of unprotected sex. It is estimated that one in eight couples is affected by fertility problems and most of them will resort to Medically Assisted Reproduction. In more than 50% of the cases, a male factor is involved, i.e., more than 30 million men throughout the world, which represents a real public health issue. Male infertility includes many phenotypes such as abnormalities in morphology and/or in the number of spermatozoa produced. These abnormalities are related to a multitude of causes ranging from lifestyle to the presence of genetic abnormalities. It is estimated that at least 4,000 genes are involved in human spermatogenesis, but only a few have been studied in depth to date. A complete understanding of these genetic factors will play an important role in the diagnosis, treatment and genetic counseling of male infertility. Currently, the discovery of new genetic factors in infertility is a major challenge in the fields of reproductive medicine and andrology. The main objective of my thesis is to identify new genes responsible for male infertility in order to improve the yield of genetic diagnosis of severe male infertility. The strategy used is to analyze the results of Whole Exome Sequencing (WES) of infertile subjects in order to identify the genetic abnormalities responsible for the sperm defects studied. The CRISPR/Cas9 technique is then used to recreate these genetic variations in the mouse model to study the function of the identified genes. This work allows a better diagnosis and management of these severe infertilities. Thus, I identified numerous monogenic causes of male infertility in several phenotypes such as non-obstructive azoospermia (NOA), acephalic spermatozoa syndrome (ASS), macrozoospermia or multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF) phenotype. I also studied in more detail the involvement of two candidate genes whose role in spermatogenesis was not known thanks to the production of murine lines invalidated for these genes by the CRISPR/Cas9 technique, a model used because of its ease of use and its genetic and physiological similarities with humans. For example, my work on ANO, which was carried out on a cohort of 96 patients with ANO, identified a genetic cause in 23% of the subjects tested. The variants identified concern 22 genes directly involved in spermatogenesis. For 6 of these genes, no genetic anomaly had yet been described in humans. For these patients, this analysis made it possible to double the efficiency of the diagnosis compared to the classic tests performed in routine. This collective and personal work has thus allowed the identification or confirmation of the involvement of more than 30 candidate genes (*SUN5*, *C1orf185*, *CCT6B*...) in male infertility, thus increasing the efficiency of genetic diagnosis and allowing an improvement in the management of infertile patients.

Keywords: Genetics of male infertility, Whole exome sequencing, severe defects of spermatogenesis

Serment d'intégrité

En présence de mes pairs.

Parvenu à l'issue de mon doctorat en « BIS : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement », et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats.

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier l'ensemble des membres de ce jury : Pr. **Julien Faure**, Pr. **Jean Pierre Siffroi**, Pr. **Kenneth McElreavey**, Pr. **Reiner Veitia**, Dr. **Nathalie Sermondade** et Dr. **Laila El Khattabi**. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et merci pour le temps accordé à la lecture du manuscrit et à son évaluation.

Merci au Professeur **Pierre Ray**, tout d'abord pour m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse dans une équipe si prestigieuse. Mais également merci de m'avoir fait confiance dans de nombreux projets, d'avoir toujours été bienveillant et à l'écoute. J'ai énormément appris au cours de cette thèse à vos côtés et je vous en suis reconnaissante.

Merci au Professeur **Charles Coutton**, pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton accessibilité. J'espère pouvoir continuer à travailler à tes côtés à l'avenir.

Merci au Docteur **Zine-Eddine Kherraf**, merci pour ton encadrement pendant cette thèse, pour tes conseils et ton expertise qui m'ont été d'une grande aide. Ça n'a pas toujours été facile mais j'en sors grandie, j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Merci Dr. **Laure Raymond** et au Dr. **Marc Nouchy** pour m'avoir encadrée et soutenue durant cette thèse malgré le fait que certains projets n'aient pas abouti. Votre contribution à ma formation de chercheuse est inestimable et je vous en suis reconnaissante.

Merci aux membres de mon comité de suivi annuel, Pr. **Julien Faure** et Dr. **Ingrid Plotton**. Merci d'avoir suivi avec attention cette thèse ces quatre dernières années. Vous avez suivi mon parcours et mon évolution et vous m'avez beaucoup apporté, que ce soit par vos questions ou par vos remarques constructives. Vous m'avez permis de m'améliorer et d'avoir une ligne directrice, j'ai beaucoup apprécié ces moments d'échanges avec vous.

Je remercie tout le personnel Eurofins-Biomnis chez qui j'ai eu la chance de pouvoir effectuer cette thèse. Merci à **Laurence Pellegrina**, **Benjamin Bayart**, merci **Barbara Adde**, **Sandrine Mouty**, merci **Vanna Geromel** et **Radoslava Saraeva** pour votre bonne humeur et vos conseils, merci **Pascal Mouty** et **Mohamed Taoudi** pour votre expertise et votre aide dans mes projets, merci **Jean-François Taly** pour ta patience, tes conseils et ton aide et merci à toute l'équipe bio-info (**Nicolas**, **Vincent**, **Fanny**, **Boris**) sans qui les projets ne pourraient pas exister. Je tiens à vous remercier pour votre accueil chaleureux pendant ma thèse bien que nous n'ayons pas eu l'occasion de nous rencontrer très souvent. Je suis fière de pouvoir dire que j'ai travaillé au sein de votre équipe et je suis convaincue que les compétences que j'ai acquises grâce à vous me seront très utiles dans mon avenir professionnel.

Je remercie toute l'équipe GETI qui m'a beaucoup apporté humainement et scientifiquement. Merci à **Christophe Arnoult** pour tes conseils, tes remarques pertinentes qui m'ont permis de chercher toujours plus loin et de pousser ma curiosité et mon esprit scientifique. Merci à **Corinne Loeuillet**, **Jessica Escoffier** et **Magali Court** pour l'aide que vous avez pu m'apporter au cours de cette thèse, merci pour votre partage d'expérience et votre aide. Merci **Geneviève Chevalier** et **Lisa de Macedo**, je vous en ai demandé beaucoup mais votre aide a été très précieuse. Merci **Emeline Lambert**, merci pour ton soutien dans tous les moments de cette thèse, ta bonne humeur, ton écoute et tes conseils précieux qui m'ont énormément aidé, merci pour les soirées karaoké et toutes tes petites attentions qui font la différence. Merci également à **Marie Bidart**, **Véronique Satre** et **Sylviane Hennebicq**. Merci à tous les membres de cette équipe sans qui je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui.

Merci à **Nicolas Thierry Mieg** et **Amandine Septier**, l'équipe bio-info. Sans vous les projets n'existeraient pas. J'ai toujours du mal à tout comprendre, j'ai parfois l'impression que vous parlez une toute autre langue, mais travailler avec vous était très enrichissant.

Merci à tous nos collaborateurs, je ne peux pas tous vous remercier ici, mais la recherche c'est un travail d'équipe, un travail d'entraide, sans vous et votre contribution les projets n'auraient pas pu aboutir.

Merci à tous les doctorant.e.s, post-doctorant.e.s, stagiaires passés et présents qui font vivre cette équipe : **Marie Christou Kent, Emilie Le Blévec, Pauline Moison, Chanyuth Thamwan, Edgar Del Llano, Zeina Wehbe...**

Un merci tout particulier à **Magali, Jana, Elsa** et **Charline**, à la fois des collègues sur qui on peut compter et qui permettent de sortir de certaines galères avec un regard neuf et grâce à qui j'ai pu prendre du recul sur certains projets. Mais également des amies avec qui j'ai passé de très bons moments et chez qui j'ai pu trouver du réconfort quand c'était nécessaire.

Merci **Julie**, qui l'eut cru qu'on se serait retrouvées en thèse, au même moment, au même endroit ? Merci pour ta bonne humeur permanente. Tu as toujours le mot pour rire et on peut toujours compter sur toi pour passer un bon moment ! Merci d'avoir toujours été prête à aider, tu as une générosité qui te perdra et un cœur gros comme ça.

Merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer. **Tristan**, j'ai toujours beaucoup de fierté à dire « Tristan c'était mon stagiaire » tant cela paraît impensable au vu de là où tu es aujourd'hui ! Je suis fière d'avoir pu, un peu, contribuer à ton parcours. J'ai l'impression d'avoir plus appris à tes côtés et je suis très heureuse de t'avoir rencontré. J'ai hâte de passer te faire coucou à la Réunion ! **Aurélien**, le sancho, tu es quelqu'un de brillant, toujours volontaire, tu vas aller loin et j'ai hâte de voir ça ! Tes petits moments de folie dans le labo m'ont souvent manqué ! **Alicia**, j'adorais travailler avec toi, ça me rappelait pourquoi j'aimais faire ça, parfois on est désabusé des choses que l'on fait quotidiennement et on oublie que ce qu'on fait est pourtant incroyable et tu m'as rappelé ça, rien que lorsque tu t'émerveillais quand on faisait des PCR, alors merci ! **Coralie**, avec ton calme tu as pu contrebalancer mon stress et c'était un défi pas toujours simple. Je te souhaite plein de bonnes choses dans ton avenir que ce soit dans ta vie professionnelle ou perso !

Merci également à **Aminata Touré** et son équipe, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton accessibilité. J'ai toujours été très impressionnée par ton attitude positive et ta détermination dans la recherche. Tes qualités humaines et ta réussite professionnelle font de toi un modèle et sont une source d'inspiration. Merci **Marjorie Whitfield**, dans la même veine qu'Aminata, tu es un vrai modèle de réussite. Tu es un exemple à suivre, tu es brillante et tu ne te laisses pas marcher sur les pieds, j'ai beaucoup aimé apprendre à te connaître et travailler avec toi. Merci **Emma**, pour ta douceur et tes petites attentions, tu as mis la barre très haute avec cette magnifique thèse que tu as passée. J'espère être à la hauteur. Je suis heureuse de t'avoir rencontrée.

Merci à toute l'équipe DPI, **Flore, Caroline, Isabelle, Valérie** et **Delphine**. Merci pour votre gentillesse, avec vous on a l'impression de faire partie d'une famille. Mention spéciale à Isa toujours prête à aider et toujours aux petits soins.

Merci à l'association Elipsce et au PhD Committee. Merci à l'ED, particulièrement à **Orélie Garzena** et **Chris Moulin**.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités, je ne vous oublie pas.

Merci **Florence**, pour nos échanges quotidiens. Ça n'a pas été facile de te voir partir (à l'autre bout du couloir) tu m'as beaucoup manqué dans le bureau ! Merci pour ton énergie débordante, pour ton sourire, tu m'as été d'un grand soutien !

Merci à la team échec, merci **Justine, Flora, Alexis** et **Hono** avec qui cette aventure BDR (bout du rouleau ou biologie de la repro à vous de voir) a commencé.

Merci mes boudins **Cannelle** et **Emilie**, je suis heureuse de vous compter parmi mes amies depuis tant d'années, malgré la distance vous avez toujours été là. Je sais que je peux compter sur vous et que rien ne changera et ça n'a pas de prix.

Merci **Jil**, il s'en est écoulé du temps et passé des choses depuis mon arrivée en stage de master. Tu as été mon mentor, mon encadrante avec qui j'ai beaucoup appris puis très vite une amie. Merci de m'avoir fait et de me faire toujours autant rire.

Merci **Tatie**, plus qu'une belle sœur tu es devenue une véritable amie, j'admire beaucoup la personne que tu es et j'ai très hâte de voir les choses que tu vas accomplir !

Merci **Guillaume**, je ne saurais pas par où commencer pour te remercier, tu m'as tellement apporté au cours de ces (presque) 5 ans. Je suis toujours admirative de tes connaissances, de tes projets tous plus fous et incroyables les uns que les autres. Merci pour tout, tu m'as permis de toujours vouloir aller plus loin, nos discussions m'ont toujours beaucoup aidé et permis de voir les choses autrement.

Merci **Mag**, mon p'tit binôme, ma co-créatrice de notre start-up de rêve. Tu sais à quel point je suis heureuse de t'avoir rencontrée ce premier jour de master alors que tu avais tes écouteurs ! Je n'en serais pas là aujourd'hui sans toi.

Merci à ma famille, merci **Papa** et **Maman**, votre soutien et la fierté dont vous faites preuve à mon égard mais aussi le modèle que vous m'avez donné m'ont donné le courage et la force d'aller toujours plus loin et d'en être là aujourd'hui.

Merci à **mon frère**, à notre connexion, à notre soutien mutuel dans les galères, au fait d'être toujours là quoi qu'il arrive. Je suis fière d'être ta sœur.

Kitone, tu es ce qui m'est arrivé de plus beau dans cette nouvelle vie. Merci d'avoir été à mes côtés dans toutes les épreuves, les plus difficiles mais surtout les plus belles. Merci d'avoir partagé tous mes fous rires et de m'avoir soutenu quand ça n'allait pas. Merci de partager ma vie.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Serment d'intégrité	5
Remerciements	6
Liste des figures.....	12
Liste des tables	14
Liste des abréviations	15
Avant-propos.....	16
Partie 1 : Etude Bibliographique.....	17
Chapitre I. Aspects physiologiques de la fertilité masculine.....	19
I. Rappels : L'appareil de reproduction masculin	19
1. Le rôle des glandes annexes	19
a. Les vésicules séminales	19
b. La prostate.....	20
c. Les glandes bulbo-urétrales	20
2. L'anatomie du testicule	20
3. L'organogenèse et la différenciation testiculaire.....	22
4. L'histologie du parenchyme testiculaire	24
a. Le compartiment interstitiel.....	24
b. Le compartiment séminifère	25
II. La spermatogenèse	27
1. La spermatocytogenèse : production de cellules méiotiques, les spermatocytes.....	29
2. La méiose : production de cellules haploïdes	29
3. La spermiogénèse : différenciation des spermatides.....	32
a. La biogenèse de l'acrosome	33
b. L'hypercompaction de la chromatine.....	33
c. La formation du flagelle.....	34
4. La spermiation	35
5. La structure et l'ultrastructure du spermatozoïde.....	36
a. La tête spermatique	37
b. L'appareil de jonction tête-flagelle	37
c. Le flagelle.....	38
III. La régulation de la spermatogenèse	42

1.	La régulation hormonale	42
2.	La régulation thermique	44
a.	Le scrotum	44
b.	Le plexus pampiniforme	45
IV.	La maturation épидидymaire du spermatozoïde	46
Chapitre II. L'infertilité masculine		48
I.	Définitions et données épidémiologiques.....	48
II.	Les causes de l'infertilité masculine	51
III.	L'exploration clinique et paraclinique de l'infertilité masculine	54
1.	L'examen clinique.....	54
2.	Le spermogramme.....	54
3.	Le spermocytogramme.....	55
IV.	L'exploration génétique de l'infertilité masculine	56
1.	L'hétérogénéité de la composante génétique de l'infertilité masculine	58
2.	L'exploration génétique des anomalies de la numération spermatique	58
a.	L'azoospermie non obstructive (ANO)	59
b.	L'azoospermie obstructive (AO)	78
3.	L'exploration génétique des anomalies morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes	81
a.	La globozoospermie	82
b.	Le syndrome des spermatozoïdes acéphales	88
c.	La macrozoospermie	95
d.	L'asthénozoospermie	100
e.	Les anomalies morphologiques multiples des flagelles spermatiques (AMMF)	102
f.	Les échecs de fécondation	108
Objectifs de la thèse		111
Partie 2 : Etude Expérimentale.....		113
Chapitre I. Les patients et méthodes principales.....		114
I.	Le recrutement des patients	114
II.	Le séquençage Sanger	115
III.	Le séquençage à haut débit (HTS)	115
IV.	Le pipeline bioinformatique développé pour l'analyse de nos patients	118
V.	Le système CRISPR/Cas9 pour la validation fonctionnelle des gènes et variants dans le modèle murin	119
Chapitre II. L'azoospermie non-obstructive.....		123
I.	Article 1	123

II. Article 2	162
Chapitre III. Les térazoospermies monomorphes.....	186
I. Article 3	186
II. Autres articles.....	206
Partie 3 : Discussion Générale	212
Problématique de l'identification de nouveaux gènes candidats	213
Difficulté de l'interprétation clinique des nouveaux variants génétiques	214
<i>Quid</i> des données incidentes ?.....	216
Validation fonctionnelle des nouveaux variants et gènes candidats	216
L'utilisation des modèles murins.....	217
Le système CRISPR/Cas9.....	218
Perspectives : optimisation du rendement du diagnostic génétique	220
Le séquençage du génome entier	220
L'oligogénisme.....	221
Vers une approche thérapeutique ciblée dans les infertilités masculines ?.....	222
I. La thérapie par correction génique <i>via</i> le système CRISPR/Cas9.....	222
II. La thérapie de substitution	223
III. Utilisation des cellules souches pluripotentes induites (iPS)	224
Conclusion	224
Annexes	226
Annexe 1 : Tables supplémentaires	227
Annexe 2 : Liste des publications non incluses dans la thèse	242
Annexe 3 : Formulaire de consentement utilisé au CHU de Grenoble	266
Annexe 4 : Communications.....	268
Références.....	270

Liste des figures

Figure 1. Anatomie de l'appareil reproducteur masculin (Copyright © 2023 Nagwa)	19
Figure 2. Anatomie du testicule (Copyright © 2010 Pearson Education, Inc)	21
Figure 3. Colonisation des crêtes génitales par les cellules germinales. Représentation de la migration des cellules germinales primordiales passant par l'allantoïde pour aller coloniser les crêtes génitales. Auteur(s)/Autrice(s): Amélie Sabouret, Gilles Furelaud, Nabila Devos, M Delarue.	22
Figure 4. Différenciation en testicule de la 8ème semaine à la 20ème semaine de développement (www.carabinsnicois.fr)	23
Figure 5. Schéma représentatif du tissu interstitiel (« La reproduction animale et humaine » © Éditions Quæ, 2014)	25
Figure 6. Schéma d'une cellule de Sertoli (Junqueira LC., Carneiro J., 2007)	26
Figure 7. Les étapes de la spermatogenèse (Cazin, GETI, 2023, créée sur Biorender.com).	27
Figure 8. Les stades de l'épithélium séminifère chez l'homme (Ap, spermatogonie A-pale ; Ad, spermatogonie A-dark ; B, spermatogonie B, pL, spermatocytes au stade préleptotène ; L, leptotène ; Z, zygotène ; eP, « early » pachytène ; mP, « mid »-pachytène ; lp, « late » pachytène ; D, diplotène ; SS, spermatocyte secondaire ; 1-12 premières étapes de chaque stade de développement des spermatozoïdes.) D'après (Muciaccia et al., 2013)	28
Figure 9. Représentation schématique des étapes de la prophase de méiose I (créée sur Biorender.com).....	32
Figure 10. La spermiogénèse. (Schatten and Stearns, 2015)	33
Figure 11. Remplacement des histones par les protamines dans le spermatozoïde humain. D'après (Marchiani et al., 2020)	34
Figure 12. Représentation schématique de la spermiation (D'après (Vogl et al., 2013)).....	36
Figure 13. Représentation d'un spermatozoïde humain mature et ses différentes parties. D'après (Rahman et al., 2013)	37
Figure 14. Structure de l'appareil de jonction tête-flagelle du spermatozoïde humain. Adapté de (Cazin et al., 2021a).....	38
Figure 15. Structure et ultrastructure du spermatozoïde humain (Kherraf, 2018).	39
Figure 16. L'axonème, unité fondamentale du flagelle. (Kherraf, 2018).	40
Figure 17. Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (source : https://matheleve.tn/) ...	43
Figure 18. Anatomie de l'appareil reproducteur masculin et structures médiant la régulation thermique (source: www.austincc.edu).....	45
Figure 19. Vascularisation et innervation du testicule (Bailleul and Mauroy, 1991)	46
Figure 20. Anatomie de l'épididyme (Hermo and Robaire, 2002)	47

Figure 21. Âge moyen de la mère à l'accouchement (en France). Données annuelles de 1994 à 2021. En 2021, l'âge moyen de la mère à l'accouchement atteint 30,9 ans. Source : Insee, estimations de population et statistiques de l'état civil.	49
Figure 22. Augmentation du taux d'aneuploïdie dans les ovocytes humains avec l'âge maternel. Les taux d'erreurs de ségrégation sont plus élevés dans les ovocytes des femmes âgées de moins de 20 ans et de plus de 33 ans que dans ceux des femmes âgées de 20 à 32 ans. Tiré de la revue (Charalambous et al., 2023).....	49
Figure 23. Évolution de la proportion d'enfants conçus par assistance médicale à la procréation en France. Source : Élise de La Rochebrochard, Population & Sociétés n° 556, INED, juin 2018.	50
Figure 24. Déclin du nombre total des spermatozoïdes dans l'éjaculat d'hommes non sélectionnés de tous les continents, pour l'ensemble de la période de 1973 à 2019 et restreint aux études postérieures à 2000 (Levine et al., 2022).	51
Figure 25. L'étiologie multifactorielle de l'infertilité masculine. D'après (Assidi, 2022).....	52
Figure 26. Classement des différentes anomalies spermatiques (World Health Organization, 2021). 56	
Figure 27. TESE (Testicular Sperm Extraction) (Source: kinderwunschzentrum-offenbach.de).....	57
Figure 28. Représentation graphique des protéines enrichies dans les tissus humains. Le testicule présente un nombre important de gènes surexprimés ou spécifiques. D'après (Uhlén et al., 2015)..	58
Figure 29. Arbre décisionnel pour conduire l'exploration génétique des azoospermies obstructives et non-obstructives. (Kherraf, Ray, JBM, 2023).....	59
Figure 30. Groupes d'histologie testiculaires liés à l'ANO. Adapté de (Kherraf et al., 2022a)	61
Figure 31. Différents types de micro délétions AZF (Krausz and Riera-Escamilla, 2018).....	64
Figure 32. Classes de mutation du gène CFTR et leurs conséquences moléculaires. (Férec, 2021).....	79
Figure 33. Arbre décisionnel pour conduire l'exploration génétique des tératozoospermies monomorphes. (Kherraf, Ray, JBM, 2023)	82
Figure 34. Gènes causaux des MMAF. Classification et description des gènes pathogènes des MMAF par structure et mécanisme d'affectation des protéines. Les gènes marqués en rouge sont impliqués dans les DCP, en vert dans les troubles neurologiques, en bleu dans la tumorigenèse, en jaune dans des conditions génétiques rares. Tiré de la publication (J. Wang et al., 2022b).....	104
Figure 35. Principales étapes du NGS.....	116
Figure 36. Le séquençage exomique (Kherraf, GETI, 2023)	117
Figure 37. Le tri des variants après séquençage exomique	119
Figure 38. Etapes d'édition du génome par le système CRISPR-Cas9, génération de KO (Knock-Out) et de KI (Knock-In). (Kherraf et al., 2018b)	121
Figure 39. Création d'une lignée murine KO par la technique CRISPR/Cas9 (Cazin, GETI, 2023)	122
Figure 40. Les différentes voies d'édition du génome dans le cadre du traitement de l'infertilité masculine. (SSC: spermatogonial stem cells.) D'après (Carrell et al., 2020)	223

Liste des tables

Table 1. Normes OMS 2021, (World Health Organization, 2021).....	55
Table 2. Gènes causaux de l'azoospermie identifiés chez l'homme (Cazin, GETI, 2023).....	77
Table 3. Gènes causaux de la globozoospermie identifiés chez l'homme. (Cazin, GETI, 2023).....	87
Table 4. Liste de mutations identifiées dans les gènes impliqués dans le syndrome des spermatozoïdes acéphales. Adapté de (Beurois et al., 2020).....	95
Table 5. Gènes impliqués dans le phénotype de macrozoospermie (Cazin, GETI, 2023)	100
Table 6. Liste des gènes identifiés liés à l'asthénozoospermie chez l'homme. (Cazin, GETI, 2023) ...	102
Table 7. Liste des gènes et variants impliqués dans le phénotype MMAF (Cazin, GETI, 2023)	107
Table 8. Gènes impliqués dans le phénotype d'échec de fécondation chez l'homme (Cazin, GETI, 2023)	110
Table supplémentaire 1. Les critères de classification des variants par l'ACMG (Richards et al., 2015)	227
Table supplémentaire 2. Variants du gène DPY19L2 chez les patients globozoospermes	229
Table supplémentaire 3. Gènes et variants causaux du phénotype MMAF chez l'homme et résultats d'ICSI	231

Liste des abréviations

AAV	: Adeno Associated Virus	iPSC	: induced Pluripotent Stem Cells
ABCD	: Absence Bilatérale des Canaux Déférents	KI	: Knock in
ABP	: Androgen Binding Protein	KO	: Knock out
ADGRG2	: Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2	LH	: Luteinizing Hormone
ACGS	: Association for Clinical Genomic Science	MMAF	: Multiple Morphological Anomalies of the Flagella
ACPA	: Analyse Chromosomique sur Puce à ADN	N-DRC	: Nexin Dynein Regulatory Complex
AMP	: Assistance Médicale à la Procréation	NGS	: Next Generation Sequencing
AMMF	: Anomalies Multiples Morphologiques des Flagelles	NHEJ	: Non Homologous End Joining
ANO	: Azoospermie Non obstructive	NOA	: Non-Obstructive Azoospermia
AO	: Azoospermie Obstructive	OATS	: Oligo-Asthéno-Tératozoospermie
ASS	: Acephalic Spermatozoa Syndrome	ODA	: Outer Dynein Arm
AZF	: Azoospermia Factor	ODFs	: Outer Dense Fibers
BHT	: Barrière Héмато-Testiculaire	OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
Cas9	: CRISPR-associated protein 9	OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
CDB	: Cassures Doubles Brins de l'ADN	ONT	: Oxford Nanopore Technologies
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator	PAM	: Protospacer Adjacent Motif
CGH	: Comparative Genomic Hybridization	PCD	: Primary Ciliary Disease
CNV	: Copy Number Variation	PCR	: Polymerase Chain Reaction
CPC	: Chromosomal Passenger Complex	PIWI	: P-element-induced wimpy testis
CRISPR	: Clustered regularly interspersed short palindromic repeats	PLC ζ	: Phospholipase C zêta
CSC	: Calmoduline and Radial Spoke associated complex	RCPG	: Récepteur couplé aux protéines G
DCP	: Dyskinésie Ciliaire Primitive	SCOS	: Sertoli Cell-Only Syndrome
DPI	: Dépistage PréImplantatoire	SMRT	: Single-Molecule Real-Time
DSB	: Double Strand Break	SRY	: sex-determining region of Y chromosome
(d)dNTP	: (di)désoxyribonucléotides	SSA	: Syndrome des Spermatozoïdes Acéphales
ESC	: Embryonic Stem Cells	TALEN	: Transcriptional activator-like effector nucleases »
ESHG	: European Society of Human Genetics	TGS	: Third Generation Sequencing
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization	UTR	: Untranslated Regions
FIV	: Fécondation In Vitro	VUS	: Variant of Unknown Significance
FSH	: Follicle Stimulating Hormone	WES	: Whole Exome Sequencing
GnRH	: Gonadotropin-Releasing Hormone	WGS	: Whole Genome Sequencing
hCG	: Hormone Chorionique Gonadotrophique	ZFN	: Zinc Finger Nuclease
HDR	: Homology Directed Repair		
HTCA	: Head to Tail Coupling Apparatus		
HTS	: High Throughput Sequencing		
ICSI	: Intra Cytoplasmic Sperm Injection		
IDA	: Inner Dynein Arm		
IIU	: Insémination Intra Utérine		
IMSI	: Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection		

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée à Grenoble au sein de l'équipe GETI (Génétique, Epigénétique et Thérapies de l'Infertilité, INSERM 1209, CNRS UMR 5309) en collaboration avec le CHU Grenoble Alpes. De plus, cette thèse a pu être réalisée grâce au dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) en collaboration avec le laboratoire Eurofins-Biomnis. Cette thèse s'est déroulée sous la direction des Professeurs Pierre Ray (PU-PH) et Charles Coutton (PU-PH) et sous la supervision du Docteur Zine-Eddine Kherraf (MCU-PH).

Les principaux objectifs de cette thèse consistent à améliorer nos connaissances sur l'étiologie génétique des infertilités masculines sévères d'origine testiculaire et d'implémenter une nouvelle stratégie diagnostique par séquençage à haut débit. Ce manuscrit est réparti en trois grandes parties :

La première partie est une étude bibliographique divisée en deux chapitres. Le premier chapitre présente les principaux aspects physiologiques et biologiques de la fertilité masculine afin de mieux appréhender le second chapitre qui traite de l'infertilité masculine. Ce second chapitre présente en particulier les causes génétiques des anomalies de la numération spermatique et des anomalies morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes.

La seconde partie présente les études expérimentales réalisées et publiées au cours de cette thèse. Cette partie est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre présente le recrutement des patients et les principales méthodes utilisées, particulièrement le pipeline bioinformatique utilisé pour le tri des variants. Le second chapitre présente deux articles associés à « l'azoospermie non-obstructive ». Quant au troisième chapitre, il présente un article associé à un phénotype particulier de tératozoospermie monomorphe, le syndrome des spermatozoïdes acéphales. Les autres travaux publiés auxquels j'ai participé concernant d'autres phénotypes de tératozoospermie monomorphe sont présentés succinctement en deuxième partie de ce chapitre ainsi qu'en annexe.

La troisième et dernière partie présente une discussion générale traitant des problématiques de l'identification de nouveaux gènes candidats et de l'interprétation des variants dans ces gènes et de leur validation fonctionnelle lorsque leur impact n'est pas connu. Enfin, elle ouvrira sur des perspectives concernant l'optimisation du rendement du diagnostic génétique et le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans le cadre de l'infertilité masculine.

Partie 1 : Etude Bibliographique

Chapitre I. Aspects physiologiques de la fertilité masculine

I. Rappels : L'appareil de reproduction masculin

L'appareil de reproduction masculin est composé du pénis et de deux testicules logés dans le scrotum (qui constituent les organes génitaux externes), des épидидymes, des canaux déférents et de glandes annexes : prostate, vésicules séminales et glandes de Cowper ou bulbo-urétrales (**Figure 1**). Il assure la production de spermatozoïdes, leur stockage, leur transport et leur expulsion ainsi que la production de stéroïdes sexuels tels que la testostérone et la dihydrotestostérone.

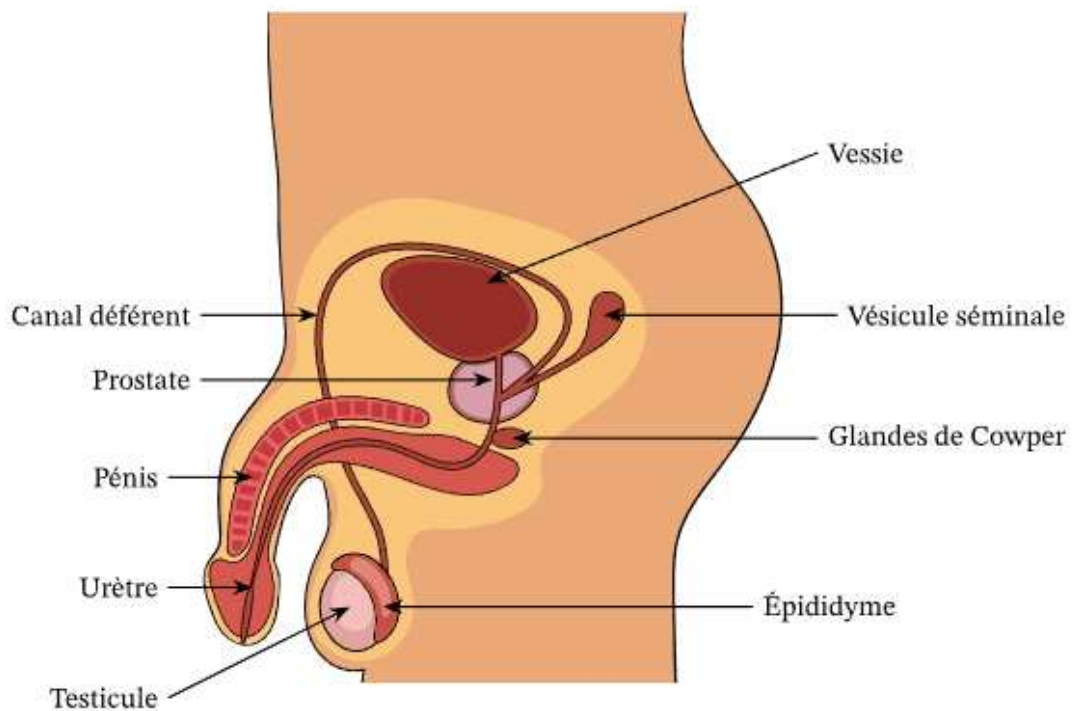


Figure 1. Anatomie de l'appareil reproducteur masculin (Copyright © 2023 Nagwa)

1. Le rôle des glandes annexes

a. Les vésicules séminales

Les vésicules séminales, au nombre de deux, sont des glandes qui interviennent dans la production de liquide séminal, composant majoritaire du sperme. Les deux vésicules séminales sont reliées aux canaux déférents, qui transportent le sperme de l'épидидyme vers l'urètre. Le liquide séminal de $\text{pH} \geq 7,2$ (World Health Organization, 2021), contient des

nutriments et des substances nécessaires aux spermatozoïdes pour survivre et se déplacer, notamment du fructose, des prostaglandines et des enzymes. Le liquide séminal produit par les vésicules séminales constitue environ 60% du volume total du sperme éjaculé. Les vésicules séminales sont stimulées par les hormones sexuelles masculines, en particulier la testostérone, et par les signaux nerveux. Les contractions musculaires de la prostate et des vésicules séminales lors de l'éjaculation permettent au sperme de se mélanger avec le liquide séminal et d'être expulsé vers l'urètre.

b. La prostate

La prostate est une glande unique située à la base de la vessie et entourant l'urètre. Elle contribue à la production du liquide séminal en produisant des sécrétions d'un pH légèrement acide, contenant de l'acide citrique, des phosphatases et du zinc. Le liquide produit par la prostate représente 20% du volume éjaculé. L'activité sécrétoire de la prostate est sous le contrôle de la testostérone.

c. Les glandes bulbo-urétrales

Les glandes bulbo-urétrales, ou glandes de Cowper, au nombre de deux, sont situées sous la prostate. Elles se composent d'un canal excréteur rejoignant l'urètre et participent à la production du liquide séminal. Elles produisent un liquide alcalin libéré dans l'urètre avant éjaculation où il se mélange au sperme et aux sécrétions des autres glandes annexes. La fonction de ces glandes est de lubrifier l'urètre et de neutraliser l'acidité résiduelle de l'urine présente dans l'urètre afin de protéger les spermatozoïdes des dommages causés par l'acidité.

2. L'anatomie du testicule

Le testicule a deux fonctions, une fonction excrétoire ou exocrine : la spermatogenèse qui permet la production des spermatozoïdes, les gamètes mâles et une fonction sécrétoire ou endocrine qui consiste à la production d'androgènes comme la testostérone.

Le testicule est localisé à l'extérieur de l'abdomen, dans le scrotum, il fait 4 à 5 cm de long, 3 cm de large et a un volume de 25 ml en moyenne. Sa physiologie impose une température inférieure de 2 à 4°C à la température centrale de l'organisme possible grâce à son positionnement à l'extérieur du corps. Chaque testicule est irrigué par une artère testiculaire

qui s'enroule sur elle-même, accompagnée par le canal déférent et le réseau veineux testiculaire ou plexus pampiniforme qui contribuent à la thermorégulation du testicule (**Figure 2**).

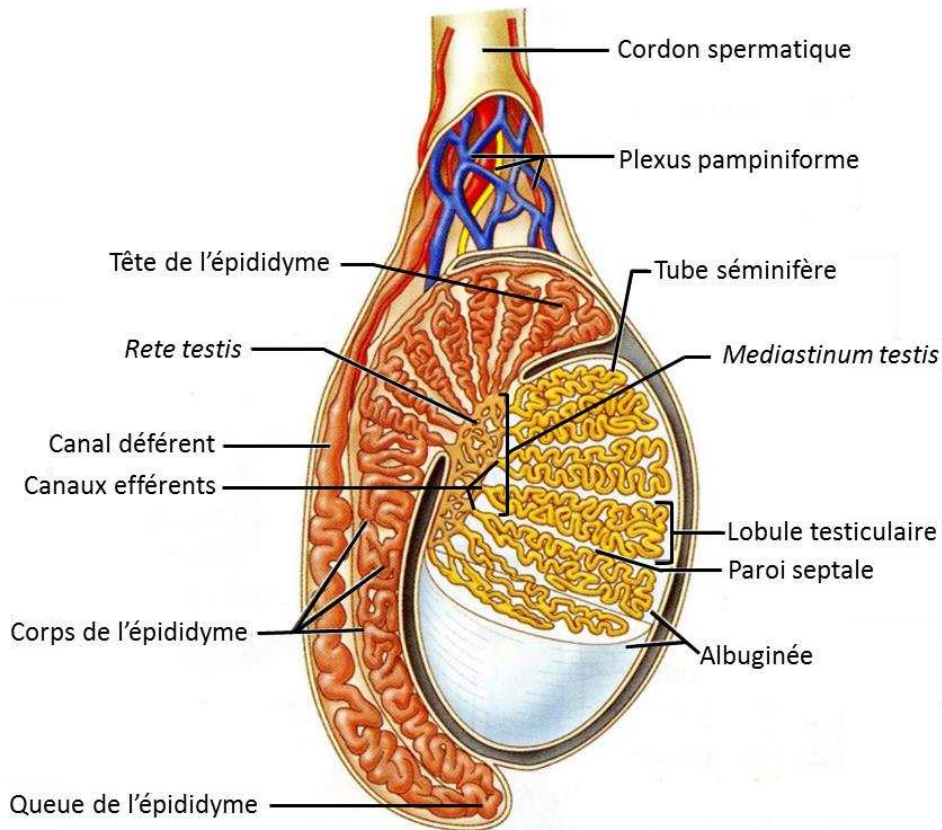


Figure 2. Anatomie du testicule (Copyright © 2010 Pearson Education, Inc)

Le testicule est limité par une capsule conjonctive appelée albuginée ou *tunica albuginea* qui s'épaissit au niveau du pôle supérieur pour former le « corps de *Highmore* » ou *mediastinum testis* qui contient le *rete testis*, qui collecte les spermatozoïdes vers l'épididyme. Le testicule est divisé en 200 à 300 lobules testiculaires par des cloisons interlobulaires conjonctives qui partent du corps de *Highmore* jusqu'à l'albuginée. Chaque lobule testiculaire contient 1 à 4 tubes séminifères où se produit la spermatogenèse (**Figure 2**). Les tubes séminifères sont entourés d'un tissu interstitiel contenant les cellules de Leydig à fonction endocrine ainsi que les capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques.

3. L'organogenèse et la différenciation testiculaire

La différenciation sexuelle est un processus long et complexe qui commence pendant la vie intra-utérine et s'achève après la puberté. Au début de la gestation, seul le caryotype des embryons (46,XX ou 46,XY) permet leur différenciation. Jusqu'à la septième semaine de développement les gonades vont rester bipotentielles. La différenciation des gonades bipotentielles en ovaires ou en testicules va ensuite être contrôlée par un grand nombre de gènes (Bashamboo et al., 2017).

Trois acteurs vont participer à la constitution de la gonade indifférenciée : les cellules germinales primordiales, les crêtes génitales et le mésonéphros (structure rénale transitoire). Les cellules germinales vont migrer en direction dorsale pour aller se loger sous l'épithélium coelomique au niveau du mésonéphros, plus précisément au niveau de la crête génitale (**Figure 3**). Ce mésonéphros est bordé par le canal de Wolff dans lequel se terminent les tubules mésonéphrotiques.

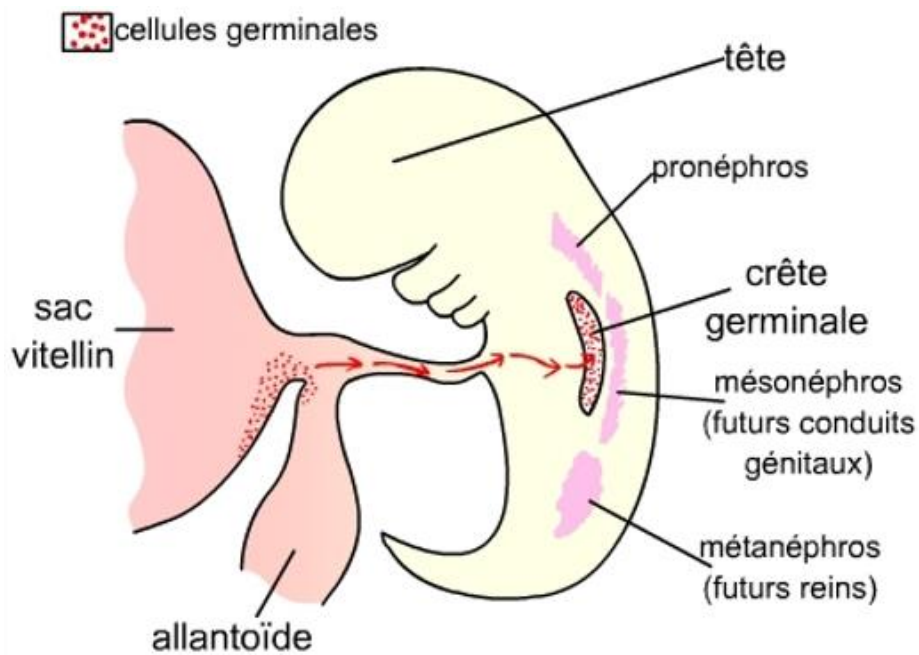


Figure 3. Colonisation des crêtes génitales par les cellules germinales. Représentation de la migration des cellules germinales primordiales passant par l'allantoïde pour aller coloniser les crêtes génitales.

Auteur(s)/Autrice(s): Amélie Sabouret, Gilles Furelaud, Nabila Devos, M Delarue.

La différenciation en testicule est sous déterminisme génétique. En effet, l'expression du gène *SRY* (« sex-determining region of Y chromosome ») porté par le chromosome Y (Hanley et al., 2000) active un certain nombre de gènes impliqués dans la différenciation testiculaire, tel que

SOX9 (Kashimada and Koopman, 2010). *SOX9* est particulièrement important pour la différenciation des cellules de Sertoli, qui soutiennent les cellules germinales et produisent des facteurs de croissance essentiels pour leur développement (da Silva et al., 1996, p. 9). Les cellules de Sertoli se disposent pour former un cordon avec des parois régulières qui établissent entre elles des complexes de jonction et synthétisent une membrane basale. Ces cordons (futurs tubes séminifères) dépourvus de lumière sont les structures dans lesquelles seront englobées les cellules germinales qui prendront le nom de spermatogonies (**Figure 4**).

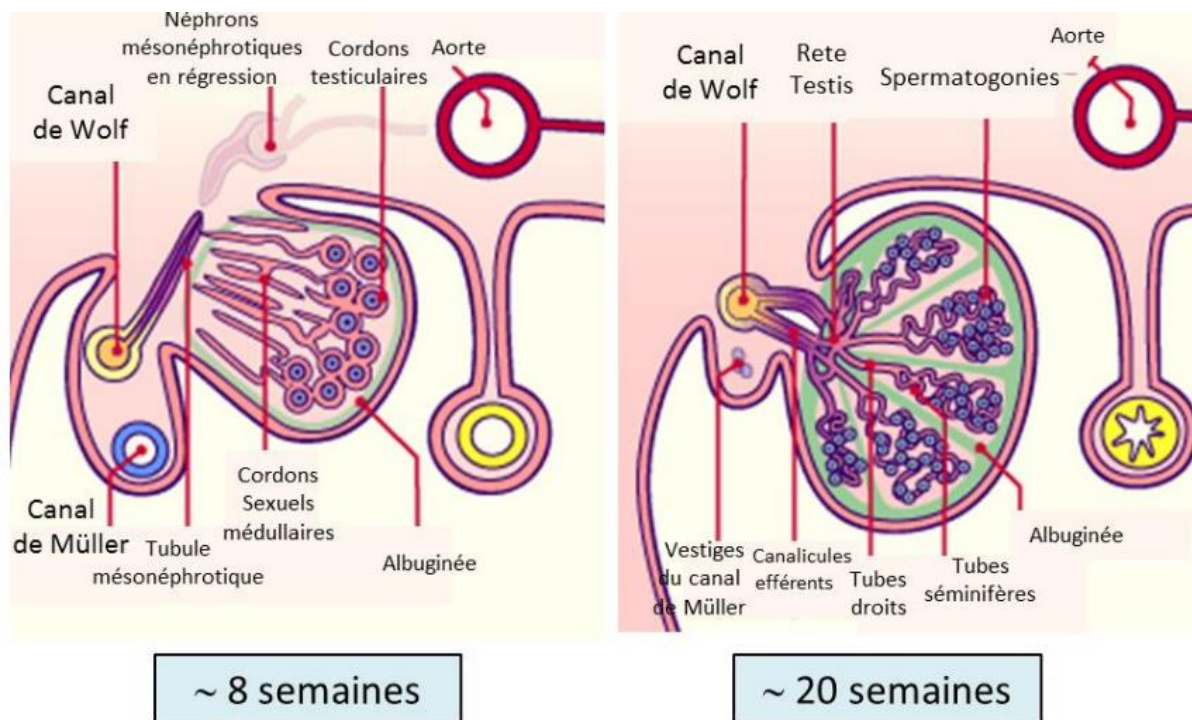


Figure 4. Différenciation en testicule de la 8ème semaine à la 20ème semaine de développement (www.carabinsnicois.fr)

Des cellules somatiques mésonéphrotiques vont participer à la constitution de la paroi de ces cordons séminifères et vont se différencier en cellules myoïdes périlitubulaires. Au troisième mois de développement, le *rete testis* qui fait suite aux cordons séminifères se connecte aux canaux efférents d'origine mésonéphrotiques (mis en place à la neuvième semaine). Il y a ensuite une perte de contact entre l'épithélium cœlomique et les cordons séminifères et du tissu conjonctif va former une enveloppe conjonctive fibreuse résistante appelée albuginée. Des cloisons conjonctives vont structurer ce tissu gonadique testiculaire et vont apporter la vascularisation, l'innervation et la circulation lymphatique. Dans le tissu interstitiel entre les cordons séminifères des cellules du tissu conjonctif vont se différencier en cellules de Leydig.

Une fois que les testicules se sont différenciés, les cellules de Leydig commencent à produire de la testostérone. La testostérone agit sur les cellules de Sertoli pour stimuler la production de protéines nécessaires à la différenciation des cellules germinales. Elle agit également sur les tissus cibles dans le corps pour induire la masculinisation en induisant le développement des canaux de Wolff et du sinus urogénital.

Les testicules formés dans la cavité abdominale vont migrer vers le scrotum jusqu'au neuvième mois. Cette descente est soutenue par le raccourcissement d'un ligament qui connecte le testicule au scrotum : le *gubernaculum testis*. Le processus de descente des testicules implique la migration des testicules à travers les canaux inguinaux et leur descente dans le scrotum, tout en maintenant leur connexion vasculaire et nerveuse avec l'abdomen. Ce processus est potentiellement régulé par une série d'interactions entre des gènes, des hormones et des facteurs de croissance.

4. **L'histologie du parenchyme testiculaire**

Les structures testiculaires sont divisées en deux compartiments principaux : le compartiment séminifère formé par le tissu épithélial des tubes séminifères, lieu de la spermatogenèse et le compartiment interstitiel occupant l'espace inter-tubaire, comprenant, entre autres, les cellules de Leydig responsables de la production d'androgènes.

a. Le compartiment interstitiel

Le tissu interstitiel contient de nombreuses cellules essentielles aux fonctions endocrines et paracrines du testicule. On retrouve notamment les cellules de Leydig qui produisent les hormones stéroïdiennes sexuelles, en particulier la testostérone. Ce tissu contient également des cellules myoïdes péritubulaires, des cellules du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des fibres nerveuses.

Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig forment des amas dans le tissu interstitiel et sont proches des capillaires sanguins. Ce sont des cellules endocrines qui synthétisent les androgènes, principalement la testostérone (Huhtaniemi and Teerds, 2018). Le rôle de la testostérone dans la maturation des cellules germinales se fait donc indirectement via les cellules de Sertoli. En effet, les cellules de Leydig présentent des récepteurs à la LH (*Luteinizing Hormone*) mais pas de

récepteurs aux androgènes. Ainsi, la LH module la synthèse et la sécrétion de la testostérone qui agira sur les récepteurs aux androgènes présents au niveau des cellules de Sertoli (Lapoirie et al., 2021) et les cellules myoïdes péricubulaires (Mayer et al., 2018) et aura un rôle prépondérant dans la spermatogenèse (**Figure 5**).

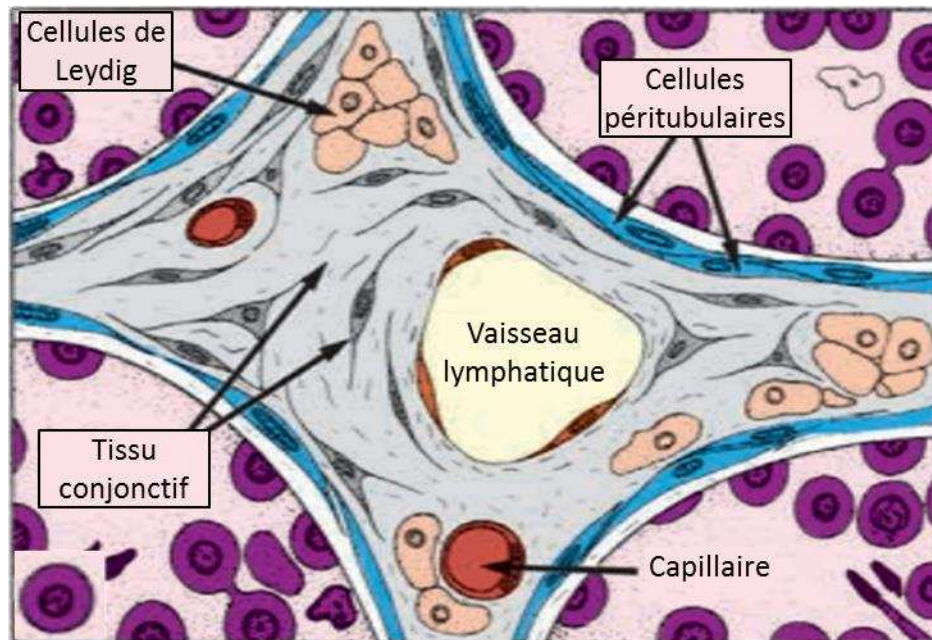


Figure 5. Schéma représentatif du tissu interstitiel (« La reproduction animale et humaine » © Éditions Quæ, 2014)

b. Le compartiment séminifère

Le compartiment séminifère représente la majorité du volume testiculaire. Il est composé des tubes séminifères. Ces tubes sont délimités par une membrane conjonctive externe et par une lame basale sur laquelle reposent les cellules de l'épithélium séminifère. Deux types de cellules peuvent être distingués dans les tubes séminifères : les cellules somatiques de Sertoli qui sont des cellules de soutien et les cellules germinales à différents stades de développement en étroite collaboration avec les cellules de Sertoli, au départ diploïdes (les spermatogonies) donnant par méiose des cellules haploïdes (les spermatides).

Les cellules de Sertoli

La cellule de Sertoli est une grande cellule polarisée qui s'étend de la base de l'épithélium séminifère à la lumière du tube séminifère. Leur noyau de forme polygonale est situé au pôle basal et possède une chromatine fine et un nucléole bien visible. Des expansions des cellules de Sertoli forment avec leurs voisines des jonctions serrées segmentant le tube en

compartiment basal sous les jonctions serrées et en compartiment adluminal au-dessus des jonctions serrées (**Figure 6**). Ces jonctions serrées empêchent tout passage moléculaire et constituent la barrière hémato-testiculaire (BHT) (Mruk and Cheng, 2015). Ainsi, les molécules doivent obligatoirement transiter par la cellule de Sertoli pour gagner le compartiment adluminal dont la composition est différente de celle du compartiment basal. Les cellules de Sertoli s'intercalent entre les cellules germinales et assurent leur support, leur protection et leur nutrition. Elles possèdent une capacité de phagocytose qui leur permet d'éliminer les cellules germinales dégénérées et les résidus cytoplasmiques. Les cellules de Sertoli contiennent des récepteurs à la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) et celle-ci permet le maintien de la structure morphologique de la cellule de Sertoli et stimule la production d'inhibine B qui va permettre la régulation de la sécrétion de la FSH par l'hypophyse antérieure par rétrocontrôle négatif (Jégou and Rolland, 2018). La FSH stimule également la production d'ABP (*Androgen Binding Protein*) par la cellule de Sertoli. L'ABP est une glycoprotéine ayant une très forte affinité pour la testostérone et permet de transporter la testostérone dans les tissus jusqu'au compartiment séminifère.

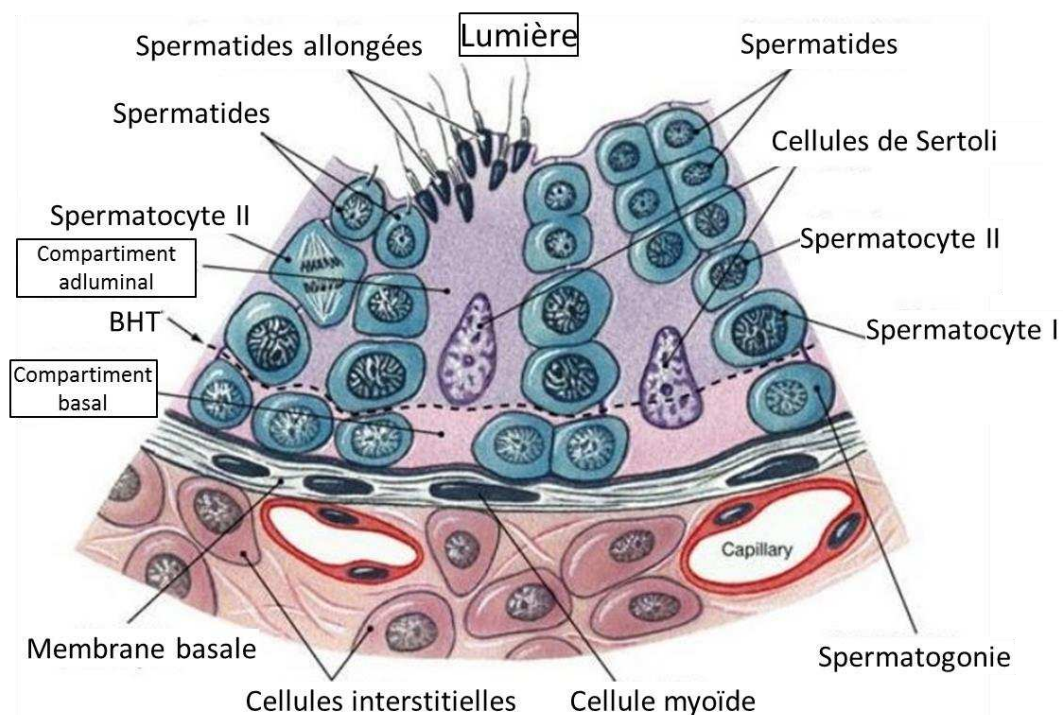


Figure 6. Schéma d'une cellule de Sertoli (Junqueira LC., Carneiro J., 2007)

II. La spermatogenèse

La spermatogenèse se déroule dans l'épithélium des tubes séminifères. Il s'agit d'un processus physiologique continu qui démarre à la puberté et évolue par cycles d'environ 74 jours (Heller and Clermont, 1963). Elle permet la formation de cellules haploïdes, hautement différenciées, les spermatozoïdes, à partir de cellules souches germinales diploïdes (**Figure 7**).

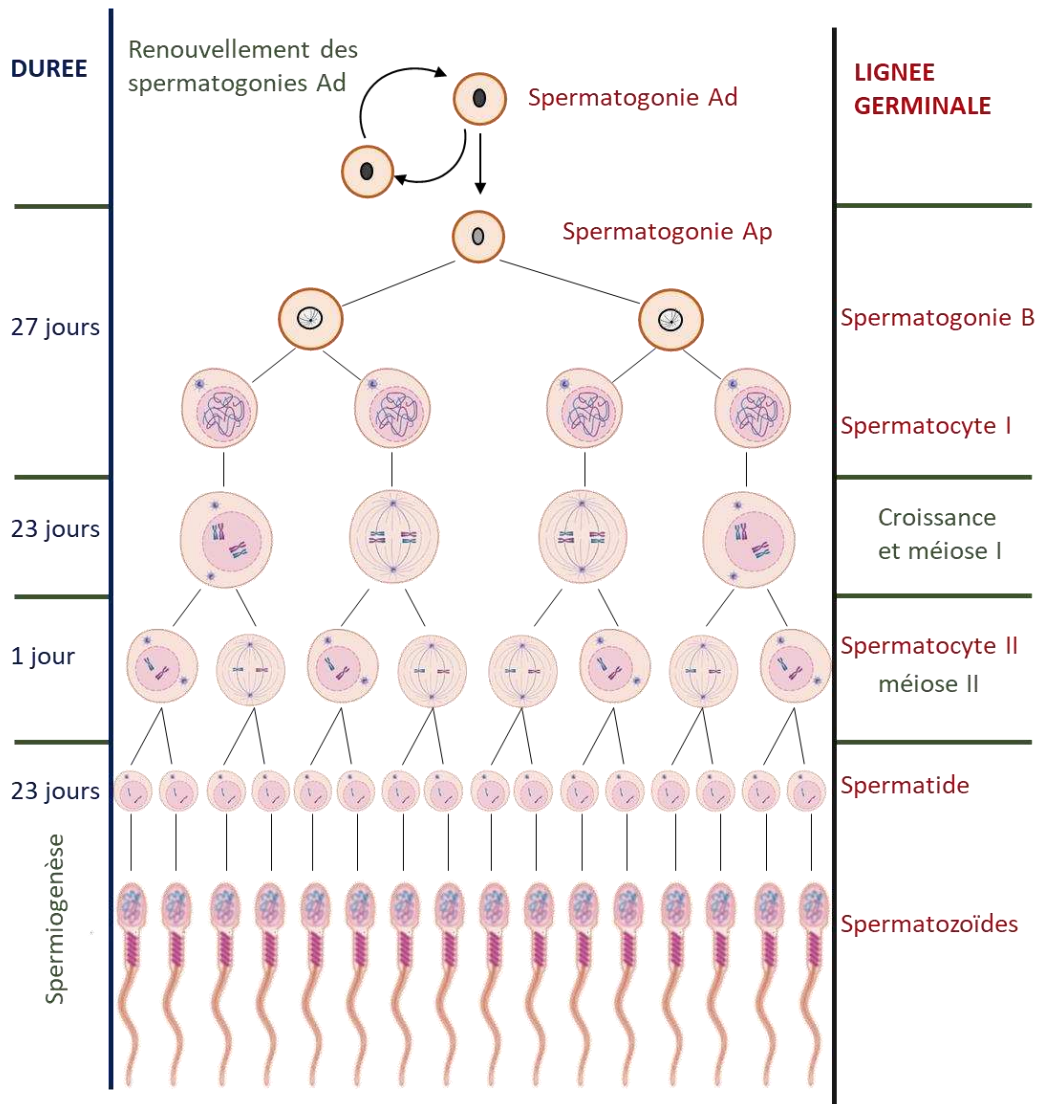


Figure 7. Les étapes de la spermatogenèse (Cazin, GETI, 2023, créée sur Biorender.com).

Dans chaque tube séminifère, une région déterminée entre en spermatogenèse tous les 16 jours, il s'agit du cycle de l'épithélium séminifère (Hess and de Franca, 2008). En effet, les cellules germinales au même stade de développement sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques et ces liaisons contribuent à la synchronisation de leur développement. Chaque type d'association de cellules germinales détermine un stade de l'épithélium

séminifère. Un cycle correspond à une succession chronologique d'une série complète d'association en un point donné du tube séminifère. Cette classification des stades de l'épithélium séminifère se fait grâce à l'étude du développement de l'acrosome et de la morphologie cellulaire, initialement par l'acide périodique de Schiff (Clermont, 1963) puis par immunohistochimie permettant une caractérisation plus précise. En effet, au départ seulement 6 stades de l'épithélium séminifère avaient été identifiés chez l'homme (Amann, 2008) puis en 2013, ce sont douze stades qui ont été définis (**Figure 8**) (Muciaccia et al., 2013).

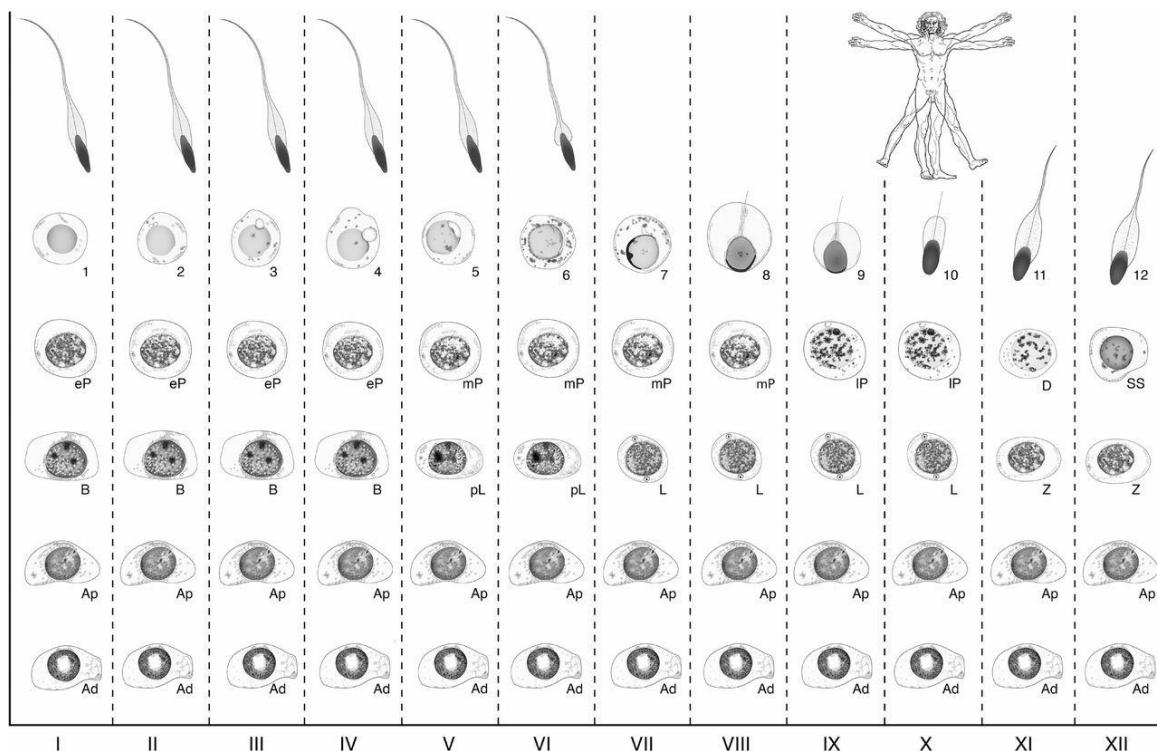


Figure 8. Les stades de l'épithélium séminifère chez l'homme (Ap, spermatogonie A-pale ; Ad, spermatogonie A-dark ; B, spermatogonie B, pL, spermatocytes au stade préleptotène ; L, leptotène ; Z, zygotène ; eP, « early » pachytène ; mP, « mid »-pachytène ; lp, « late » pachytène ; D, diplotène ; SS, spermatocyte secondaire ; 1-12 premières étapes de chaque stade de développement des spermatozoïdes.) D'après (Muciaccia et al., 2013)

Ces ondes de progression cellulaire le long des tubes séminifères semblent être dépendantes de l'action de la vitamine A. En effet, l'ATRA (« *all-trans retinoic acid* »), le métabolite actif de la vitamine A, induit la différenciation des spermatogonies et l'entrée en méiose synchronisée des spermatocytes primaires (Mark et al., 2015).

La production de spermatozoïdes est continue à partir de la puberté. Cette production persiste avec l'âge mais son rendement baisse, en effet un nombre important de cellules meurent par apoptose.

Trois phases successives et continues sont distinctes : la multiplication des spermatogonies par mitose, la méiose et la spermiogénèse ou maturation sans division.

1. **La spermatocytogenèse : production de cellules méiotiques, les spermatocytes**

Les cellules souches ou spermatogonies, diploïdes, de grosse taille (10 à 15 μm) sont situées dans le compartiment basal et sont en étroit contact avec les cellules de Sertoli grâce à des jonctions communicantes. Les spermatogonies se divisent par mitoses en permettant le maintien du stock de réserve des cellules souches et permettent la production des gamètes par méiose.

Les spermatogonies sont divisées en 3 types selon l'aspect de leur noyau : les spermatogonies Ad (d : *dark*) avec une chromatine dense finement granuleuse à l'aspect sombre et un cytoplasme pauvre en organites ; les spermatogonies Ap (p : *pale*) avec une chromatine « poussiéreuse », ce sont des cellules peu différenciées avec un cytoplasme pauvre en organites et les spermatogonies B avec une chromatine à gros grains irréguliers et un cytoplasme riche en organites. Il s'agit du premier degré de différenciation. Les spermatogonies Ap donnent 2 spermatogonies B (diploïdes) donnant 2 spermatocytes primaires (diploïdes) (Fayomi and Orwig, 2018). Cela dure 27 jours. Les spermatocytes primaires sont reliés aux cellules de Sertoli par des jonctions d'ancrage et communicantes. Ils restent en interphase 3 à 4 jours jusqu'à la première division de méiose.

2. **La méiose : production de cellules haploïdes**

La méiose comporte deux divisions cellulaires successives, appelées méioses I et II. La réplication de l'ADN a lieu avant la prophase de la méiose I. Les spermatocytes primaires en interphase passent du compartiment basal au compartiment adluminal dès qu'ils entrent en prophase I. La prophase I comporte les stades suivants : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse (**Figure 9**). A cette étape, chaque paire de chromosomes ou bivalents est formé de 4 chromatides. Au cours de la prophase I, un mécanisme qui permet une ségrégation précise des chromosomes homologues et permet un brassage génétique a lieu, il s'agit de la recombinaison méiotique. Elle est marquée par les cassures doubles brins de l'ADN (CDB)

réparties sur tout le génome. La réparation de ces CDB fait suite à l'appariement de deux chromosomes homologues et s'accompagne d'un brassage génétique.

Au stade leptotène (du grec « *leptos* » mince et « *taenia* » ruban), les chromosomes entament leur condensation et s'individualisent. C'est à ce stade qu'est initiée la recombinaison méiotique et la réparation des CDB de l'ADN ainsi que la formation du complexe synaptonémal. L'emplacement des CDB n'est pas aléatoire le long des chromosomes mais répond à des contraintes qui varient selon les espèces, on parle de « points-chauds » de CDB. Ces points-chauds sont déterminés par les marques de méthylation de l'histone H3 (H3K4me3 et H3K36me3) qui sont catalysés par la protéine PRDM9 (*PR/SET domain containing protein 9*) (Baudat et al., 2010, p. 9). La formation des CDB est issue de l'action conjointe des protéines SPO11 et TOPOVIBL (Robert et al., 2016). SPO11 est la protéine clé de la formation des CDB, c'est un homologue de TopoVIA, une sous-unité catalytique de la topoisomérase Topo6 des archaebactéries. Après la formation des CDB, SPO11 est liée aux extrémités 5' de l'ADN de façon covalente et son activité est restreinte grâce au complexe RAD50-MRE11-NBS1 (Lamarche et al., 2010) et à l'activation de la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). ATM permet la première vague de phosphorylation de H2AX ce qui permet la signalisation des CDB jusqu'à leur réparation (Kuo and Yang, 2008). Par la suite, les extrémités 5' de la CDB sont dégradées par des exonucléases pour produire un ADN simple brin recouvert des protéines recombinases RAD51 et DMC1. Ces recombinases se fixent au niveau des CDB et initient la réparation des cassures en utilisant la région intacte du chromosome homologue comme matrice de réparation. De plus, les protéines MEIOB, SPATA22 et RPA coopèrent pour assurer une recombinaison méiotique appropriée en se liant à l'ADN simple brin et en prévenant toute dégradation par une exonucléase (Ribeiro et al., 2021, p. 22). Au stade leptotène, les télomères (extrémité des chromosomes) se fixent à la membrane nucléaire et lors de la transition leptotène/zygotène, ils se regroupent pour former une structure appelée le « bouquet ». Le complexe protéique Shelterin se lie au complexe LINC (SUN1-KASH5) (Kmonickova et al., 2020) par l'intermédiaire du complexe TERB1-TERB2-MAJIN (Wang et al., 2019, p. 2) permettant l'appariement des chromosomes.

Au stade zygotène (du grec « *zygon* » joug et « *taenia* » ruban), les autosomes homologues s'apparient (synapsis) grâce au complexe synaptonémal. Des protéines telles que SYCP1 à 3, SYCE1 à 3, SIX6OS1 ou encore TEX12 sont des composants du complexe synaptonémal et

permettent un auto-assemblage de type « fermeture éclair » sur toute la longueur des chromosomes homologues appariés (C. Xie et al., 2022). De plus, des cohésines maintiennent les chromatides sœurs et les chromosomes homologues appariés. A ce stade, la recombinaison homologue progresse permettant les interactions entre chromosomes homologues.

Au stade pachytène (du grec « *pachys* » épais), les chromosomes sont très condensés et complètement appariés entre eux formant un bivalent. Les *crossing-over* se forment, il s'agit d'échanges de segments chromosomiques entre chromatides non sœurs d'un même bivalent, c'est-à-dire héritées de la mère et du père. Au sein d'un même bivalent, plusieurs *crossing-over* peuvent se produire et les bivalents obtenus ont un contenu génétique différent des bivalents initiaux. Cela signifie que les deux spermatocytes secondaires issus du même spermatocyte primaire ont une structure génétique différente. En plus des *crossing-over*, les réparations des CDB vont donner lieu aux *non-crossovers*, c'est-à-dire la réparation des CDB sans échange de chromatine.

Les chromosomes sexuels ou gonosomes « X » et « Y » quant à eux, sont isolés dans la vésicule sexuelle où leur génome est inactivé. Contrairement aux autosomes dont l'appariement est complet, l'appariement de l'X et de l'Y se fait au niveau des régions pseudo-autosomiques PAR1 et PAR2 (Graves et al., 1998). On retrouve les protéines BRCA1, ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) au niveau de la vésicule sexuelle, nécessaires pour la seconde vague de phosphorylation de H2AX. En effet, ATR permet la phosphorylation de l'histone H2AX, contrôlée par MDC1, engendrant ainsi la condensation de la chromatine des chromosomes X et Y et leur inactivation transcriptionnelle (Royo et al., 2013).

Au stade diplotène (du grec « *diplos* » double), les complexes synaptonémaux se dissocient mais les chromosomes homologues restent appariés au niveau de chiasmas résultant des *crossing-over*.

La prophase I se termine par la diacinèse (du grec « *kinesis* » mouvement) où les chromosomes se condensent et se localisent près de l'enveloppe nucléaire qui se fragmente (C. Xie et al., 2022). Les stades suivants de la méiose I permettent d'obtenir 2 spermatocytes secondaires à partir d'un spermatocyte primaire, il s'agit d'une division réductionnelle car les spermatocytes

secondaires sont haploïdes (23 chromosomes constitués de 2 chromatides sœurs). Cette étape dure 23 jours.

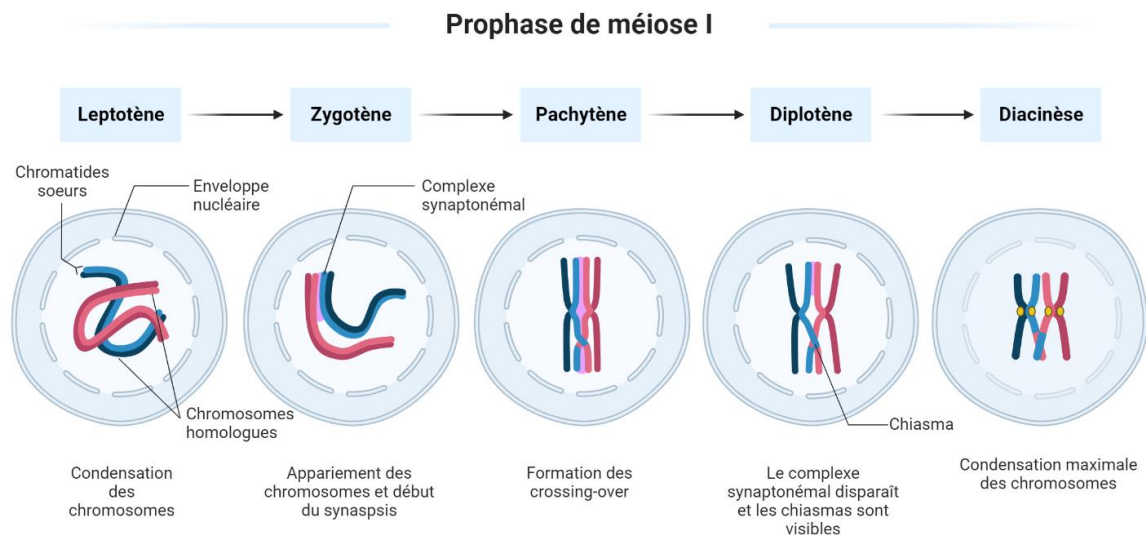


Figure 9. Représentation schématique des étapes de la prophase de méiose I (créée sur Biorender.com).

Les spermatocytes secondaires, reliés aux cellules de Sertoli par des jonctions d'ancrage et communicantes, s'engagent alors dans la deuxième division méiotique. La deuxième division de méiose n'est pas précédée d'une réplication d'ADN : il s'agit d'une division équationnelle. Elle permet la séparation des deux chromatides sœurs de chacun des 23 chromosomes du spermatocyte secondaire. Chaque spermatocyte secondaire produit deux spermatides contenant 23 chromosomes monobrin. Cette étape dure 24 heures.

Jusqu'au stade de spermatides, la cytokinèse est incomplète, en effet un pont cytoplasmique relie les deux cellules filles. Ces ponts permettent la synchronisation de l'évolution des différents stades. Ils disparaissent à la fin de la spermiogénèse.

3. La spermiogénèse : différenciation des spermatides

La spermiogénèse est une phase de maturation sans division qui dure 23 jours. La spermatide est une cellule haploïde de forme ronde, ayant un diamètre de 8 à 10 μm et elle se situe au pôle apical des cellules de Sertoli. Elle présente un noyau sphérique central et de petites mitochondries. A l'issue de la deuxième division de méiose elle subit 3 modifications majeures nucléaires, morphologiques et cytoplasmiques la transformant en spermatide allongée. Il

s'agit de la biogenèse de l'acrosome, de l'hypercompaction de la chromatine et de la formation du flagelle (**Figure 10**).

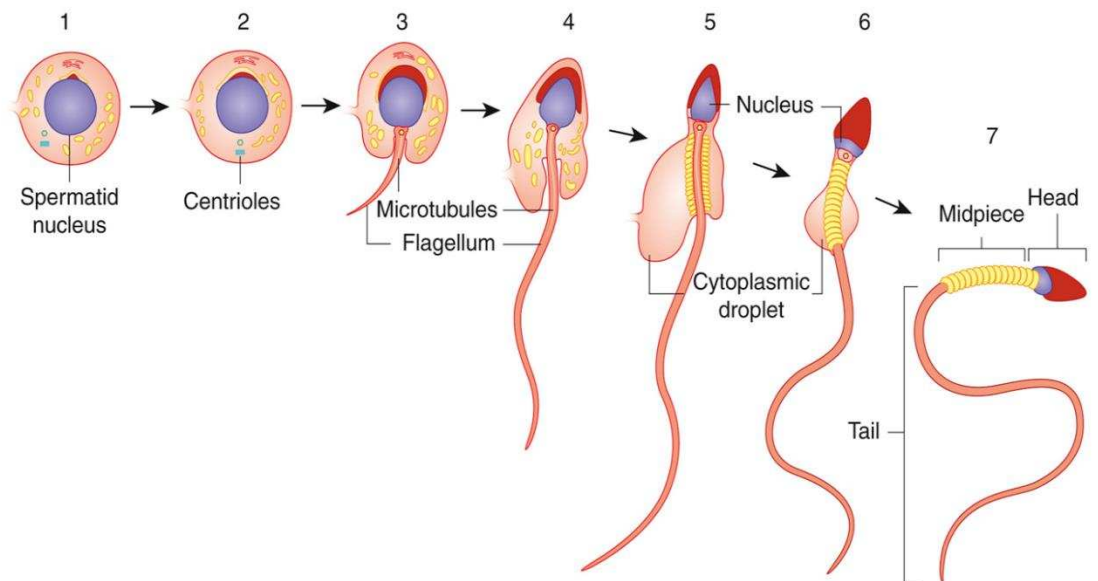


Figure 10. La spermiogénèse. (Schatten and Stearns, 2015)

a. La biogenèse de l'acrosome

L'appareil de golgi, juxta-nucléaire, produit des vésicules pro-acrosomales qui confluent pour donner l'acrosome qui s'étale sur les 2/3 du pôle antérieur du noyau (Khawar et al., 2019). Lors de la réaction acrosomique, l'acrosome va fusionner avec la membrane plasmique du spermatozoïde afin de libérer son contenu enzymatique permettant le passage de la zone pellucide entourant l'ovocyte lors de la fécondation.

b. L'hypercompaction de la chromatine

La spermiogénèse permet la modification du noyau par condensation de la chromatine dû au remplacement des histones (H2A, H2B, H3, H4), protéines liées à l'ADN, dans un premier temps par des protéines transitoires (TP1 et TP2) puis par des protamines (PRM1 et PRM2). Ce remplacement est rendu possible par des modifications post-traductionnelles d'histones. Au final il reste seulement 15% des histones de départ (**Figure 11**). Cette condensation permet de protéger le génome du spermatozoïde des différentes agressions physiques et chimiques qu'il peut rencontrer au cours de son transit dans les tractus génitaux males et femelle. Du fait de cette hypercompaction, le génome spermatique est transcriptionnellement inactif (Hao et al., 2019).

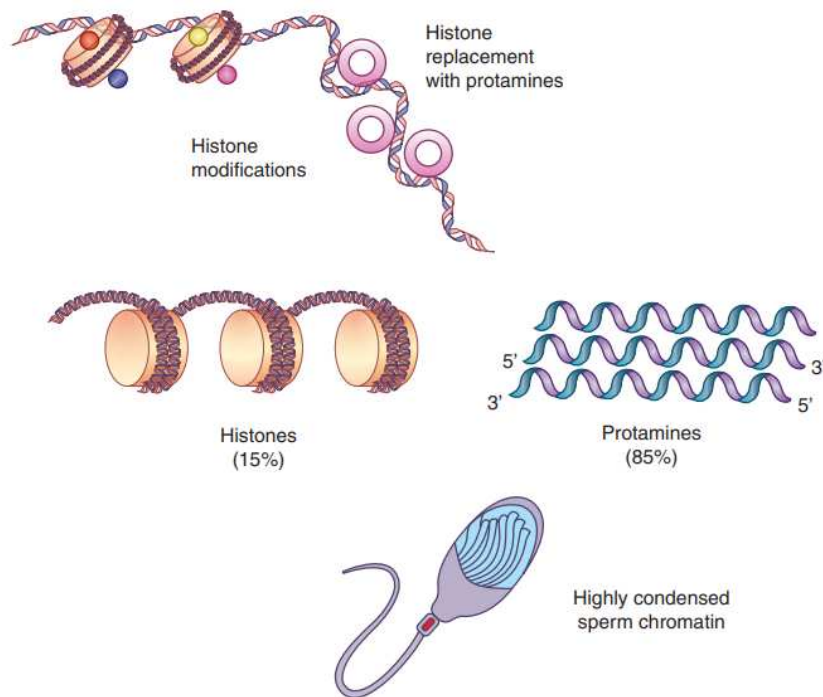


Figure 11. Remplacement des histones par les protamines dans le spermatozoïde humain. D'après (Marchiani et al., 2020)

Le noyau s'allonge et prend une forme ovoïde et aplatie, la modification de la membrane plasmique se fait par l'intégration de protéines nécessaires à la liaison spermatozoïde-ovocyte et la synthèse de protéines à partir des ARNm synthétisés lors de la prophase de la première division méiotique. Ces protéines sont nécessaires à la spermiogénèse et à la fécondation (Barroso et al., 2009).

c. La formation du flagelle

Deux centrioles vont migrer au pôle opposé de l'acrosome. Ce sont des structures chargées d'établir les fuseaux de microtubules impliqués dans la division cellulaire et la formation des flagelles. L'un, proximal d'origine paternelle, reste intact sous le noyau, l'autre, distal d'origine maternelle orienté perpendiculairement à la membrane cellulaire, produit l'ébauche de l'axonème du flagelle et disparaît (Lehti and Sironen, 2017). Le flagelle contenant l'axonème s'allonge, entouré de la membrane plasmique. Le cytoplasme entraîne avec lui les mitochondries et les autres organites et forme autour de l'axonème le manchon cytoplasmique. Le cytoplasme est ensuite éliminé et phagocyté par la cellule de Sertoli.

4. La spermiation

Les spermatides allongées se détachent de la cellule de Sertoli du fait de ses déformations et des contractions des tubes séminifères par les cellules myoïdes. Les spermatides sont alors libérés de l'épithélium séminifère dans la lumière des tubes séminifères, il s'agit de la spermiation (O'Donnell et al., 2011) (**Figure 12**). Les cellules germinales libérées dans la lumière des tubes séminifères prennent alors le nom de spermatozoïdes. Durant cette période, le spermatozoïde perd une partie de son cytoplasme qui sera phagocyté par la cellule de Sertoli. Cette élimination se fait en deux étapes, la première par des prolongements des spermatides, les complexes tubulobulbaires, entrant dans la cellule de Sertoli. La deuxième se fait lors de la spermiation où le cytoplasme va être éliminé sous forme de gouttelette cytoplasmique ou corps résiduels et phagocyté par les cellules de Sertoli. Ces corps résiduels contiennent une grande partie des organites, lipides et ribosomes des spermatides. Leur phagocytose joue très certainement un rôle dans la synchronisation du cycle de l'épithélium séminifère et dans le fonctionnement de la cellule de Sertoli. Enfin, les spermatozoïdes, qui ne sont pas encore matures puisqu'ils n'ont pas encore acquis leur motilité et leur pouvoir fécondant, vont achever leur différenciation et vont transiter du *rete testis* dans les canaux efférents puis dans l'épididyme.

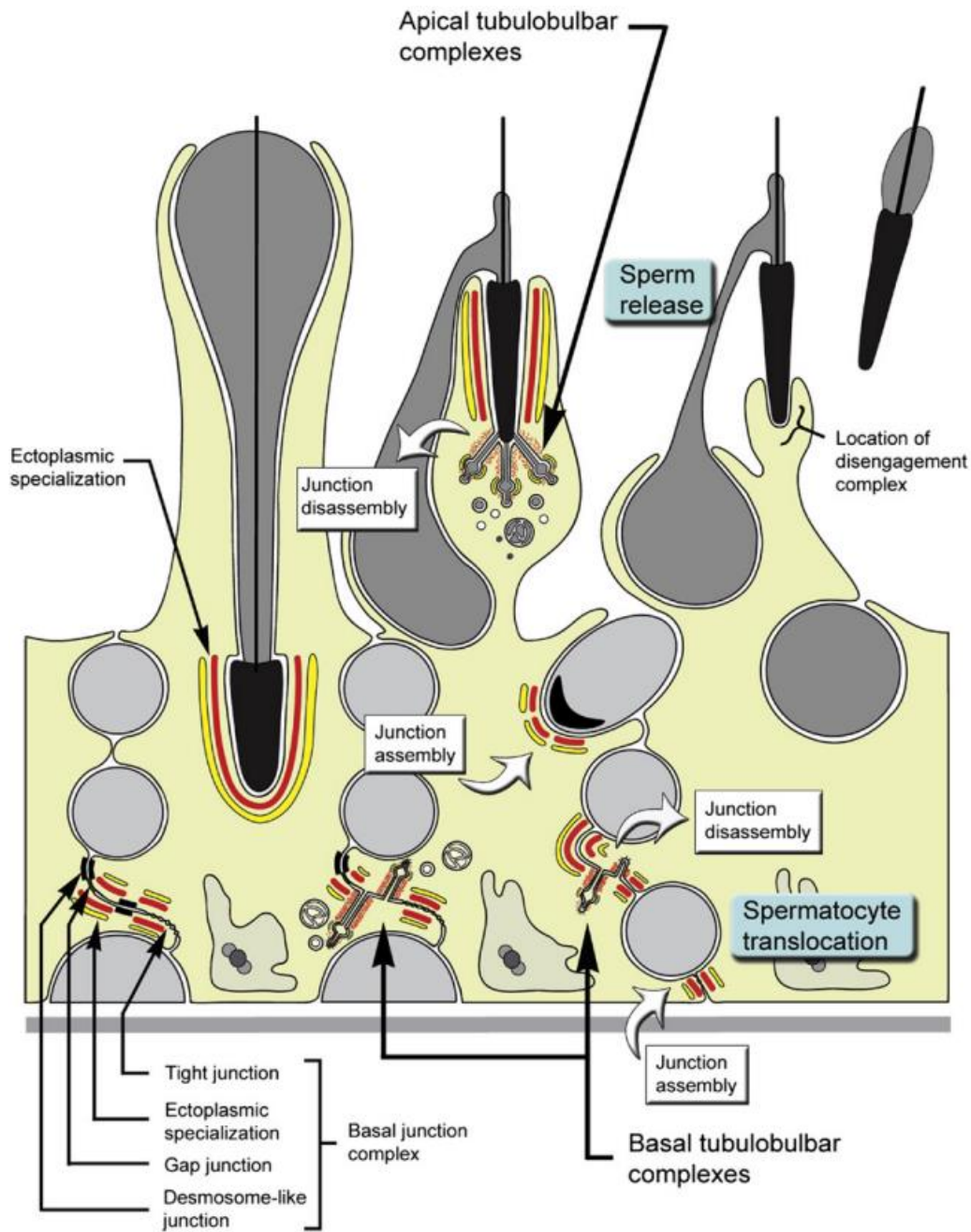


Figure 12. Représentation schématique de la spermiation (D'après (Vogl et al., 2013))

5. La structure et l'ultrastructure du spermatozoïde

Le spermatozoïde a été observé pour la première fois en 1677 par Antonie van Leeuwenhoek (Howards, 1997). Il comprend une tête composée d'un noyau recouvert de l'acrosome, une pièce intermédiaire et un flagelle lui permettant de se mouvoir (**Figure 13**).

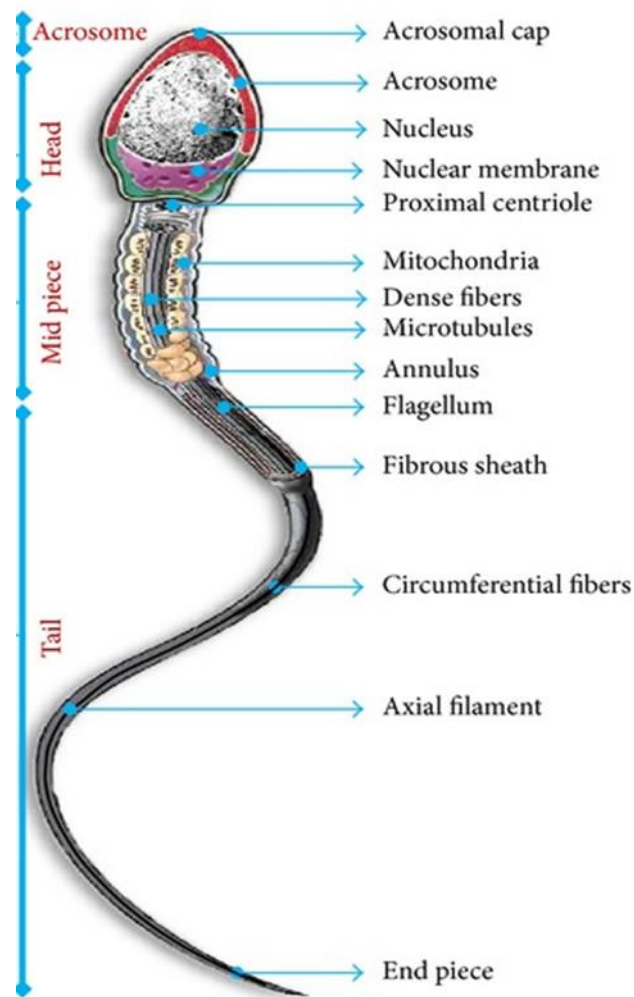


Figure 13. Représentation d'un spermatozoïde humain mature et ses différentes parties. D'après (Rahman et al., 2013)

a. La tête spermatique

La tête du spermatozoïde, de 4 à 5 μm de longueur et de 1,5 à 3 μm de largeur, est composée d'un noyau recouvert de l'acrosome. Le noyau occupe la majeure partie de la tête. Sa chromatine est très condensée par les protamines. L'acrosome recouvre les deux tiers antérieurs du noyau et contient des enzymes impliquées dans la traversée des enveloppes de l'ovocyte. Le cytoplasme est quasi absent et ne contient pas d'organites.

b. L'appareil de jonction tête-flagelle

Le col ou pièce de connexion tête-flagelle (*HTCA, Head to Tail Coupling Apparatus*), d'une longueur de 2 μm est assemblée par le centriole proximal qui forme un *capitulum* et des

colonnes striées. Le centriole proximal se positionne dans la « fosse d'implantation » et un épaissement local se forme sur la membrane nucléaire constituant la plaque basale (Hoyer-Fender, 2022) (**Figure 14**). La pièce connective émet 9 fibres denses qui vont entourer l'axonème (ODFs : *Outer Dense Fibers*). Chaque fibre dense est reliée à un doublet de microtubule permettant le maintien de la structure globale du flagelle. Elles ont également un rôle dans la motilité du flagelle (Zhao et al., 2018) puisque des mutations de gènes codant pour des protéines des fibres denses sont impliqués dans certains cas d'asthénozoospermie.

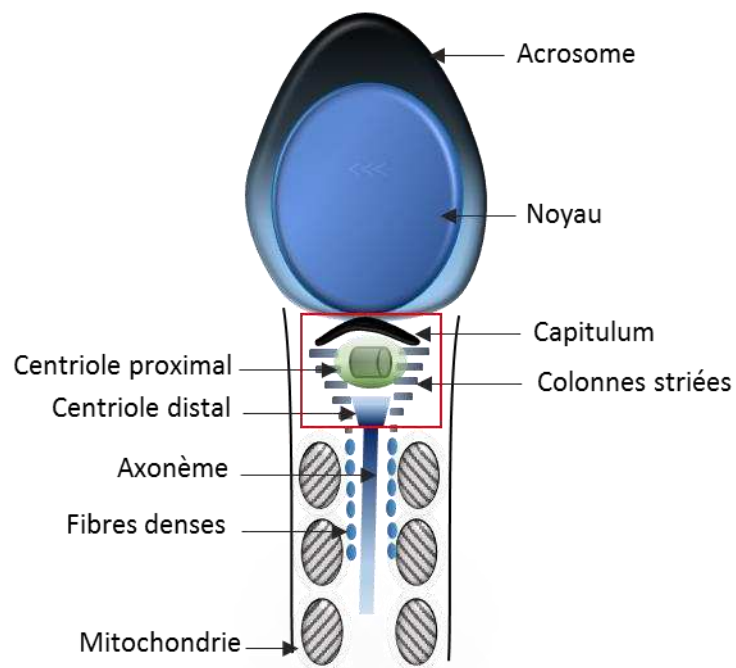


Figure 14. Structure de l'appareil de jonction tête-flagelle du spermatozoïde humain. Adapté de (Cazin et al., 2021a)

A la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale se trouve un anneau de septines appelé l'annulus ou l'anneau de Jensen. L'annulus agit comme une barrière à la diffusion des protéines et contrôle l'organisation correcte de la pièce intermédiaire (Toure et al., 2011).

c. Le flagelle

Le flagelle, d'une longueur de 60 μm et d'un diamètre inférieur à 1 μm (Serres et al., 1983), est constitué de 3 parties, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Lehti and Sironen, 2017). La pièce intermédiaire est constituée d'un manchon mitochondrial, à l'extérieur de 9 fibres denses entourant l'axonème. La pièce principale est constituée d'une gaine fibreuse et de colonnes longitudinales à l'extérieur des 9 fibres denses entourant l'axonème. La pièce terminale ne contient que l'axonème (**Figure 15**).

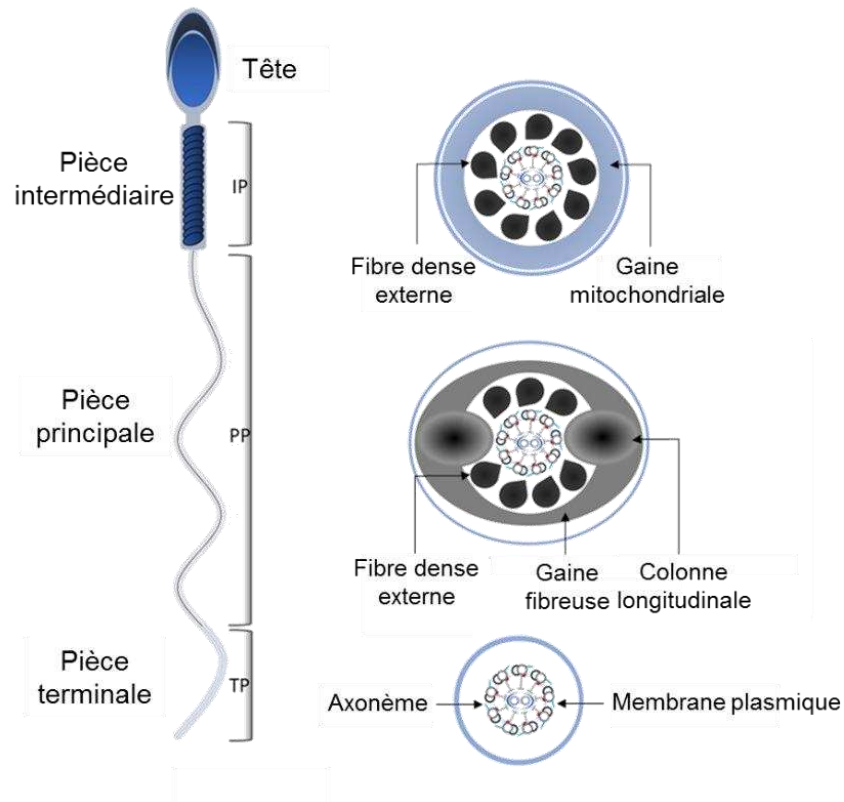


Figure 15. Structure et ultrastructure du spermatozoïde humain (Kherraf, 2018).

L'axonème

L'axonème est l'unité centrale du flagelle, il est constitué d'un appareil central formé par deux microtubules centraux et 9 doublets périphériques de microtubules, cette structure est de type « 9+2 » et le motif axonémal est répété tous les 96 nm (**Figure 16**). Cette structure se différencie de la forme d'axonème « 9+0 », sans paire centrale, que l'on retrouve dans les autres structures ciliées. Chaque doublet périphérique est constitué d'un microtubule A, interne, comportant 13 sous unités de tubuline qui est la protéine de structure des microtubules et d'un microtubule B, externe, constitué de 9 sous unités de tubuline (Linck et al., 2016).

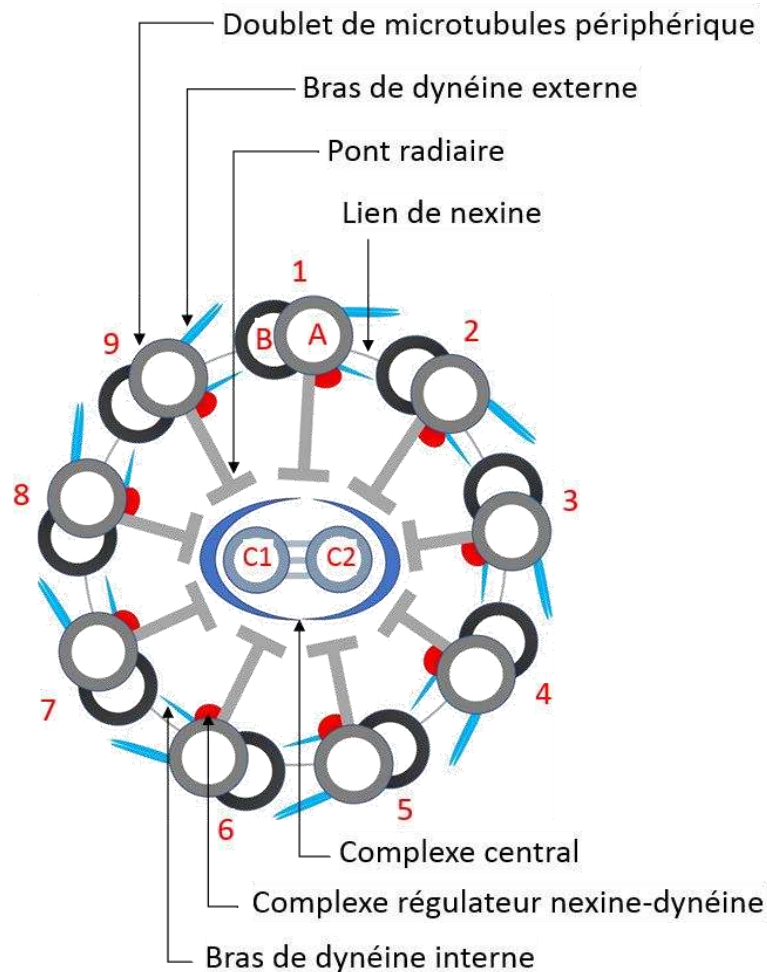


Figure 16. L'axonème, unité fondamentale du flagelle. (Kherraf, 2018).

Les microtubules A et B sont constitués de sous-unités α et β polarisées ce qui confère aux microtubules leur dynamique. Les doublets périphériques ainsi que les microtubules de la paire centrale sont reliés entre eux par des ponts de nexine, protéine qui assure leur cohésion et limite les mouvements des microtubules les uns par rapport aux autres (O'Donnell and O'Bryan, 2014). Chaque microtubule A émet 2 prolongements protéiques en direction du microtubule B du doublet voisin, il s'agit des bras de dynéine, protéines capables d'hydrolyser l'ATP. On distingue les bras de dynéine externes (ODA : *Outer Dynein Arm*) et les bras de dynéine internes (IDA : *Inner Dynein Arm*). Les bras de dynéine sont attachés au microtubule A de chaque doublet périphérique et transmettent l'énergie générée pour la motilité au microtubule B. L'accrochage et le décrochage cyclique des bras de dynéine sur les microtubules B du doublet adjacent génèrent le mouvement flagellaire (Viswanadha et al., 2017). Il existe deux types de dynéines : cytoplasmique et axonémales, constitués de sous unités motrices elles-mêmes constituées de chaînes lourdes, intermédiaires et légères qui

confèrent à la dynéine son activité ATPasique. En effet, l'énergie du mouvement flagellaire est fournie par l'hydrolyse de l'ATP produit par les mitochondries du manchon mitochondrial, grâce à l'activité ATPasique des bras de dynéine (Kobayashi and Takeda, 2012). Les ODA sont responsables de la fréquence des battements flagellaires et de la génération de la force nécessaire à la pénétration des spermatozoïdes dans la zone pellucide de l'ovocyte à la fécondation. Les IDA quant à eux jouent un rôle dans la formation de la courbure du flagelle (Kumar and Singh, 2021). De fait, les mutations dans les gènes codants pour les bras de dynéine entraînent un dysfonctionnement de la motilité des spermatozoïdes (H.-Y. Hu et al., 2021, p. 1; Whitfield et al., 2019).

Les doublets périphériques sont maintenus stables également par la présence de complexes protéiques, le N-DRC (*Nexin Dynein Regulatory Complex*) et le CSC (*Calmoduline and Radial Spoke associated complex*). Le N-DRC relie le microtubule A d'un doublet au microtubule B du doublet suivant et possède un rôle important dans la régulation de la motilité flagellaire (Bower et al., 2013). Le CSC joue un rôle dans l'ancrage et la stabilisation des ponts radiaires et est impliqué dans la régulation de la motilité. Il est lié au N-DRC et est composé de protéines calmoduline et de protéines issues des ponts radiaires (Heuser et al., 2012).

Les deux microtubules de la paire centrale (C1 et C2) sont entourés d'une gaine fibreuse, reliés aux microtubules A périphériques par les ponts radiaires. Ceux-ci assurent leur maintien en position centrale et stabilisent l'ensemble des doublets de microtubules et contribuent à la régulation de l'activité des dynéines et donc à la motilité flagellaire (Pigino and Ishikawa, 2012; Smith and Yang, 2004). La paire centrale est mal caractérisée mais aurait un rôle dans la motilité flagellaire (Zhao et al., 2019).

Les structures paraxonémales

Les structures paraxonémales sont des structures présentes entre l'axonème et la membrane plasmique. Au niveau de la pièce intermédiaire, le manchon mitochondrial entoure 9 fibres denses externes appariées aux 9 doublets de microtubules périphériques. A partir de la pièce principale, la gaine fibreuse se met en place autour des fibres denses et remplace le manchon mitochondrial (**Figure 15**). La gaine fibreuse est constituée de deux colonnes longitudinales reliées aux doublets de microtubules 3 et 8 de l'axonème. Elle entoure les fibres denses et possède un rôle de protection et de maintien du flagelle. La gaine fibreuse est nécessaire à la

motilité flagellaire, en effet il a été montré que des mutations dans des gènes codant pour des protéines de la gaine fibreuse entraînaient une diminution de la motilité des spermatozoïdes (Martinez et al., 2018; G. Zhang et al., 2021). De plus, la gaine fibreuse joue également un rôle dans la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation en jouant un rôle majeur dans la signalisation calcique et dans l'hyperactivation des spermatozoïdes. En effet, la gaine fibreuse contient la protéine CABYR (*calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein*) (Frintrop et al., 2022; Young et al., 2016) nécessaire à la capacitation en phosphorylant la tyrosine protéique et en augmentant le calcium intracellulaire.

III. La régulation de la spermatogenèse

1. La régulation hormonale

La spermatogenèse est sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. L'hypophyse sécrète deux hormones gonadotropiques, la LH (*Luteinizing Hormone*) et la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) sous l'action stimulatrice de la GnRH (« *gonadotropin-releasing hormone* ») sécrétée par l'hypothalamus (**Figure 17**). La sécrétion de ces hormones est dite pulsatile. Ces hormones sont nécessaires à l'initiation et au maintien de la spermatogenèse.

La LH a pour cible les cellules de Leydig qui portent des récepteurs (LHR) et stimule la production d'androgènes, en particulier de la testostérone qui permet l'apparition des caractères sexuels secondaires. Ces androgènes agissent sur leurs récepteurs au niveau de l'épithélium séminifère et donc indirectement sur les cellules de Sertoli. Etant donné que les cellules germinales ne possèdent pas de récepteurs aux androgènes, la FSH agit sur les cellules de Sertoli qui vont sécréter l'ABP qui a une forte affinité pour la testostérone, ce qui va permettre de concentrer celle-ci dans les tubes séminifères nécessaire pour l'initiation et le maintien de la spermatogenèse en stimulant l'activité mitotique des spermatogonies (Heinlein and Chang, 2002). La testostérone agit également sur les cellules péri-tubulaires en contrôlant la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères.

La FSH qui cible les cellules de Sertoli, joue donc un rôle dans la stimulation de l'activité mitotique des spermatogonies mais permet également la production de l'activine A qui permet, par rétrocontrôle positif, la stimulation de FSH (Bloise et al., 2019). De la même façon,

la cellule de Sertoli, sous l'effet de la FSH, produit l'inhibine B qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse et freine la synthèse de FSH (Meachem et al., 2001) (**Figure 17**).

Il existe également une régulation paracrine de la spermatogenèse. Par exemple, la FSH stimule indirectement les cellules de Leydig via la cellule de Sertoli. De plus, les cellules de Sertoli produisent des facteurs de croissance et des hormones peptidiques qui régulent la production d'hormones stéroïdiennes par les cellules de Leydig. En effet, la production d'inhibine et d'IGF-1 (« *insulin like-growth factor 1* ») régule positivement la production d'androgènes par la cellule de Leydig et la production d'activine et de TGFβ (« *transforming growth factor β* ») régule négativement la production d'androgènes par la cellule de Leydig (Carreau, 1996). Les cellules de Leydig produisent également des facteurs de croissance qui ont un effet sur les cellules de Sertoli (IGF-1, TGFβ et IL-1 (interleukine-1)).

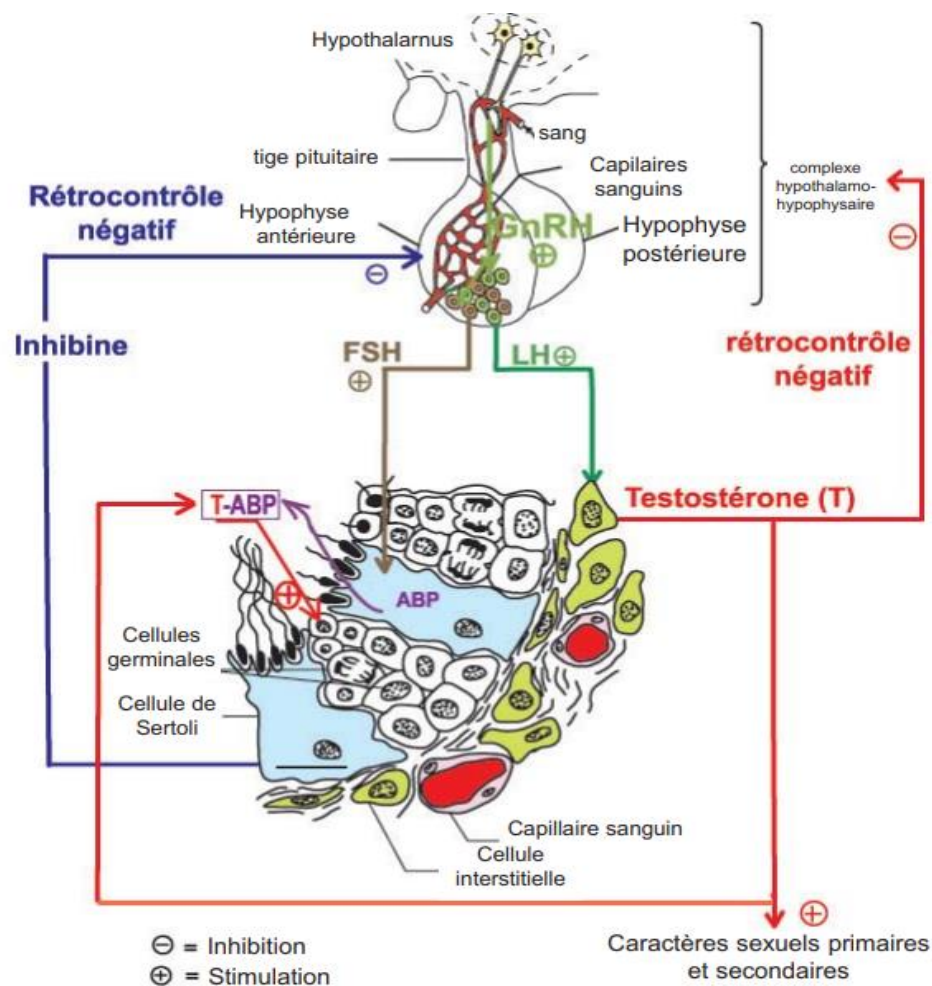


Figure 17. Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (source : <https://matheleve.tn/>)

2. La régulation thermique

Pour permettre une progression optimale du processus spermatogénique, la température testiculaire chez la plupart des mammifères, y compris chez l'homme doit être inférieure de quelques degrés (2-4°C) à celle de la température centrale du corps (Mieusset and Bujan, 1995). En effet, une température testiculaire à 37°C altère significativement la quantité et la qualité des spermatozoïdes produits. La régulation de la température testiculaire dans l'objectif de son maintien à un niveau optimal pour le déroulement de la spermatogenèse s'avère donc très importante. La modulation de ce paramètre est assurée par quelques structures anatomiques spécialisées et de certaines caractéristiques histologiques associées.

a. Le scrotum

La possession d'un scrotum pour loger les testicules en position extra-abdominale est une caractéristique propre à la majorité des mammifères. Cette position externe permet aux testicules et aux épидидymes d'être exposés à une température optimale pour la production, la maturation et le stockage des spermatozoïdes (**Figure 18**). La surface cutanée du scrotum est riche en récepteurs cutanés thermiques connectés au système nerveux central. La stimulation de ces récepteurs par des variations de la température permet de provoquer des réponses à la fois locales et systémiques (Setchell and Mieusset, 1996). La loge scrotale permet de répondre par une action contractile impliquant deux muscles principaux. Le premier est le muscle dartos. Ce muscle lisse forme la muqueuse du scrotum et il est richement vascularisé. Les variations locales de température testiculaire provoquent une contraction/relaxation de ce muscle permettant ainsi de moduler le plissement de la peau scrotale et en conséquence, la surface d'échanges scrotum/environnement. Il a été montré que l'absence congénitale ou l'inactivation du muscle dartos pourrait provoquer une dérégulation de la température testiculaire et perturber la spermatogenèse (Ramelli et al., 2020; Shafik, 1978). Le deuxième muscle est le muscle crémaster. Il s'agit d'un muscle strié entourant le cordon spermatique et le testicule. L'activité contractile de ce muscle agit de manière synchrone avec le dartos (Sengul and Ertekin, 2020). La contraction de ce muscle en réponse à une baisse de la température permet de remonter les testicules vers le canal inguinal afin de permettre leur réchauffement. Enfin, un gradient constant de température

scrotale/corporelle centrale est maintenu par l'action contractile synchrone des muscles crémaster et dartos.

Outre l'activité musculaire de la loge scrotale, la surface cutanée du scrotum est très particulière. Ce tissu est très fin et est dépourvu d'une couche adipeuse hypodermique. De plus, il est très riche en glandes sudoripares apocrines qui sécrètent la sueur de manière pulsatile. La vasodilatation des vaisseaux contenus dans le dartos permet d'optimiser ce processus de sécrétion. Enfin, ces propriétés scrotales contribuent à la perte de chaleur, directement ou indirectement, par évaporation (Candas et al., 1993).

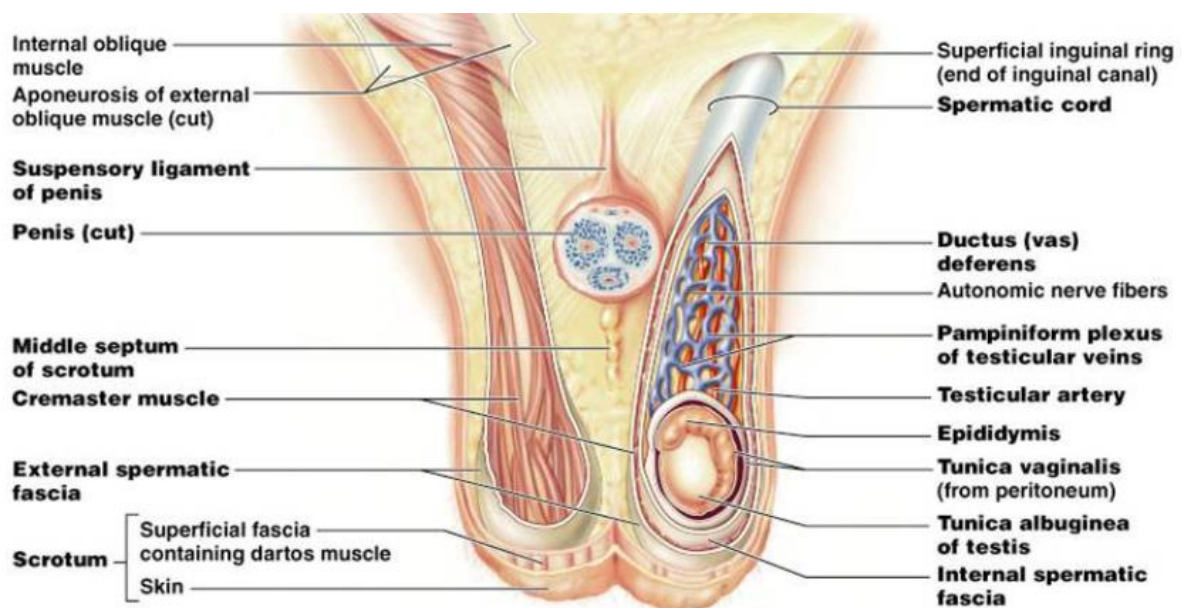


Figure 18. Anatomie de l'appareil reproducteur masculin et structures médiant la régulation thermique (source: www.austincc.edu)

b. Le plexus pampiniforme

Ce plexus est formé par les anastomoses des branches d'origine des veines testiculaires dans leur trajet ascendant autour de l'artère spermatique (**Figure 19**). Il s'agit d'un système d'échange de thermique à contre-courant. Le sang veineux testiculaire circule à la surface du testicule. La température du sang veineux s'équilibre avec celle de la muqueuse scrotale et dans le cordon spermatique, la température du sang circulant dans l'artère spermatique s'équilibre avec celle du sang veineux circulant dans le plexus pampiniforme. Ainsi, le sang arrivant des artères aux testicules est refroidi en traversant le plexus pampiniforme. Il passe de la température artérielle abdominale à la température testiculaire.

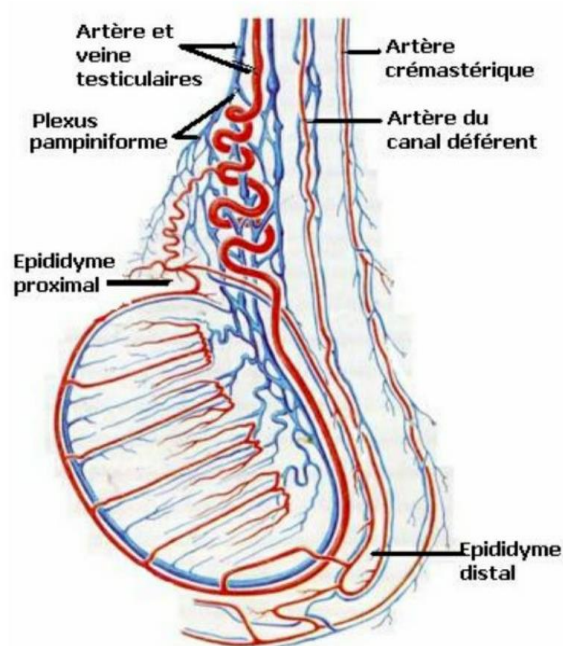


Figure 19. Vascularisation et innervation du testicule (Bailleul and Mauroy, 1991)

IV. La maturation épидидymaire du spermatozoïde

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes formés ne sont pas fonctionnels puisqu'ils ne sont ni motiles ni fécondants. Ces fonctions apparaissent et se développent lors du transit dans l'épididyme.

L'épididyme recouvre le testicule et relie les canaux efférents à la sortie du testicule. Il participe à la maturation et au stockage des spermatozoïdes. Il est composé de trois segments : proximal (tête), intermédiaire (corps) et distal (queue). L'épididyme devient pelotonné dans le corps et la queue puis se prolonge dans le canal déférent (**Figure 20**). La queue de l'épididyme permet le stockage des spermatozoïdes entre les éjaculations.

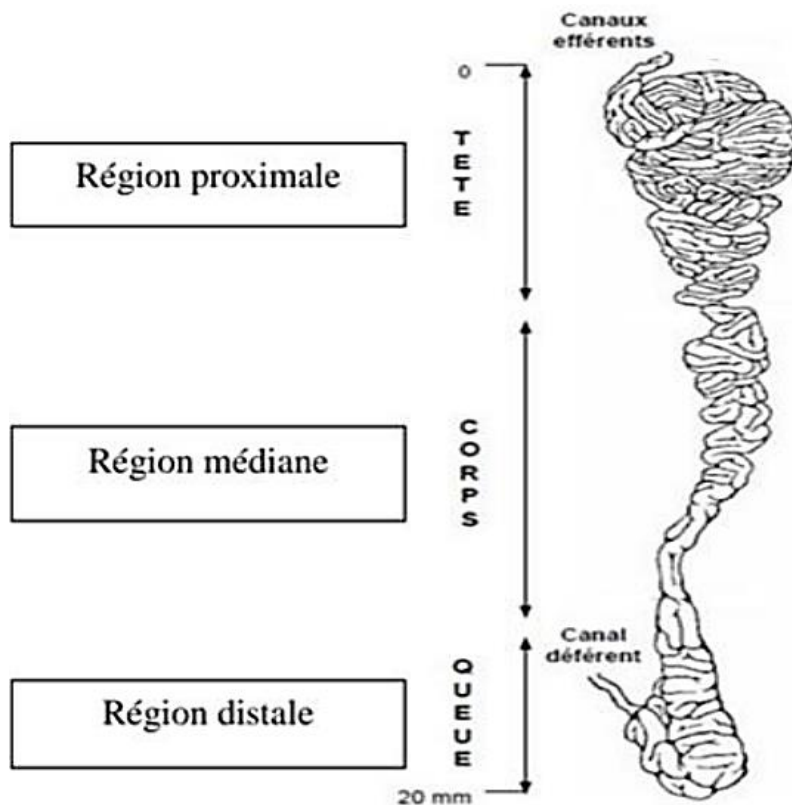


Figure 20. Anatomie de l'épididyme (Hermo and Robaire, 2002)

Les spermatozoïdes testiculaires sont motiles mais non progressifs mais le transit est possible grâce à l'écoulement du fluide testiculaire produit par les cellules de Sertoli et par l'action des cils présents dans les canaux efférents (Hoque et al., 2021). Lors du transit épидидymaire, qui dure entre 2 et 15 jours, les spermatozoïdes deviennent matures grâce à l'acquisition de la mobilité progressive sous l'influence des protéines épидидymaires, à la modification de la composition et de la structure en lipides et protéines de la membrane plasmique leur permettant l'acquisition d'un potentiel fécondant (Sullivan and Miesusset, 2016). La maturation finale des spermatozoïdes s'achève au cours de leur transit dans les voies génitales féminines.

Chapitre II. L'infertilité masculine

I. Définitions et données épidémiologiques

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité pour un couple de concevoir après au moins un an de rapports sexuels réguliers et non protégés (World Health Organization, 2021). L'infertilité est considérée comme un problème de santé publique majeur à travers le monde et touche entre 8 et 12% des couples en âge de procréer (Vander Borgh and Wyns, 2018). Dans environ 50% des cas, l'infertilité de couple est liée à un facteur féminin, dans 30% des cas à un facteur masculin et dans 20% des cas elle est mixte (Agarwal et al., 2015).

Selon l'Insee, en France et dans les pays occidentaux, l'âge moyen de procréation des femmes a augmenté progressivement comme le montre le graphique ci-dessous (**Figure 21**). En 2021 l'âge moyen de la mère à l'accouchement atteignait 30,9 ans soit près de deux ans de plus qu'en 1994. En 2010 déjà, l'Insee avait fait le même constat avec un âge moyen des femmes à leur premier enfant de 28 ans, soit quatre ans plus tard qu'à la fin des années 1960 (Davie, 2012). En France, l'âge paternel à la naissance a également augmenté, il était de 31,7 ans à la fin des années 40 et de 33,1 ans en 2013 (Mazuy et al., 2015). Une étude par des chercheurs de l'Université de Stanford aux Etats-Unis a également montré la même tendance avec une augmentation de l'âge paternel à la première naissance de 3 ans et demi plus élevé en 2015 qu'en 1972, passant ainsi de 27,4 ans à 30,9 ans (Khandwala et al., 2017).

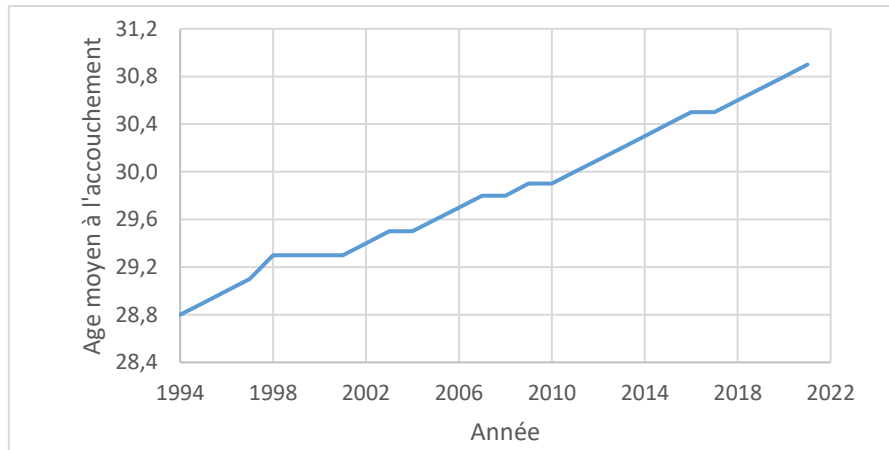


Figure 21. Âge moyen de la mère à l'accouchement (en France). Données annuelles de 1994 à 2021. En 2021, l'âge moyen de la mère à l'accouchement atteint 30,9 ans. Source : Insee, estimations de population et statistiques de l'état civil.

Avec l'âge, la fertilité diminue fortement pour la femme. En effet, le taux d'aneuploïdie des ovocytes augmente avec l'âge maternel. L'aneuploïdie survient dans plus de 50% des ovocytes des femmes de plus de 35 ans en raison du stress oxydatif et de l'accumulation des dommages à l'ADN, des changements épigénétiques et de l'exposition aux toxines environnementales. Ceci affecte la ségrégation chromosomique et de fait augmente le risque d'aneuploïdie et d'infertilité (**Figure 22**).

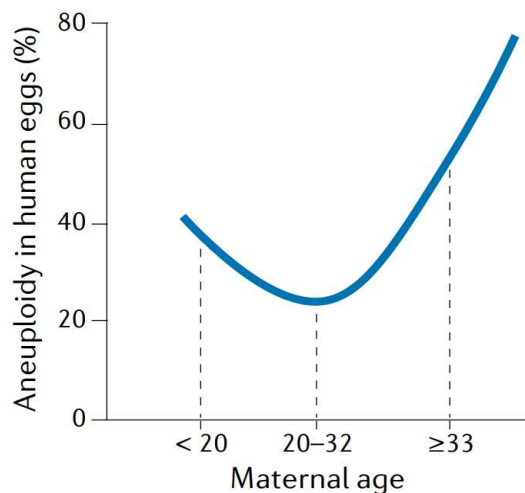


Figure 22. Augmentation du taux d'aneuploïdie dans les ovocytes humains avec l'âge maternel. Les taux d'erreurs de ségrégation sont plus élevés dans les ovocytes des femmes âgées de moins de 20 ans et de plus de 33 ans que dans ceux des femmes âgées de 20 à 32 ans. Tiré de la revue (Charalambous et al., 2023)

Les effets de l'âge sur la fertilité sont moins connus et moins étudiés chez l'homme. Pourtant plusieurs études récentes ont montré que l'augmentation de l'âge paternel avait de multiples effets négatifs sur la qualité du sperme et les fonctions testiculaires. Cela est dû à des

changements génétiques et épigénétiques associés (Sharma et al., 2015). L'augmentation de l'âge paternel est également corrélée à une diminution du taux de réussite des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) et une augmentation du risque de fausses couches et de naissances prématurées (du Fossé et al., 2020; Lu et al., 2022).

En 2018, une étude (de La Rochebrochard, 2018) a montré qu'un enfant sur trente en France était conçu grâce à une technique d'AMP. Selon cette étude la proportion d'enfants conçus par fécondation *in vitro* (FIV), qui représente la plus grosse part des techniques d'AMP (70%), progresse de 0,5 % tous les 7 à 8 ans (**Figure 23**). Ce recours à la FIV permet de répondre aussi bien aux infertilités d'origine féminines que masculines et ce grâce à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI). En effet, même pour certains patients atteints d'azoospermie, c'est-à-dire pour lesquels aucun spermatozoïde n'est éjaculé, des grossesses peuvent être obtenues par ICSI en utilisant des spermatozoïdes testiculaires prélevés chirurgicalement (Corona et al., 2019). En France, deux FIV sur trois sont réalisées par ICSI.

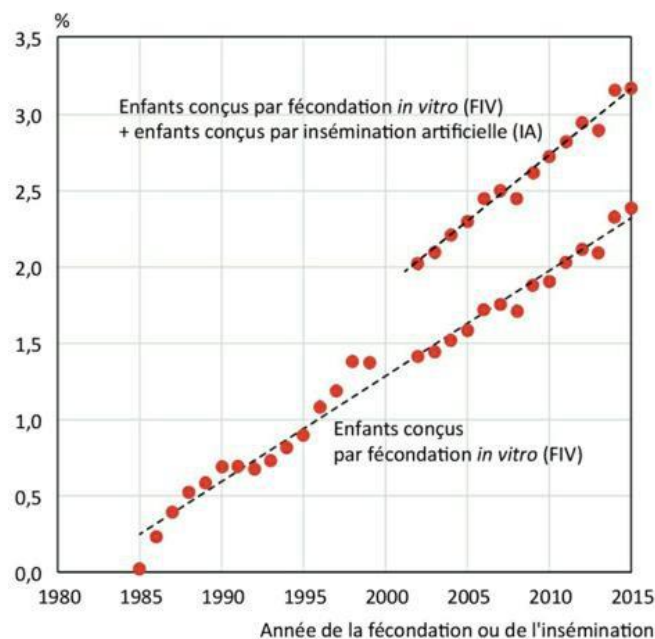


Figure 23. Évolution de la proportion d'enfants conçus par assistance médicale à la procréation en France. Source : Élise de La Rochebrochard, *Population & Sociétés* n° 556, INED, juin 2018.

Les infertilités d'origine masculine représentent plus de 50% des cas des infertilités de couples (Agarwal et al., 2015). Cette infertilité masculine est majoritairement associée à des anomalies spermatiques quantitatives ou qualitatives. Ces trente dernières années un déclin de la

fertilité masculine et de la qualité spermatique a été observé. En effet, dans une étude parue en 2022 sur les « tendances temporelles de la numération des spermatozoïdes », une baisse significative de la concentration des spermatozoïdes et de la numération totale a été mise en évidence (**Figure 24**) (Levine et al., 2022, 2017). Cette baisse de la numération spermatique est associée à une baisse de la testostérone et à une augmentation du risque cancer des testicules (Skakkebaek et al., 2022).

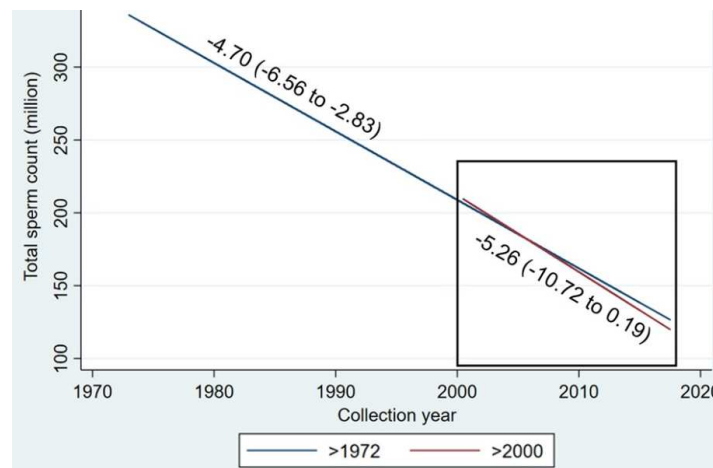


Figure 24. Déclin du nombre total des spermatozoïdes dans l'éjaculat d'hommes non sélectionnés de tous les continents, pour l'ensemble de la période de 1973 à 2019 et restreint aux études postérieures à 2000 (Levine et al., 2022).

II. Les causes de l'infertilité masculine

Les causes de l'infertilité masculine sont multiples (**Figure 25**), qu'elles soient environnementales, endocriniennes ou génétiques. Cependant dans plus de 30 % des cas d'infertilité masculine, sans infertilité féminine associée, aucune cause n'est identifiée (Olesen et al., 2017).

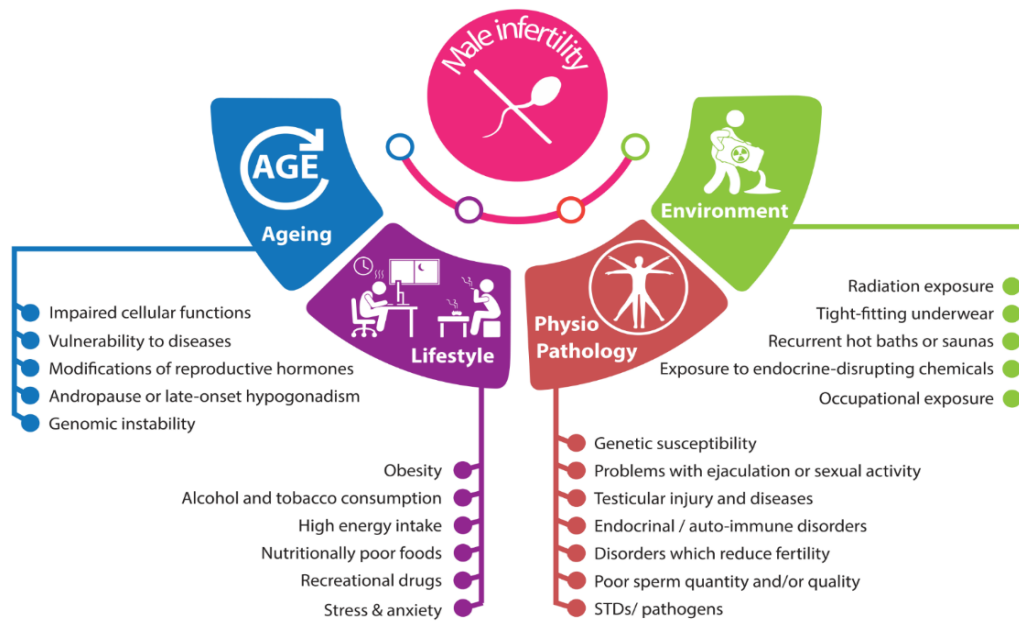


Figure 25. L'étiologie multifactorielle de l'infertilité masculine. D'après (Assidi, 2022)

Une production défectueuse des hormones de régulation de la spermatogenèse, pouvant être due à un dysfonctionnement de l'hypophyse ou à une absence de sécrétion de la GnRH, peut mener à un hypogonadisme hypogonadotrope. Une autre hormone hypophysaire mise en cause est la prolactine. Lorsque sa production est augmentée ($> 15 \mu\text{g/l}$ de sang) la sécrétion pulsatile de GnRH est inhibée ce qui conduit à une diminution des hormones hypophysaires gonadotropes. Chez les hommes atteints d'oligozoospermie, la prévalence de l'hyperprolactinémie est de 11% (De Rosa et al., 2003).

Ces troubles hormonaux peuvent être liés à l'exposition à des facteurs environnementaux tels que l'exposition à des polluants comme les perturbateurs endocriniens. Pour la majorité des facteurs environnementaux, les connaissances actuelles sont limitées à l'effet éventuel des expositions à l'âge adulte. En 2022 une étude a réalisé la première évaluation des risques des mélanges de 29 polluants du quotidien retrouvés en particulier dans l'eau et l'alimentation, basée sur les expositions européennes vis-à-vis de la fertilité masculine (Kortenkamp et al., 2022). Après avoir relevé les niveaux d'exposition acceptables de ces 29 substances chimiques et estimé l'exposition de la population à ces perturbateurs endocriniens, les chercheurs ont pu montrer que les bisphénols, les dioxines polychlorées, les phtalates et les analgésiques sont une cause de la détérioration de la qualité du sperme observée ces trente dernières années. Ces produits, bien que leur utilisation soit de plus en plus contrôlés persistent dans

l'environnement (Mima et al., 2018) et une fois dans l'organisme ils interfèrent avec la régulation du système endocrinien pouvant mener ensuite à une infertilité (Annamalai and Namasivayam, 2015). Cependant, pour certains facteurs environnementaux, quelques études concernent l'effet à long terme d'une exposition dans l'enfance ou pendant le développement fœtal qui pourraient être des périodes de sensibilité élevée aux polluants. En effet, une exposition prolongée à ces produits durant la vie fœtale pourrait mener à une cryptorchidie ou mauvais développement testiculaire pouvant mener à une infertilité à l'âge adulte (Juu et al., 2014).

En effet, les facteurs testiculaires tels que la varicocèle ou la cryptorchidie, peuvent être associés à l'infertilité masculine. La varicocèle est présente chez 35% des hommes infertiles (Alsaikhan et al., 2016). Elle est caractérisée par une dilatation des veines spermatiques. Bien que la façon dont cela altère la spermatogenèse est encore inconnu et controversé, cela peut s'expliquer, entre autres, par une augmentation de la température testiculaire et un stress oxydatif (Jensen et al., 2017). D'après une revue systématique de la littérature, le traitement répété avec des procédures radiologiques ou chirurgicales montrait de bons taux de succès de grossesse et des paramètres spermatiques améliorés (Fallara et al., 2022) mais était associé à un risque de complication élevé. Une autre revue systématique de la littérature et méta-analyse a mis en évidence que la réparation du varicocèle améliorait significativement les paramètres spermatiques chez les hommes infertiles (Agarwal et al., 2022).

La cryptorchidie est un défaut de la migration d'un ou des deux testicules qui touche 1 à 9% des garçons (Gurney et al., 2017). Si le ou les testicules ne descendent pas spontanément dans le scrotum et en l'absence de traitement chirurgical précoce, lors de la petite enfance, des complications peuvent survenir. En effet, à l'âge adulte les hommes peuvent présenter une infertilité, ce risque s'élève à 5% en cas de cryptorchidie unilatérale et jusqu'à 50% si elle est bilatérale (Goel et al., 2015). Un traitement chirurgical permet de réduire cette incidence de moitié (Chung and Brock, 2011; Virtanen and Toppari, 2015).

Il existe d'autres facteurs de risque de l'infertilité masculine liés au mode de vie (Homan et al., 2007) tels que l'obésité (Craig et al., 2017; Leisegang et al., 2021), la consommation de drogues (alcool, tabac et autres) (Dupont et al., 2019), la nutrition ou encore le stress qui pourraient avoir un impact sur la qualité et la quantité des gamètes.

III. L'exploration clinique et paraclinique de l'infertilité masculine

1. L'examen clinique

Dans un premier temps, un interrogatoire du patient a lieu afin de déterminer la cause de son infertilité. Les antécédents médicaux et chirurgicaux sont recherchés ainsi que les antécédents personnels et familiaux pouvant perturber la fonction testiculaire. Dans un second temps, le clinicien procède à un examen physique des organes génitaux externes. Ce bilan est ensuite complété par une analyse des paramètres spermatique (spermogramme et spermocytogramme) et d'autres investigations paracliniques (dosages hormonaux, imagerie, biochimie du liquide séminal...).

2. Le spermogramme

Le spermogramme est l'analyse des paramètres spermatiques. Le sperme est récupéré par masturbation après une période d'abstinence de 2 à 7 jours. Le sperme est ensuite analysé selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (World Health Organization, 2021).

L'OMS édite fréquemment ses recommandations et critères de normalité du sperme, l'édition la plus récente est la sixième de 2021 (Boitrelle et al., 2021; World Health Organization, 2021). L'analyse du sperme repose sur l'évaluation et la mesure de paramètres tels que : le volume de l'éjaculat, le pH ($\geq 7,2$), la viscosité, le pourcentage de vitalité des spermatozoïdes, leur concentration et leur numération dans l'éjaculat, leur mobilité, leur morphologie et enfin la numération des cellules rondes.

Les valeurs seuils définies par l'OMS sont résumées dans la **Table 1**.

Paramètres spermatiques	Valeurs seuils (OMS 2021)	Anomalies associées
Volume (ml)	1,4 (1,3 – 1,5)	< 1,4 ml : hypospermie > 6 ml : hyperspermie
Concentration de spermatozoïdes (millions/ml)	16 (15 – 18)	0 : azoospermie < : oligozoospermie
Numération totale (millions)	39 (35 – 40)	
Motilité totale (progressive et non progressive) (%)	42 (40 – 43)	< : asthénozoospermie 0 : akinétospermie
Motilité progressive (%)	30 (29 – 31)	
Motilité non progressive (%)	1	-
Immotilité (%)	20	-
Vitalité	54 (50 – 56)	< : nécrozoospermie
Forme typique, selon Kruger (%)	> 4 (3,9 – 4)	< : tératozoospermie

Table 1. Normes OMS 2021, (World Health Organization, 2021)

Ces normes établies par l'OMS permettent de différencier différents types d'anomalies responsables de l'infertilité masculine répertoriée dans la **table 1**. Ces anomalies peuvent être isolées ou associées à d'autres anomalies comme c'est le cas de l'oligo-asthéo-tératospermie (OATS).

3. Le spermocytogramme

La morphologie des spermatozoïdes est étudiée par le spermocytogramme. Deux classifications existent, la classification de Kruger et la classification de David modifiée. Lorsque cela est possible, l'analyse est réalisée sur cent spermatozoïdes. La classification de Kruger regroupe les anomalies de l'acrosome, de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle (**Figure 26**). Le spermatozoïde est considéré comme atypique lorsqu'il présente au moins une anomalie. Depuis 2010, la morphologie est considérée comme normale lorsqu'au moins 4% des spermatozoïdes sont typiques (World Health Organization, 2021).

La classification de David modifiée recense 7 anomalies de la tête (allongée, petite, grosse, multiples, acrosome anormal ou absent, base anormale), 3 anomalies de la pièce intermédiaire (reste de cytoplasme, mince, coudée) et 5 anomalies de la pièce principale (absente, petite, calibre irrégulier, enroulée, multiple). La morphologie du sperme est considérée comme normale lorsqu'au moins 15% des spermatozoïdes sont typiques selon cette classification (Auger et al., 2012).



Figure 26. Classement des différentes anomalies spermatisques (World Health Organization, 2021)

IV. L'exploration génétique de l'infertilité masculine

Pour les patients infertiles, présentant une altération sévère des paramètres spermatisques ne leur permettant pas de procréer naturellement, une prise en charge thérapeutique est possible dans certains cas grâce aux techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). En effet, le développement de la fécondation *in vitro* (FIV) assistée par micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte (ICSI) a permis de pallier à l'infertilité de nombreux couples (Palermo et al., 1992). Dans le cas des hommes atteints d'azoospermie non obstructive, il existe une option thérapeutique consistant à prélever chirurgicalement un fragment de parenchyme testiculaire afin d'en extraire des spermatozoïdes, cette technique est aussi appelée TESE (« *testicular sperm extraction* ») (Esteves et al., 2011) (Figure 27). Deux alternatives moins invasives à la biopsie existent, il s'agit de l'aspiration par aiguille (FNA : « *Fine Needle Aspiration* ») et de la micro-TESE (m-TESE). La FNA est une méthode certes moins invasive mais présente des taux de récupération de spermatozoïdes significativement plus faibles que la TESE (Tournaye, 1999). La m-TESE quant à elle est une méthode d'extraction des spermatozoïdes par microdissection. L'utilisation d'un microscope permet de repérer les

tubes séminifères les plus à mêmes de contenir des spermatozoïdes (Schlegel, 1999). Ainsi, le prélèvement des plus gros tubes séminifères où sont présents les spermatozoïdes permet de réduire significativement la quantité de tissu testiculaire à prélever en minimisant de fait les dommages testiculaires (Esteves, 2015). Enfin, une autre variante de la m-TESE, simplifiée, à l'aide de loupe à faible grossissement (x6) a été pratiquée chez 1050 patients et a permis d'augmenter significativement le taux de récupération des spermatozoïdes (Bouker et al., 2019). L'utilisation de la loupe procure un bon compromis coût-efficacité de la procédure.

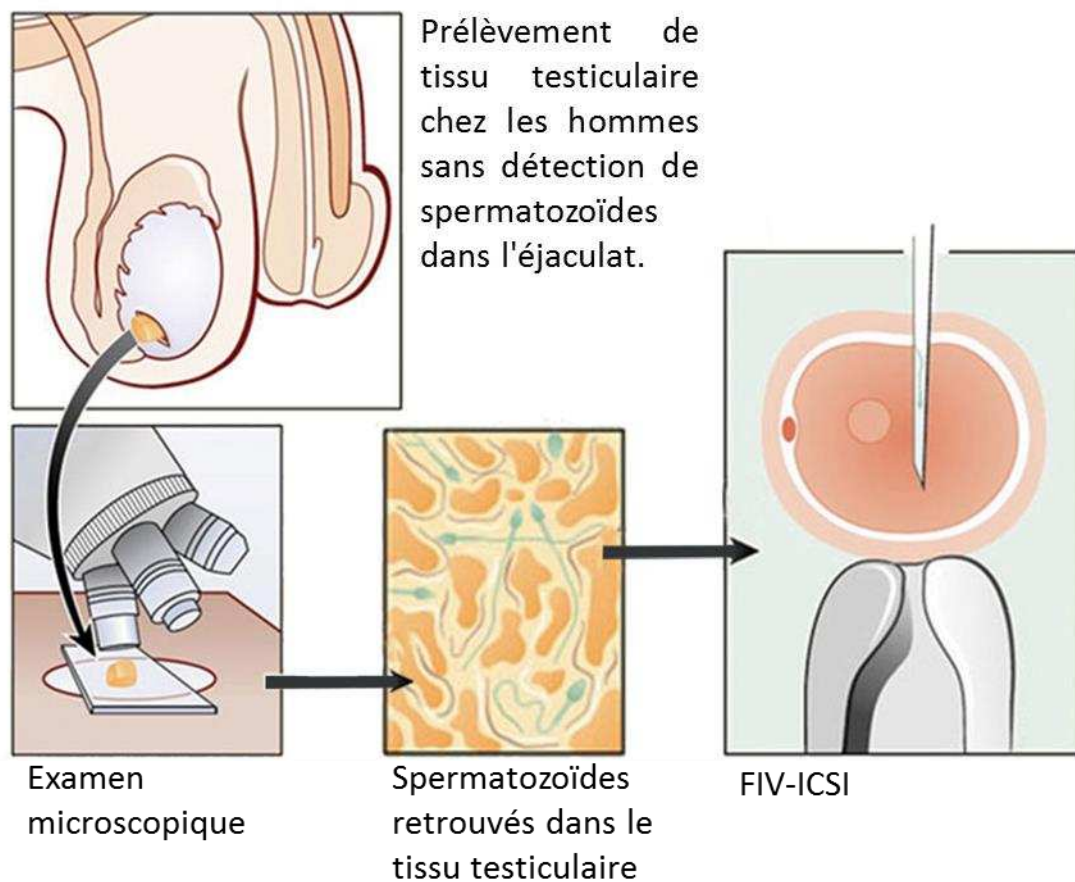


Figure 27. TESE (Testicular Sperm Extraction) (Source: kinderwunschzentrum-offenbach.de)

La mise au point de ces techniques a soulevé des inquiétudes quant au risque de transmission des défauts génétiques aux enfants. C'est pourquoi la recherche sur les causes génétiques de l'infertilité masculine et leur impact s'est d'autant plus développée. De plus, l'utilisation de tests génétiques pour explorer l'infertilité masculine permet d'émettre un diagnostic précis et d'optimiser la prise en charge des patients.

1. L'hétérogénéité de la composante génétique de l'infertilité masculine

La spermatogenèse est un processus très complexe faisant intervenir plusieurs centaines de gènes. Il existe plus de 2274 gènes surexprimés dans le testicule dont 474 spécifiquement exprimés dans le testicule (Uhlén et al., 2015) (**Figure 28**) et de nombreuses lignées de souris *knockout* (KO) (~600) produites se sont avérées infertiles (Jiao et al., 2021; Matzuk and Lamb, 2008). Cela montre l'importance de la composante génétique dans les troubles de la spermatogenèse. Il est donc possible que la majorité des cas d'infertilité idiopathiques soit d'origine monogénique.

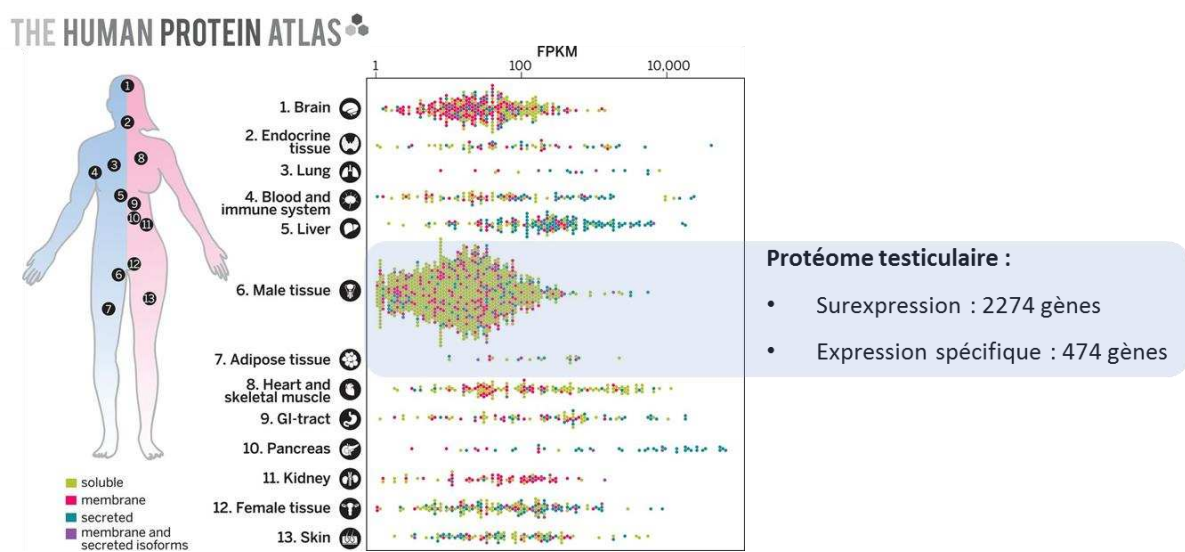


Figure 28. Représentation graphique des protéines enrichies dans les tissus humains. Le testicule présente un nombre important de gènes surexprimés ou spécifiques. D'après (Uhlén et al., 2015)

2. L'exploration génétique des anomalies de la numération spermatique

Parmi les altérations de la numération spermatique, on distingue les oligozoospermies lorsque la concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat est inférieure au seuil de référence défini par l'OMS et les azoospermies. L'azoospermie est définie comme l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat et concerne environ 1% des hommes dans la population générale et 10% des cas d'infertilité masculine (Tournaye et al., 2017). On distingue l'azoospermie obstructive (AO) aussi appelée excrétoire et l'azoospermie non-obstructive (ANO) aussi appelée sécrétoire.

La conduite à tenir pour l'exploration génétique des anomalies de la numération spermatique est résumée par l'organigramme ci-dessous (**Figure 29**).

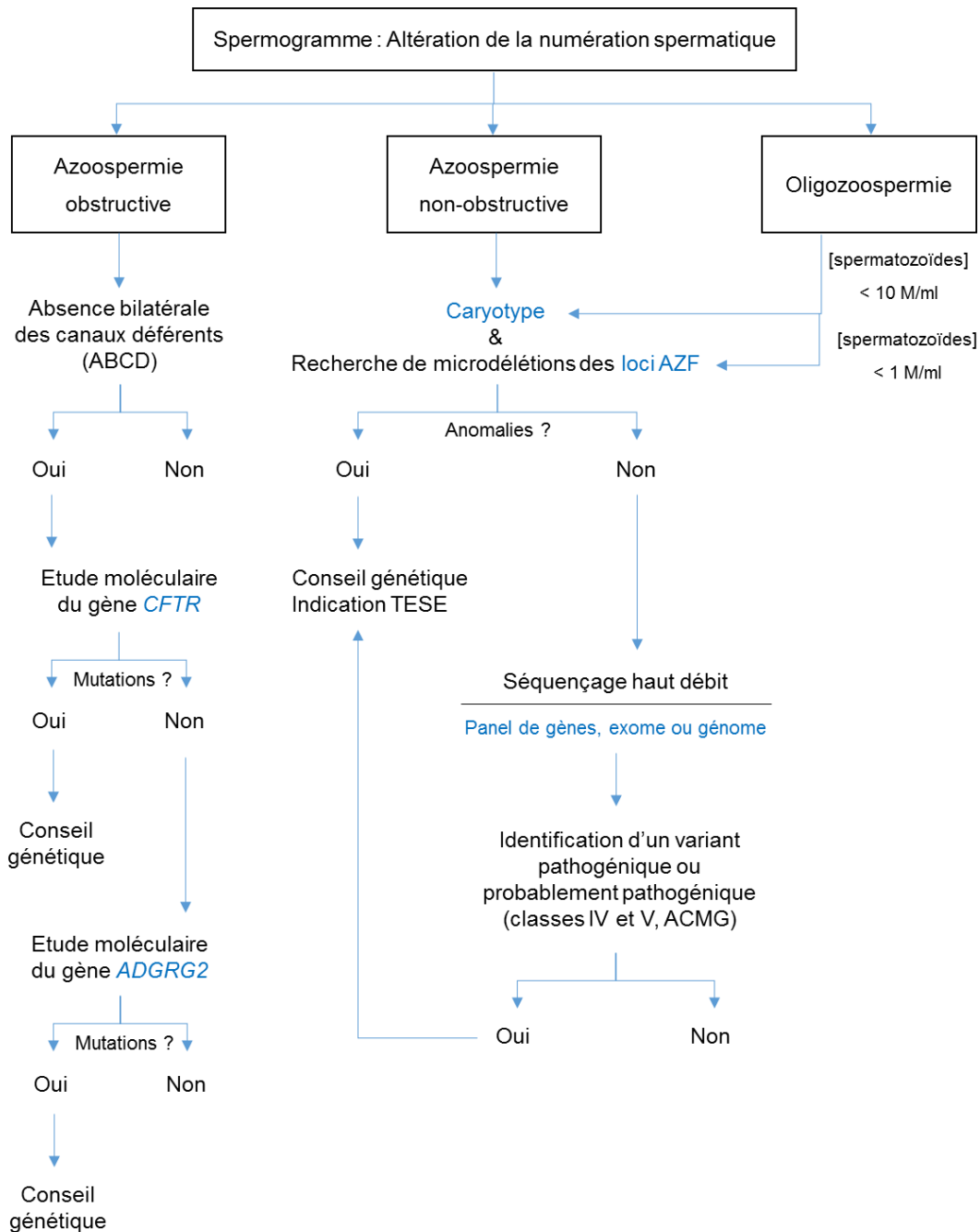


Figure 29. Arbre décisionnel pour conduire l'exploration génétique des azoospermies obstructives et non-obstructives. (Kherraf, Ray, JBM, 2023)

a. L'azoospermie non obstructive (ANO)

Contrairement à la plupart des autres anomalies du sperme qui peuvent être traitées par des techniques d'AMP utilisant la FIV-ICSI, l'ANO est souvent impossible à traiter puisqu'elle est majoritairement due à des anomalies de la spermatogenèse. Cependant, lorsque la

spermatogenèse n'est pas complètement abolie, l'ICSI peut toutefois être envisagée après une biopsie testiculaire (TESE) ou épидидymaire (détaillé précédemment). Le taux d'extraction moyen de spermatozoïdes est de 47% chez les patients avec ANO (Corona et al., 2019), la difficulté est qu'il n'existe aucun marqueur prédictif fiable de la probabilité de récupération des spermatozoïdes.

L'ANO peut être due à une insuffisance testiculaire primaire ou secondaire et est la cause d'infertilité masculine la plus sévère. On distingue quatre groupes d'histologie testiculaire liés à ce phénotype : le syndrome des cellules de Sertoli seules (SCOS : *Sertoli Cell Only Syndrome*), les arrêts de maturation (pré méiotique, méiotique et post-méiotique), l'hypospermatogenèse et la dégénérescence testiculaire (**Figure 30**) (Cioppi et al., 2021). Un même individu peut présenter un phénotype mixte (Robin et al., 2010). Les phénotypes les plus sévères sont le SCOS et les arrêts de maturation pré-méiotiques et méiotiques. En effet, pour les patients présentant ces phénotypes, aucun spermatozoïde testiculaire ne peut être récupéré en vue d'une ICSI.

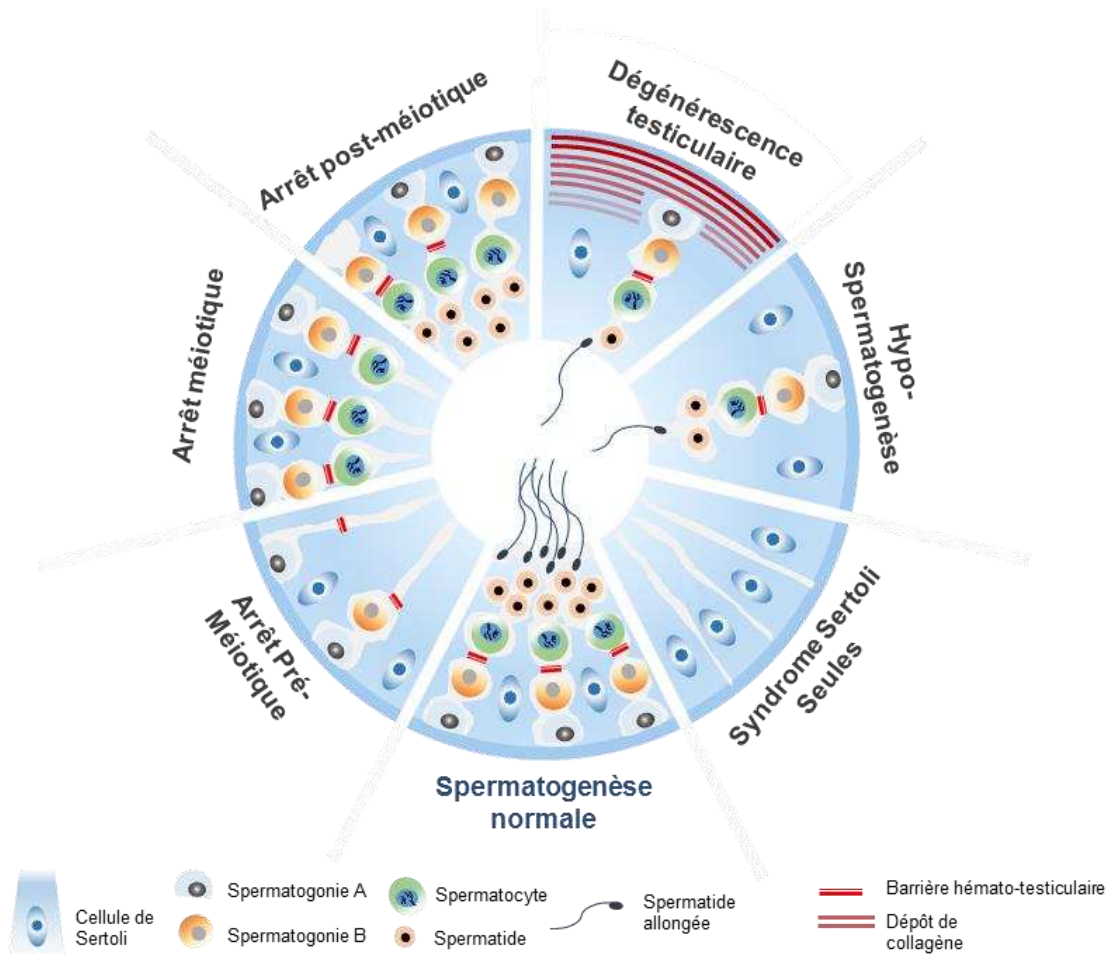


Figure 30. Groupes d'histologie testiculaires liés à l'ANO. Adapté de (Kherraf et al., 2022a)

Comme évoqué précédemment des affections acquises peuvent entraîner une azoospermie dans 35 à 40% des cas (Cioppi et al., 2021). Les facteurs génétiques représentent cependant une cause majeure de l'ANO. En effet, en routine clinique, les anomalies du caryotype et les microdélétions du chromosome Y sont recherchées systématiquement chez les patients atteints d'ANO. De plus, de nombreuses nouvelles causes monogéniques ont été identifiées par séquençage de l'exome entier (détaillé ci-après).

Les anomalies du caryotype

Parmi les causes de l'ANO, on peut distinguer des anomalies de nombre (aneuploïdies) et de structure des chromosomes autosomaux et des gonosomes.

L'analyse du caryotype correspond à l'étude numérique et structurale des chromosomes. L'infertilité peut être déterminée par une anomalie du caryotype de nombre (ex. Syndrome de Klinefelter 47,XXY) ou de structure (translocations équilibrées, sans perte ni gain de

matériel génétique) des autosomes mais surtout des gonosomes. Chez les patients infertiles et particulièrement chez les patients azoospermes, le pourcentage d'anomalies chromosomiques observées sur le caryotype est de l'ordre de 2 à 14 % (Harton and Tempest, 2012).

Le syndrome de Klinefelter

Le syndrome de Klinefelter, 47,XXY est la cause la plus fréquente d'infertilité chez l'homme caractérisée par la présence d'un chromosome X surnuméraire, décrit par Harry F. Klinefelter en 1942 (Klinefelter et al., 1942). La prévalence de ce syndrome chez les garçons est de 1/600 (Bearely and Oates, 2019) mais cela est difficile à déterminer car on estime que deux tiers des sujets atteints ne sont jamais diagnostiqués (Lanfranco et al., 2004). Ce syndrome est la cause de l'infertilité d'environ 10% des hommes atteints d'azoospermie et représente jusqu'à 2 % de l'infertilité dans la population masculine générale (Bearely and Oates, 2019). Cette anomalie chromosomique de nombre est plus fréquente avec l'augmentation de l'âge maternel. Cela est dû à une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la méiose, il s'agit de la forme homogène, majoritaire, c'est-à-dire qui touche toutes les cellules (Bonomi et al., 2017). Dans 10 à 20% des cas, cette anomalie se produit lors du processus de mitose après la fécondation, résultant en une anomalie en mosaïque (Maiburg et al., 2012) présentant ainsi des conséquences moindres. A la puberté, une gynécomastie et un hypogonadisme hypergonadotrope peuvent survenir. Les hommes porteurs de ce syndrome sont infertiles et présentent une ANO. On observe une atteinte des compartiments séminifères et interstitiels affectant la spermatogenèse et la fonction endocrine des cellules de Leydig respectivement. Cependant l'atteinte testiculaire dépend de la proportion de cellules 47,XXY et de leur localisation, particulièrement au niveau des gonades. En effet, dans les cas où il existe une mosaïque, la spermatogenèse peut avoir lieu dans certains tubes séminifères et les spermatozoïdes testiculaires peuvent être extraits par m-TESE et utilisés pour réaliser une ICSI, c'est pourquoi le diagnostic de ces mosaïques est très important car il conditionne en partie les chances de succès des biopsies testiculaires qui peuvent être proposées aux patients (Plotton et al., 2022).

Les autres anomalies

D'autres aneuploïdies responsables d'ANO existent. En effet, il existe des hommes porteurs d'une anomalie rare du développement sexuel associée à un caryotype 46,XX, aussi appelé

Syndrome de la Chapelle, cela touche 1 garçon sur 20000 (Délot and Vilain, 1993). Les organes génitaux externes sont normaux lorsqu'il y a présence du gène *SRY* sur un chromosome X (80-90 % des cas). Cependant, les testicules ont un volume réduit (< 5 ml). Dans le cas où le gène *SRY* n'est pas présent, des variants de *SOX3*, *SOX9*, *NR5A1* ou *WT1* sont retrouvés et les patients présentent un hypospadias et des testicules non descendus (Knarston et al., 2019; Sirokha et al., 2021; Vetro et al., 2015).

On distingue également la dysgénésie gonadique mixte associée à la mosaïque 45,X/46,XY (Cools et al., 2018). Les sujets atteints présentent un tableau clinique variable, le plus souvent le développement testiculaire est asymétrique. Les patients peuvent avoir une cryptorchidie, un hypospadias et une dysgénésie testiculaire responsable d'une insuffisance en testostérone.

Les anomalies de structure

On distingue plusieurs types d'anomalies de structure des chromosomes mais les plus connues et les plus fréquentes étant les translocations Robertsoniennes et les translocations réciproques équilibrées.

La translocation Robertsonienne est une anomalie de structure caractérisée par la fusion de deux chromosomes acrocentriques c'est-à-dire avec un bras court très petit et un centromère distal, il s'agit des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. Ces translocations représentent 1 naissance pour 1000 et sont responsables de la plupart des trisomies 13 et 21 dues à une ségrégation anormale lors du processus de méiose (Harrison and Schwab, 2016).

Les translocations réciproques quant à elles, touchent tous les chromosomes et sont caractérisées par des échanges de segments entre deux chromosomes (Kuroda et al., 2020). Elles représentent 1,2 naissance pour 1000.

Les microdélétions du chromosome Y

L'existence de facteurs AZF (*Azoospermia Factor*) a été mise en évidence en 1976 (Tiepolo and Zuffardi, 1976) à partir de six hommes azoospermes porteurs de chromosomes Y dépourvus de leur zone hétérochromatique distale du bras long et d'une partie de la région euchromatique. Il a été établi que 5 à 10% des azoospermies non-obstructives ou oligospermies sévères (concentration en spermatozoïdes inférieure à 1millions/ml) sont associées à des microdélétions du chromosome Y sur le bras long au locus AZF (Krausz and

Casamonti, 2017). On distingue trois locus nommés AZFa (Yq11.22), AZFb et AZFc (Yq11.23) (Vogt et al., 1996). Le locus AZFb s'étend sur 3.2Mb et chevauche AZFc de 1.5Mb (**Figure 31**).

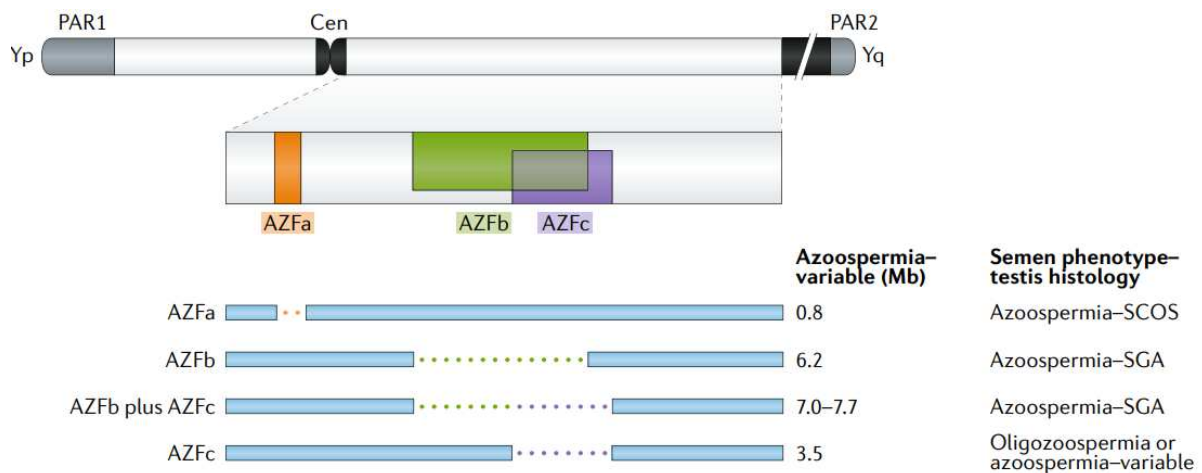


Figure 31. Différents types de micro délétions AZF (Krausz and Riera-Escamilla, 2018)

Le chromosome Y humain a une structure riche en séquences répétées propices à des recombinaisons homologues non alléliques à l'origine de ces microdélétions. Les microdélétions AZFa sont dues à des recombinaisons entre des séquences rétrovirales flanquantes et les microdélétions AZFb et AZFc, plus fréquentes, sont dues à des recombinaisons entre bras palindromiques. Les délétions de la région AZFc représentent 80% des délétions, celles de la région AZFa sont retrouvées dans 0,5% à 4% des cas et celles de l'AZFb dans 1 à 5% tandis que les délétions conjointes des régions AZFb et AZFc représentent 1 à 3 % des cas (Krausz and Casamonti, 2017). Les microdélétions complètes de la région AZFa ont pour conséquence une absence de cellules germinales associée à un SCOS. Ce diagnostic implique donc la quasi-impossibilité de récupérer des spermatozoïdes testiculaires pour une ICSI. Les délétions complètes du locus AZFb résultent en un blocage méiotique des cellules germinales. En effet, cette région génomique est nécessaire au bon déroulement de la méiose, la probabilité de récupérer des spermatozoïdes matures en vue d'une ICSI est très faible chez ces patients. Dans le cas des patients présentant des délétions complètes AZFa et AZFb, l'extraction de spermatozoïdes testiculaires n'est pas recommandée. Cependant, dans le cas des microdélétions complètes du locus AZFc, les phénotypes spermatiques sont très variables allant d'une oligozoospermie sévère à une azoospermie. Chez les patients azoospermes, des spermatozoïdes sont retrouvés après m-TESE dans 50-60% des cas (Flannigan and Schlegel, 2017) dans les testicules des hommes porteurs de ce type de délétion et utilisables en FIV.

Les causes monogéniques, exploration par séquençage haut-débit

Dans environ 70% des cas, les ANO sont idiopathiques, c'est-à-dire d'étiologie inconnue. La découverte de défauts monogéniques est en constante augmentation mais leur dépistage n'est pas introduit dans le circuit diagnostique. En effet, le développement récent du séquençage à haut débit (*HTS, High Throughput Sequencing*) (détaillé en Partie 2, Chapitre I) et particulièrement du séquençage de l'exome entier (*WES, Whole Exome Sequencing*) et l'étude des cas familiaux a augmenté le nombre de gènes candidats et mutations causales de l'ANO mettant en évidence une forte hétérogénéité génétique. Par exemple, le gène *SPINK2* a pu être identifié comme cause d'un arrêt post-méiotique chez deux frères consanguins présentant une ANO (Kherraf et al., 2017, p. 2) et une étude d'une cohorte de 147 individus présentant une ANO a permis d'identifier 5 gènes causaux d'arrêt de maturation chez 23 patients (Krausz et al., 2020).

Chez l'homme, des variants dans 71 gènes ont été identifiés par WES comme étant impliqués dans le phénotype d'ANO (**Table 2**) et seule une vingtaine d'entre eux sont considérés comme probablement pathogéniques ou pathogéniques selon la classification de l'ACMG (« *American College of Medical Genetics and Genomics* ») qui permet de classer les variants selon leur niveau de pathogénicité (classe 1, bénin à 5, pathogène, **Table supplémentaire 1**) (Richards et al., 2015). Les variants dans ces gènes sont responsables soit d'une forme d'ANO isolée soit de formes syndromiques plus complexes. Compte tenu du fait qu'il s'agit d'un phénotype rare et sévère d'infertilité masculine, les gènes candidats suivent très souvent un mode de transmission autosomique récessif à l'exception de certains d'entre eux liés à l'X tels *que AR, GCNA, MAGEB4, NROB1, TEX11, USP26, WNK3* ou à l'Y tel que *USP9Y* ou qui suivent un mode de transmission autosomique dominant tels que *DMRT1, KLHL10, NANOS1, NR5A1, PLK4, SOHLH1, SYCP3* associés à des phénotypes plus complexes. A ce jour, le sous phénotype d'arrêt méiotique est celui dans lequel le plus de gènes ont été décrits (Ghieh et al., 2022; Kherraf et al., 2022a; Krausz et al., 2020), tels que *HSF2, MCMDC2, MEI1, MEIOB, MSH4, MSH5, PSMC3IP, REC8, RNF212, SPATA22, SPO11, SYCE1, STAG3, TDRD9, TDRKH, TEX11, TEX14, TEX15...*

Comme expliqué précédemment, la procédure de TESE pour récupérer des spermatozoïdes est un succès dans 45% des cas d'ANO. En effet, selon le sous phénotype, il arrive que quelques tubes séminifères contiennent des spermatides ou stades ultérieurs. C'est pourquoi des

équipes cherchent à établir une corrélation génotype/phénotype afin d'éviter une procédure invasive, coûteuse et inutile aux patients avec une ANO liée à un phénotype associé à de très faibles chances de récupérer des spermatozoïdes par TESE (Kherraf et al., 2022a; Oud et al., 2019).

Gène	Nom Complet	Locus	OMIM phénotype	Transmission	modèle murin	Fonction	Références
ADAD2	Adenosine Deaminase Domain Containing 2	16q24.1	/	AR	Azoospermie, arrêt pré-méiotique PMID: 32665638	Liaison à l'ARN et activité adénosine désaminase	(Krausz et al., 2020)
AHRR	Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor	5p15.33	/	AR	/	Inhibe la voie AHR	(Merisalu et al., 2007; Watanabe et al., 2004)
AR	Androgen Receptor	Xq12	Insensibilité partielle aux androgènes ; OMIM:312300/300633	XL	Azoospermie, arrêt méiotique PMID: 12370412	Facteur de transcription activé par les hormones stéroïdes	(Mobasseri et al., 2018)
ATM	ATM serine/threonine kinase	11q22.3	/	AR (OMIM: 607585)	Azoospermie, arrêt méiotique	Réparation de l'ADN et impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire	(Barlow et al., 1998; Xu et al., 1996)
BRDT	Bromodomain testis associated	1p22.1	Echec de spermatogénèse ; OMIM : 617644	AR	Azoospermie, arrêt méiotique	Agit à la prophase de méiose I pendant la spermatogénèse	(Chen et al., 2020)
C14orf39	Chromosome 14 open reading frame 39	14q23.1	Echec de spermatogénèse ; OMIM : 619202	AR	Azoospermie, arrêt méiotique	Élément central du complexe synaptonémal (essentiel au synapsis)	(Fan et al., 2021; Gómez-H et al., 2016)
CHD5	Chromodomain helicase DNA binding protein 5	1p36.31	Syndrome neuro-développemental Parenti-Mignot ; OMIM : 619873	AR	/	Impliqué dans la spermiogénèse précoce, régulateur du processus de remodelage de la chromatine histone-protamine.	(Chen et al., 2020)
DDX3Y	DEAD-box helicase 3 Y-linked	Yq11.221	/	AR	/	Liaison et hydrolyse de l'ATP, liaison de l'ARN et formation d'interactions intramoléculaires.	(Foresta et al., 2000)
DDX25	DEAD-box helicase 25	11q24.2	/	AR	Arrêt spermiogénèse au stade spermatide ronde	Initiation de la traduction, épissage	(Kherraf et al., 2022a; Tsai-

							Morris et al., 2004)
DMC1	DNA meiotic recombinase 1	22q13.1	/	AR	Azoospermie, arrêt méiotique (Pittman et al., 1998)	Essentiel pour la recombinaison homologue	(He et al., 2018)
DMRT1	Double sex and mab-3-related transcription factor 1	9p24.3	NOA; OMIM:NA (PS258150)	AD	Hypoplasie testiculaire sévère	Détermination et différenciation du sexe masculin	(Krausz et al., 2020; Tewes et al., 2014)
E2F1	E2F transcription factor 1	20q11.22	/	AR	Atrophie testiculaire due à un défaut de la spermatogenèse, dépendant de l'âge. (Yamasaki et al., 1996)	Control of the cell cycle	(Jorgez et al., 2015)
FANCA	FA complementation group A	16q24.3	Fanconi anemia, complementation group A; OMIM : 227650	AR	Augmentation de l'apoptose dans les cellules germinales et arrêt méiose (Wong et al., 2003)	Réparation de croisement interbrin	(Krausz et al., 2019)
FANCM	FA complementation group M	14q21.2	Echec de spermatogénèse; OMIM : 618086	AR (OMIM: 609644)	SCOS et arrêt de maturation méiotique (Bakker et al., 2009)	Réparation de cassures doubles brins	(Kasak et al., 2018; Yuxiang Zhang et al., 2021)
FSHR	Follicle stimulating hormone receptor	2p16.3	Hypergonadotropic hypogonadism; OMIM:NA (PS147950)	AR	Souris KO fertile, petit testis	Initiation de la spermatogenèse à la puberté et maintien d'une production de spermatozoïde normale	(Tapanainen et al., 1997)
GCNA	Germ cell nuclear acidic peptidase	Xq13.1	Echec de spermatogénèse; OMIM : 301077	XL (OMIM: 300369)	Domages ADN, condensation chromosomique anormale dans les spermatocytes.	Rôle majeur dans la réparation de l'ADN et maintien de l'intégrité du génome.	(Arafat et al., 2021; Hardy et al., 2021; Kherraf et al., 2022a)

GTF2H3	General transcription factor IIH subunit 3	12q24.31	/	AR	/	Essentiel pour la spermatogenèse	(Clavijo et al., 2018, p. 2)
HENMT1	Hen methyltransferase 1	1p13.3	/	AR	Infertilité mâle	Impliqué dans la méthylation de l'ARN	(Kherraf et al., 2022a; Lim et al., 2015)
HFM1	Helicase for meiosis 1	1p22.2	/	AR	Infertilité mâle et femelle, blocage spermatogenèse et ovogenèse	Formation des crossovers et synapsis	(Kherraf et al., 2022a; Saebnia et al., 2022, p. 1; Tang et al., 2021, 2023; X. Xie et al., 2022, p. 1)
HSF2	Heat-shock transcription factor 2	6q22.31	/	AR	Défauts méiose et gamétogenèse. Complexes synaptonémaux malformés.	Active les gènes de réponse aux chocs thermiques dans des conditions de chaleur ou d'autres stress.	(Mou et al., 2013, p. 2)
KASH5	Kash domain containing protein 5	19q13.33	/	AR	Arrêt méiotique et forte apoptose des cellules germinales	A dynein-binding protein of the outer nuclear membrane that forms a meiotic complex with Sun1	(Fakhro et al., 2018; Wu et al., 2022)

<i>KLHL10</i>	Kelch Like 10	17q21.2	Echec de spermatogenèse ; OMIM : 615081	AD	Souris hétérozygotes : Arrêt post méiotique (haplo insuffisance) (Yan et al., 2004)	Spécifique des spermatides	(Araujo et al., 2020)
<i>LHB</i>	Luteinizing Hormone Beta polypeptide	19q13.33	Hypogonadisme hypogonadotrope; OMIM : 228300	AR	Hypogonadisme hypogonadotrope associé à un arrêt post méiotique au stade spermatide ronde. (Ma et al., 2004)	Progression de la spermatogenèse	(Ma et al., 2004; Valdes- Socin et al., 2004)
<i>M1AP</i>	Meiosis 1-associated protein	2p13.1	Echec de spermatogenèse ; OMIM : 619108	AR	Arrêt méiotique.	Progression de la méiose I	(Gerlevik et al., 2022; Wyrwoll et al., 2020)
<i>MAGEB4</i>	Melanoma antigen, family B4	Xp21.2	/	XL (OMIM: 300153)	/	Attachement des télomères méiotiques à la membrane interne du noyau pendant l'appariement homologue et la synapse	(Okutman et al., 2017, p. 4)
<i>MAJIN</i>	Membrane-anchored junction protein	11q13.1	/	AR (OMIM: 617130)	Synapsis incomplète et arrêt méiotique	Impliqué dans l'attachement des télomères méiotiques à la membrane interne du noyau	(Salas-Huetos et al., 2021)
<i>MCM8</i>	Minichromosome maintenance complex component 8	20p12.3	/	AR	Hypogonadisme hypogonadotrope associé à un arrêt post méiotique au stade spermatide ronde	Réparation des cassures double brin, élimination de croisement inter-brin	(AlAsiri et al., 2015)

<i>MCM9</i>	Minichromosome maintenance complex component 9	6q22.31	/	AR	Souris subfertile	Initiation de la réplication du génome	(Chen et al., 2020)
<i>MCMDC2</i>	Minichromosome maintenance domain containing 2	8q13.1	/	AR	Infertilité mâle et femelle, arrêt spermatogénèse et ovogénèse	Impliqué dans la réparation des cassures double brins	(Kherraf et al., 2022a)
<i>MEI1</i>	Meiotic double-stranded break formation protein 1	22q13.2	/	AR (OMIM: 608797)	Arrêt méiotique	Synapsis chromosomique méiotique, formation de cassures doubles brins	(Ben Khelifa et al., 2018; Krausz et al., 2020)
<i>MEIOB</i>	Meiosis-specific protein with ob domains	16p13.3	Echec de la spermatogénèse, OMIM : 617706	AR (OMIM : 617670)	Arrêt méiotique	Requis pour la réparation de cassures doubles brins et formation de crossing-over	(Gershoni et al., 2019, 2017)
<i>MLH3</i>	MutL homolog 3	14q24.3	/	AR	Arrêt méiotique	Maintien de l'intégrité du génome pendant la réplication de l'ADN	(Chen et al., 2020)
<i>MSH4</i>	MutS homolog 4	1p31.1	Echec de la spermatogénèse, OMIM : 108420	AR (OMIM : 602105)	Arrêt méiotique	Recombinaison des chromosomes homologues et ségrégation pendant la méiose I	(Krausz et al., 2020; Tang et al., 2020; Wyrwoll et al., 2021)

<i>MSH5</i>	MutS homolog 5	6p21.33	Echec de la spermatogénèse, OMIM : 619937	AR (OMIM : 603382)	Arrêt méiotique	Impliqué dans la recombinaison méiotique	(Chen et al., 2022; Gong et al., 2022; Kherraf et al., 2022a; Wyrwoll et al., 2021)
<i>NANOS1</i>	Nanos c2hc-type zinc finger 1	10q26.11	Echec de la spermatogénèse, OMIM : 608226	AD	/	Répresseur post transcriptionnel régulateur de la traduction	(Kusz-Zamelczyk et al., 2013, p. 1)
<i>NANOS2</i>	Nanos c2hc-type zinc finger 2	19q13.32	/	AR	SCOS	Maintien du pool de cellules souches spermatogoniales	(Fakhro et al., 2018)
<i>NLRP3</i>	Nlr family, pyrin domain-containing 3	1q44	Muckle-Wells syndrome, OMIM : 191900	AR	/	Immunité innée et inflammation	(Tran et al., 2012)
<i>NPAS2</i>	Neuronal pas domain protein 2	2q11.2	/	AR (OMIM : 603347)	/	Rôle dans le rythme circadien et acquisition de mémoire spécifique	(Ramamany et al., 2015, p. 2)
<i>NROB1</i>	Nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1	Xp21.2	CHH, OMIM : 300200	XLR (OMIM: 300473)	/	Récepteur nucléaire régulateur de transcription	(Frapsauce et al., 2011; Hodžić et al., 2021; Mantovani et al., 2006; Mou et al., 2015)
<i>NR5A1</i>	Nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1	9q33.3	Echec spermatogénèse, OMIM : 613957	AD (OMIM : 184757)	/	Activateur transcriptionnel pour la détermination du sexe	(An et al., 2021; Rocca et al., 2020)

PDHA2	Pyruvate dehydrogenase, alpha-2	4q22.3	Echec de la spermatogenèse, OMIM:619828	AR (OMIM : 179061)	/	Spécifique du testicule et exprimé dans les cellules post méiotiques de la spermatogenèse	(Datta et al., 1999; Yildirim et al., 2018)
PIWIL2	Piwi-like rna-mediated gene SILENCING 2	8p21.3	/	AR	Arrêt méiotique (seulement mâles infertiles)	Suppression des éléments transposables durant la spermatogenèse	(Alhathal et al., 2020)
PNLDC1	Parn-like ribonuclease domain-containing exonuclease 1	6q25.3	Echec de la spermatogenèse, OMIM : 619528	AR (OMIM : 619529)	Arrêt méiotique et post méiotique (seulement mâles infertiles)	Exonucléase qui génère des piRNA matures	(Nagirnaja et al., 2021)
PLK4	Polo-like kinase 4	4q28.1	/	AD (OMIM : 605031)	/	Duplication du centriole pendant le cycle cellulaire	(Miyamoto et al., 2016, p. 4)
PSMC3IP	Psmc3-interacting protein	17q21.2	/	AR	Arrêt méiotique, synapsis incomplète	Recombinaison méiotique, requis pour la réparation des cassures double brin	(Al-Agha et al., 2018)
RAD21L1	Rad21 cohesin complex component-like 1	20p13	/	AR	Azoospermie	Composant méiose-spécifique d'un complexe de cohésines	(Krausz et al., 2020)
REC8	REC8 meiotic recombination protein	14q12	/	AR	Arrêt méiotique	Cohésion des chromatides sœurs et recombinaison des chromosomes homologues	(Kherraf et al., 2022a; Xu et al., 2005)
RNF212	Ring finger protein 212	4p16.3	Echec spermatogenèse, OMIM : 619673	AR (OMIM : 612041)	Arrêt post-méiotique (Reynolds et al., 2013, p. 212)	Régulateur de crossing-over pendant la méiose	(Riera-Escamilla et al., 2019, p. 212)

SHOC1	Shortage in chiasmata 1	9q31.3	Echec spermatogenèse, OMIM : 619949	AR (OMIM : 618038)	Arrêt méiotique	Se lie à l'ADN simple brin et aux structures ramifiées d'ADN ; formation d'intermédiaires de crossing-over	(Krausz et al., 2020)
SNRPA1	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide a-prime	15q26.3	/	AR	/	Requis pour la division cellulaire	(Wu et al., 2016)
SOHLH1	Spermatogenesis- and oogenesis-specific basic helix-loop-helix protein 1	9q34.3	Echec spermatogenèse, OMIM : 618115	AD (OMIM : 610224)	Arrêt méiotique	Régulateur transcriptionnel essentiel pour la différenciation des spermatogonies.	(Choi et al., 2010; Nakamura et al., 2017)
SPINK2	Serine protease inhibitor, kazal-type, 2	4q12	Echec spermatogenèse, OMIM : 618091	AR (OMIM : 605753)	Arrêt pré-méiotique	Inhibiteur de l'acrosine	(Kherraf et al., 2017, p. 2)
SPO11	SPO11 Initiator Of Meiotic Double Stranded Breaks	20q13.31	/	AR	Arrêt méiotique	Initiation de la recombinaison méiotique	(Fakhro et al., 2018)
STAG3	Stromal antigen 3	7q22.1	Echec spermatogenèse, OMIM : 619672	AR (OMIM : 608489)	Arrêt pré-méiotique	Essentiel pour l'appariement et la ségrégation des chromosomes	(Krausz et al., 2020; Riera- Escamilla et al., 2019, p. 3; van

							der Bijl et al., 2019, p. 3)
STX2	Syntaxin 2	12q24.33	/	AR (OMIM : 132350)	Arrêt post-méiotique	Impliqué dans le ciblage et la fusion des vésicules de transport intracellulaires	(Nakamura et al., 2018, p. 2)
SYCE1	Synaptonemal complex central element protein 1	10q26.3	Echec spermatogenèse, OMIM : 616950	AR (OMIM: 611486)	Echec de réparation ADN et synapsis	Composant du complexe synaptonémal	(Krausz et al., 2020; Maor-Sagie et al., 2015, p. 1; Pashaei et al., 2020, p. 1)
SYCP3	Synaptonemal complex protein 3	12q23.2	Echec spermatogenèse, OMIM : 270960	AD (OMIM : 604759)	Arrêt méiotique	Recombinaison méiotique, composant du complexe synaptonémal	(Rocca et al., 2020)
TAF4B	TATA-box binding protein associated factor 4b	18q11.2	Echec spermatogenèse, OMIM : 615841	AR (OMIM : 601689)	Dégénérescence testiculaire et apoptose des cellules germinales	Co activateur transcriptionnel de gènes nécessaires à la spécification et à la prolifération des cellules souches spermatogoniales	(Ayhan et al., 2014)
TDRD7	Tudor domain-containing protein 7	9q22.33	/	AR	Arrêt post-méiotique et cataracte	Traitement de l'ARN	(Tan et al., 2019)
TDRD9	Tudor domain-containing protein 9	14q32.33	Echec spermatogenèse, OMIM : 618110	AR (OMIM : 617963)	Mâles infertiles	Répression d'éléments transposables durant la méiose	(Arafat et al., 2017, p. 9; Shoji et al., 2009, p. 9)
TDRKH	Tudor and KH domains-containing protein	1q21.3	/	AR	Arrêt méiotique	Répression des éléments transposables, maintien de l'intégrité du génome	(Kherraf et al., 2022a)

TERB1	Telomere repeat-binding bouquet formation protein 1	16q22.1	Echec spermatogenèse, OMIM : 619646	AR (OMIM : 617332)	Arrêt méiotique	Appariement des chromosomes homologues et attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire	(Alhathal et al., 2020; Kherraf et al., 2022a; Krausz et al., 2020; Long et al., 2017, p. 1; Salas-Huetos et al., 2021, p. 1)
TEX11	Testis-expressed gene 11	Xq13.1	Echec spermatogenèse, OMIM : 309120	XLR (OMIM: 300311)	Arrêt méiotique	Synapsis chromosomique et formation de crossing-over	(Krausz et al., 2020; Yatsenko et al., 2015)
TEX14	Testis-expressed gene 14	17q22	Echec spermatogenèse, OMIM : 617707	AR (OMIM: 605792)	/	Formation de ponts intercellulaires méiotiques	(Araujo et al., 2020; Fakhro et al., 2018; Gershoni et al., 2017; Krausz et al., 2020)
TEX15	Testis-expressed gene 15	8p12	Echec spermatogenèse, OMIM : 617960	AR (OMIM: 605795)	Arrêt méiotique (mâle infertile seulement)	Synapsis et réparation des cassures double brins	(Araujo et al., 2020; Colombo et al., 2017; Okutman et al., 2015; Wang et al., 2018)
USP9Y	Ubiquitin-specific protease 9, y chromosome	Yq11.221	Echec spermatogenèse, OMIM : 415000	YL (OMIM : 400005)	/	Protéases ubiquitine-spécifique	(Sun et al., 1999)
USP26	Ubiquitin-specific protease 26	Xq26.2	/	XL (OMIM : 300309)	/	Protéases ubiquitine-spécifique	(Arafat et al., 2020; Ma et al., 2016; Stouffs et al., 2006)
WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3	Xp11.22	/	XL	/	Régulation de l'homéostasie des électrolytes, la	(Fakhro et al., 2018)

						signalisation cellulaire, la survie et la prolifération.	
<i>XRCC2</i>	X-ray repair cross complementing 2	7q36.1	Anémie de Fanconi, OMIM : 617247 ; Echec spermatogenèse, OMIM : 619145	AR (OMIM : 600375)	Arrêt méiotique	Progression de la méiose et réparation de cassures doubles brins.	(Yang et al., 2018; Y.-X. Zhang et al., 2019)
<i>ZMYND15</i>	Zinc finger mynd-containing protein 15	17p13.2	Echec spermatogenèse, OMIM : 615842	AR (OMIM : 614312)	Arrêt post-méiotique	Répresseur transcriptionnel qui contrôle l'expression des cellules haploïdes durant la spermiogenèse	(Ayhan et al., 2014; T.-Y. Hu et al., 2021)
<i>ZSWIM7</i>	Zinc finger swim domain-containing protein 7	17p12	Echec spermatogenèse, OMIM : 619831	AR (OMIM : 614535)	Arrêt post-méiotique	Impliqué dans la réparation des cassures double brin	(Alhathal et al., 2020; Hussain et al., 2022, p. 7; Yang Li et al., 2021, p. 7)

Table 2. Gènes causaux de l'azoospermie identifiés chez l'homme (Cazin, GETI, 2023)

b. L'azoospermie obstructive (AO)

L'AO, congénitale ou acquise, est causée par une obstruction d'un canal (*rete testis*, canaux efférents, épидидyme, canal déférent, canal éjaculateur) et représente 40% des cas d'azoospermie (Wosnitzer and Goldstein, 2014). La spermatogenèse est normale ou quasi normale dans les tubes séminifères, de fait le recours à une biopsie testiculaire n'est pas obligatoire et un prélèvement épидидymaire peut suffire bien qu'en pratique les deux soient faits.

Certaines causes monogéniques sont testées systématiquement comme c'est le cas pour les patients atteints d'azoospermie obstructive liée à une absence bilatérale des canaux déférents (ABCD), notamment avec le gène *CFTR*.

CFTR

Composé de 27 exons et s'étendant sur plus de 180kb, le gène *CFTR* est le premier gène situé sur un autosome qui a été cloné grâce à une stratégie de clonage positionnel en 1989 après avoir été cartographié et identifié sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2) (Kerem et al., 1989). Ce gène code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés qui est un canal chlorure régulé par l'AMPc exprimé majoritairement dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, dans le tractus digestif et reproductif.

Les mutations dans *CFTR* sont responsables de fibrose kystique, maladie autosomique récessive affectant 1/2500 enfants dans la population caucasienne. La mutation la plus fréquente de ce gène est la délétion p.Phe508Del, correspondant à la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine, elle est retrouvée chez près de 70% des patients Européens présentant une fibrose kystique. Il existe aujourd'hui près de 2000 mutations répertoriées sur les 27 exons du gène et leur type et leur fréquence varie grandement selon l'origine ethnique des patients. Ces mutations sont listées dans une base de données hébergée sur le site [Cystic Fibrosis Mutation Database \(sickkids.on.ca\)](http://sickkids.on.ca). Ces mutations impactant la fonction de CFTR mènent à un transport anormal du chlorure ce qui affecte l'homéostasie de l'eau et du sodium à travers l'épithélium ayant pour conséquence des sécrétions épaisses et visqueuses. L'accumulation de mucus dans les voies respiratoires mène à des infections chroniques et des atteintes inflammatoires au niveau pulmonaire entraînant une insuffisance respiratoire. Les atteintes pancréatiques, intestinales et hépatiques mènent

des atteintes digestives (Touré, 2017). Les mutations identifiées dans ce gène sont réparties en six classes selon leur impact sur la protéine (**Figure 32**). Les mutations de classe 1, 2 et 3 sont considérées comme « sévères », associées à une insuffisance pancréatique et une atteinte pulmonaire et les mutations de classe 4, 5 et 6 comme « peu sévères ». Les mutations de classe 1 sont des mutations non-sens ou des insertions-délétions conduisant à une absence d'expression de la protéine à la surface des cellules épithéliales ; les mutations de classe 2, telle que p.Phe508Del, conduisent à des anomalies de repliement et de trafic intracellulaire de la protéine ; les mutations de classe 3 souvent faux-sens sont situées au niveau des domaines de liaison à l'ATP; les mutations de classe 4, faux sens, sont situées dans le canal transmembranaire ce qui affecte la conductance du canal CFTR ; les mutations de classe 5 diminuent la quantité de transcrits normalement exprimés et donc la quantité de protéine CFTR exprimée à la membrane et enfin la classe 6 regroupe les mutations qui impactent la stabilité de la protéine. Les mutations identifiées à ce jour sont répertoriées dans des bases de données (Férec, 2021).

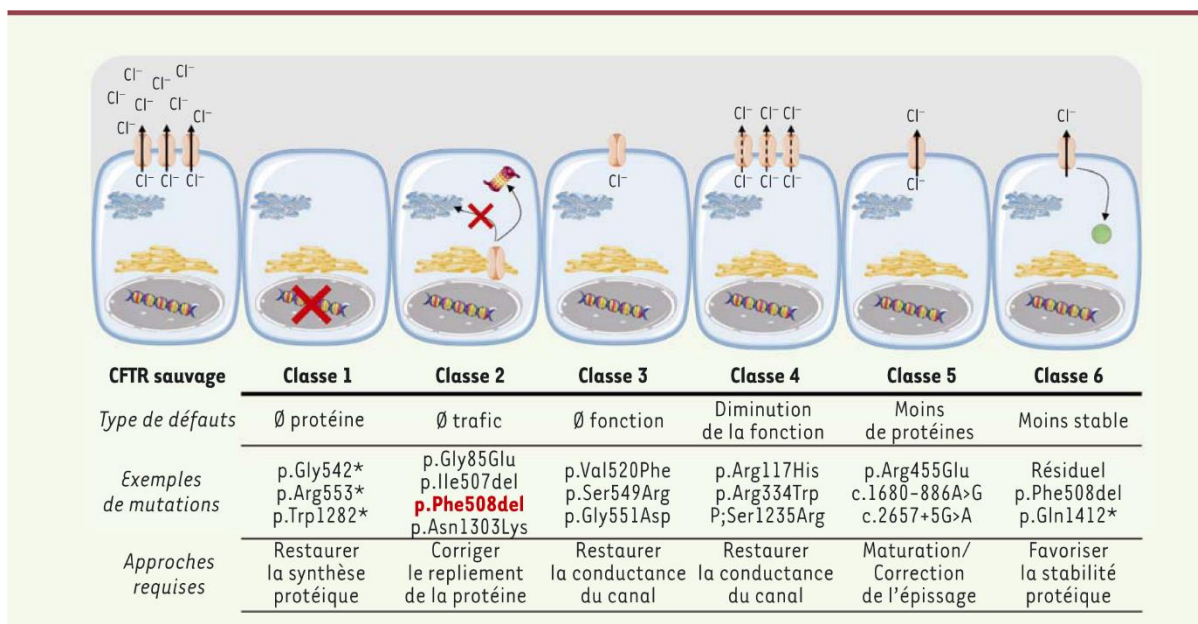


Figure 32. Classes de mutation du gène CFTR et leurs conséquences moléculaires. (Férec, 2021)

De plus, la fertilité des patients présentant des mutations dans CFTR est impactée. Chez les garçons, les mutations du gène sont en majorité impliquées dans la survenue de l'ABCD empêchant donc le passage des spermatozoïdes des testicules à l'urètre. En effet, le gène CFTR est muté dans environ 80% des cas (Yu et al., 2012). L'ABCD est retrouvée chez 95% des

patients atteints de mucoviscidose (de Souza et al., 2018). Les sujets ayant des mutations bi-alléliques de classe 1 à 3 ont une mucoviscidose et une AO, alors que les hommes ayant une des mutations bi-allélique de classe 3-6 n'ont pas de mucoviscidose mais souvent uniquement une AO. Pour ces patients les spermatozoïdes peuvent être récupérés par TESE ou dans l'épididyme et utilisés en parcours d'AMP pour avoir recours à une FIV-ICSI (Lin and Huang, 2020).

Jusqu'à récemment plus de 20% des cas de patients présentant une ABCD restait sans diagnostic génétique puisqu'aucune mutation dans *CFTR* n'était trouvée suggérant d'autres causes génétiques.

ADGRG2

En 2016 (Patat et al., 2016), ont analysé 379 sujets présentant une azoospermie obstructive, et identifiées 4 patients avec une mutation hémizygote dans le gène *ADGRG2*. Depuis, d'autres études ont été menées et ont permis d'identifier 14 nouvelles mutations dans le gène *ADGRG2* chez 19 patients au total (Khan et al., 2018; Pagnin et al., 2020; M.-Q. Tan et al., 2022; Wu et al., 2020; Yang et al., 2017; Yuan et al., 2019). *ADGRG2*, localisé en Xp22.3, code pour une protéine de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Obermann et al., 2003). Il est exprimé dans les canaux efférents et l'épididyme. Chez la souris, la délétion d'*Adgrg2* provoque une azoospermie obstructive due à une déficience de réabsorption du fluide du canal efférent conduisant à une accumulation de liquide dans le testicule et une stase des spermatozoïdes dans les canaux efférents (Davies et al., 2004; Obermann et al., 2003).

Autres mutations

En 2019, une étude sur une cohorte de patients Taïwanais a permis d'identifier des mutations dans le gène *SLC9A3* (Y.-N. Wu et al., 2019). *SLC9A3* est un échangeur Na^+/H^+ exprimé sur les membranes apicales de l'épithélium intestinal, du tubule proximal rénal, des épididymes et des canaux déférents. Pendant la spermatogenèse murine, *Slc9a3* est spécifiquement exprimé dans la région acrosomique des spermatides rondes et allongées et joue un rôle essentiel dans la formation de l'acrosome pendant la spermiogénèse. Il a été montré que l'absence de *SLC9A3* chez la souris mâle provoquait une azoospermie obstructive due à des anomalies des canaux efférents et une atrophie des canaux déférents et vésicules séminales (Chiang et al., 2019; Y.-Y. Wang et al., 2017). De plus, chez les souris KO, l'absence de *SLC9A3* mène à une

diminution de l'expression de CFTR (Y.-Y. Wang et al., 2017) entraînant des modifications structurelles de l'épididyme et des canaux déférents. Néanmoins, chez l'homme, la relation entre la perte de SLC9A3 et l'ABCD est encore mal comprise et l'implication de SLC9A3 dans ce phénotype chez l'homme est encore spéculative. En effet dans l'étude de 2019 la possibilité d'un digénisme impliquant des variations de CFTR est probable.

Enfin en 2019, une étude a suggéré que la cause génétique de l'ABCD pouvait aussi être due à des changements dans l'activité transcriptionnelle et post-transcriptionnelle et a constaté des mutations de *SCNN1B* et *CA12* associées à l'ABCD en régulant l'expression de CFTR (Shen et al., 2019a).

3. L'exploration génétique des anomalies morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes

Bien que la plupart des causes d'infertilité masculine soient dues à une production insuffisante de spermatozoïdes, il y a également un nombre important de cas où la qualité des spermatozoïdes produits est altérée entraînant la production de spermatozoïdes anormaux et non fonctionnels. Lorsque les anomalies sont morphologiques, on parle de tératozoospermie. La tératozoospermie se caractérise par la présence de plus de 85% de spermatozoïdes à morphologie anormale dans l'éjaculat. On parle de tératozoospermie monomorphe lorsque les spermatozoïdes présentent un seul type d'anomalie. On distingue la globozoospermie, le syndrome des spermatozoïdes acéphales, la macrozoospermie et le phénotype des anomalies morphologiques multiples des flagelles spermatiques (AMMF). Ces tératozoospermies monomorphes représentent environ 1% des infertilités masculines. On distingue également d'autres anomalies qualitatives purement fonctionnelles telles que les asthénozoospermies pures et les spermatozoïdes non fécondants (échecs de fécondation).

La conduite à tenir pour l'exploration génétique des tératozoospermies monomorphes est résumée par l'organigramme ci-dessous (**Figure 33**).

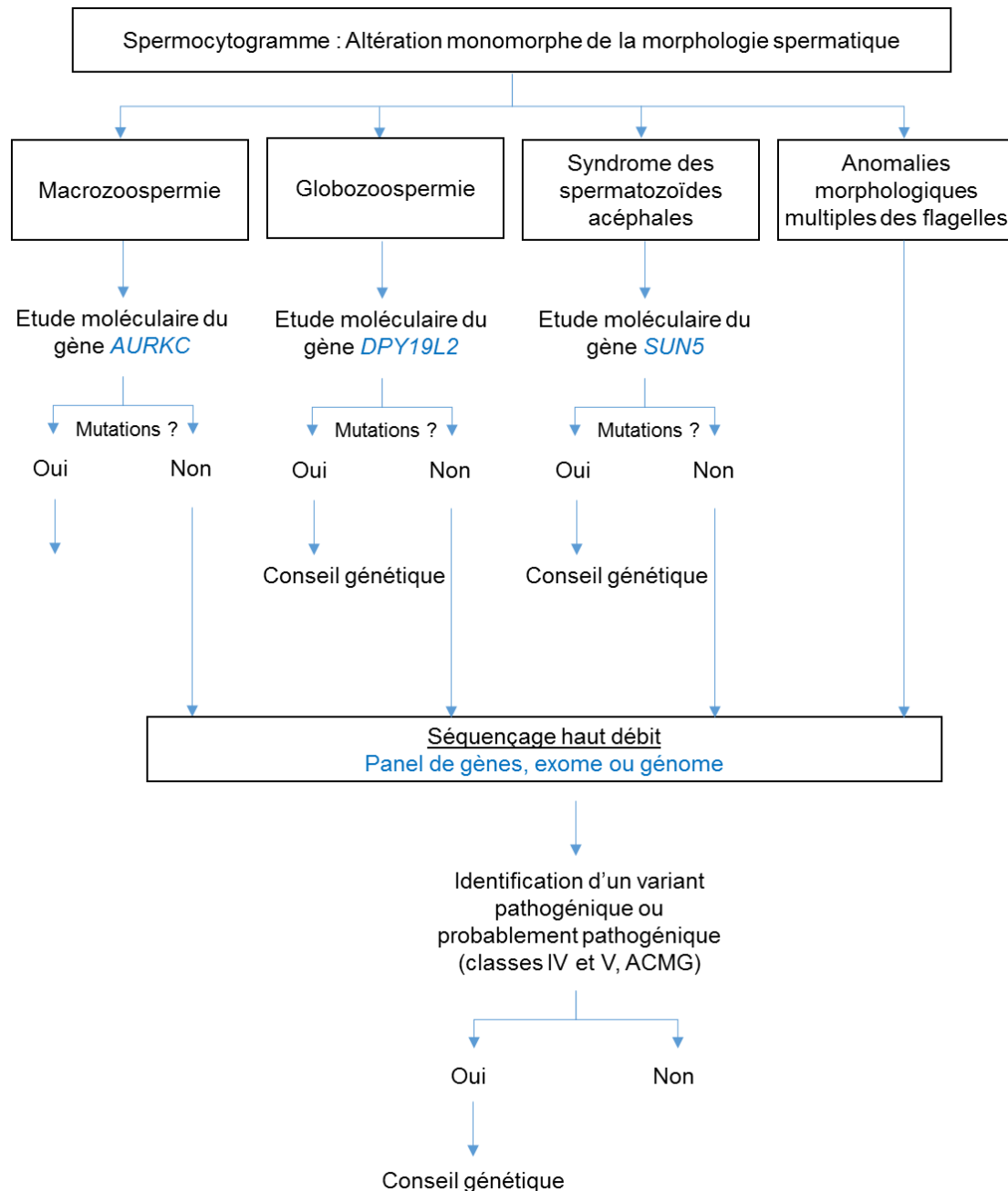


Figure 33. Arbre décisionnel pour conduire l'exploration génétique des tératozoospermies monomorphes. (Kherraf, Ray, JBM, 2023)

a. La globozoospermie

La globozoospermie est une forme sévère de tératozoospermie caractérisée par la présence d'une majorité de spermatozoïdes à tête ronde (au minimum 20 à 50%) (Dam et al., 2011; Oud et al., 2020), dépourvus d'acrosome, dans l'éjaculat. Les spermatozoïdes ne présentant plus d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques acrosomales sont alors incapables d'adhérer et de pénétrer la zone pellucide de l'ovocyte. Ce phénotype résulte principalement d'un échec de

la formation et du trafic des vésicules pro-acrosomales ainsi que d'un trouble de l'interaction entre l'acrosome et l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde.

Jusqu'à maintenant, plus de 60 lignées de souris *knock-out* répertoriées dans la base de données « *Mouse Genome Informatics* » (www.informatics.jax.org/) présentent une globozoospermie. Cela n'est pas surprenant compte tenu de la complexité et de la grande quantité de protéines impliquées dans la formation de l'acrosome (Beurois et al., 2020). Cependant, actuellement seules quelques mutations ont été identifiées dans les orthologues humains.

DPY19L2 est la cause génétique la plus fréquente de ce phénotype et est retrouvée chez plus de la moitié des patients globozoospermes (50-70%) (Harbuz et al., 2011). Les variants identifiés dans ce gène sont répertoriés en annexe 1 (**Table supplémentaire 2**). *DPY19L2* (12q14.2) est exprimé majoritairement dans le testicule et code pour une protéine localisée à la membrane nucléaire interne du spermatozoïde et ancre l'acrosome à l'enveloppe nucléaire par une plaque cytosquelettique appelée acroplaxome (Pierre et al., 2012). Lorsque *DPY19L2* est muté, la membrane nucléaire interne est séparée de la membrane nucléaire externe menant au détachement de l'acrosome.

La délétion homozygote la plus fréquente chez les patients atteints de globozoospermie est une délétion de 200 kb présente chez 22% à 83% des patients (Crafa et al., 2023). Cette variabilité peut s'expliquer par les origines géographiques des cohortes de patients ou encore par les degrés de consanguinité dans les familles étudiées mais surtout par l'inclusion variable d'une proportion de patients avec une globozoospermie partielle (Ray et al., 2017). D'autres mutations ont été décrites pour un total d'une trentaine de variants délétères (Celse et al., 2020). La stratégie diagnostique consensuelle pour les patients présentant une globozoospermie est de rechercher en première intention la délétion du gène *DPY19L2* puis de rechercher les autres mutations causales dans ce gène et enfin de rechercher des défauts dans d'autres gènes candidats. En 2020 Celse *et al.*, (Celse et al., 2020) ont proposé une nouvelle stratégie diagnostique se concentrant uniquement sur les patients présentant au moins 50% de globozoospermie et basée sur la réalisation d'une PCR qualitative classique pour détecter la délétion homozygote et si elle est négative, un séquençage de l'exome entier, plus rapide, plus économique et plus exhaustif que le séquençage Sanger des 22 exons de *DPY19L2*.

D'autres gènes sont connus comme associés à la globozoospermie chez l'homme : *SPATA16* (Cheung et al., 2021; Dam et al., 2007; Ellnati et al., 2016; Ghédir et al., 2019; Karaca et al., 2014), *PICK1* (Cheung et al., 2021; Liu et al., 2010), *ZBP1*, *CCDC62* (Oud et al., 2020), *CCNB3* (Yaqian Li et al., 2021) et *SPACA1* (P. Chen et al., 2021, p. 1). L'utilisation du séquençage exomique a permis d'identifier d'autres gènes candidats *GGN*, *C2CD6*, *CCIN*, *SPACDR*, *DNAH17*, *DNAH6*, *PIWIL4*, *CHPT1* et *ITPRID2* mais leur implication n'a pas été validée fonctionnellement par l'utilisation de modèles animaux par exemple. Les variants dans ces gènes et les fonctions de ces gènes sont résumées dans la **Table 3**.

Pour les patients présentant une globozoospermie totale, le taux de fécondation moyen par ICSI est de 24,1% (Vozdova et al., 2014) et est plus élevé chez les patients présentant une globozoospermie partielle (61%) qui est comparable au taux de fécondation moyen chez des contrôles sans globozoospermie (Yaqian Li et al., 2021). La FIV quant à elle ne devrait pas être recommandée pour les patients atteints de globozoospermie même partielle car le taux de réussite est bien plus faible comparée aux contrôles (Jiang et al., 2015). Une étude a montré que la sélection morphologique des spermatozoïdes au moment de l'ICSI (IMSI, « *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection* ») améliorerait le taux de fécondation (Cheung et al., 2021). De la même façon, le taux de fécondation moyen a été significativement amélioré par l'activation artificielle des ovocytes par l'ajout de calcium ionophore (Tavalaee et al., 2018). En effet, une hypothèse avancée pour expliquer les échecs de fécondations observés après ICSI, est l'absence de la phospholipase C zêta (PLC ζ) associée à la globozoospermie (Escoffier et al., 2015). La PLC ζ est une phospholipase spécifique du testicule essentielle à l'activation de l'ovocyte à la fécondation en déclenchant les oscillations calciques. Elle est localisée dans la zone équatoriale/postacrosomale des spermatozoïdes.

Une seule étude rapporte une grossesse réussie chez une femme dont le conjoint est un patient atteint de globozoospermie totale due à une mutation de *SPATA16*. Le déficit en *SPATA16* chez les patients globozoospermes empêche la fusion des vésicules pro-acrosomales et l'acrosome ne se forme pas. Cependant le taux de fécondation reste très faible (8,3%) même après utilisation de calcium ionophore (Karaca et al., 2014).

En effet, l'activation ovocytaire artificielle via l'utilisation du calcium ionophore a été proposée comme une option pour les patients atteints de globozoospermie complète subissant une ICSI.

Néanmoins l'utilisation de calcium ionophore lors de l'ICSI est remise en question car l'augmentation continue de la concentration de calcium intracellulaire peut affecter les événements moléculaires en aval.

Gène	Nom complet	Locus	Fonction	Variants	Patients	Modèle animaux	Références
<i>DPY19L2</i>	Dpy-19 Like 2	12q14.2	Ancre l'acrosome à l'enveloppe nucléaire par l'acroplaxome	Table supplémentaire 2		Souris : globozoospermie (Pierre et al., 2012, p. 2)	Table supplémentaire 2
<i>SPATA16</i>	Spermatogenesis-associated 16	3q26.31	Code pour une protéine de l'appareil de Golgi et joue un rôle dans la spermatogenèse	c.848G>A	3 frères	Souris : arrêt spermiogénèse (Fujihara et al., 2017)	(Cheung et al., 2021; Dam et al., 2007; Ellnati et al., 2016; Ghédir et al., 2019; Karaca et al., 2014)
				Délétion exon 2	4 (/27)		
<i>PICK1</i>	Protein interacting with C kinase 1	22q13.1	Liaison à des protéines membranaires et organisation de leur localisation subcellulaire.	c.1567G>A	1(/3)	Souris : malformation de l'acrosome (Xiao et al., 2009)	(Cheung et al., 2021; Liu et al., 2010, p. 1)
<i>ZBP1</i>	Zona pellucida binding protein 1	7p12.2	Réponse immune innée	c.931C >T	1 (/15)	Souris : malformation de l'acrosome (Yatsenko et al., 2012, p. 1)	(Oud et al., 2020)
<i>CCDC62</i>	Coiled-coil domain containing 62	12q24.31	Impliqué dans la réponse cellulaire au stimulus de l'œstradiol	c.442C >T	1 (/15)	Souris : malformation de l'acrosome (Y. Li et al., 2017)	(Oud et al., 2020)
<i>CCNB3</i>	Cyclin B3	Xp11.22	Contrôle du cycle cellulaire	c.1862dup	1 (/149)	Souris : anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Refik-Rogers et al., 2006)	(Yaqian Li et al., 2021)
<i>SPACA1</i>	Sperm acrosome membrane-associated protein 1	6q15	Rôle dans la morphogenèse de l'acrosome	c.53G>A	2 frères	Souris : globozoospermie (Fujihara et al., 2012, p. 1)	(P. Chen et al., 2021, p. 1)
<i>GGN</i>	Gametogenetin	19q13.2		c. 416_437del	1 (/69)	/	

			Rôle dans la spermatogenèse	c.1271del	2 (/15)		(Celse et al., 2020; Oud et al., 2020)
<i>C2CD6</i>	C2 calcium-dependent domain-containing 6	2q33.1	Impliqué dans le trafic membranaire et la transduction du signal	c.338A >G	1 (/15)	/	(Oud et al., 2020)
<i>CCIN</i>	Calicin	9p13.3	Nécessaire à une morphologie normale pendant la différenciation des spermatozoïdes	c.853G >A	1 (/15)	/	(Oud et al., 2020)
<i>SPACDR</i>	Chromosome 7 open reading frame 61	7q22.1	Formation de l'acrosome	c.259del	1 (/15)	/	(Oud et al., 2020)
<i>DNAH17</i>	Dynein axonemal heavy chain 17	17q25.3	Motilité spermatique, assemblage et battement flagellaire	c.2830C >T & c.7780 T >A	1 (/15)	/	(Oud et al., 2020)
<i>DNAH6</i>	Dynein axonemal heavy chain 6	2p11.2	Battement ciliaire et flagellaire	c.2454A>T & c.7706G>A	1	/	(Li et al., 2018)
<i>PIWIL4</i>	Piwi like RNA-mediated gene silencing 4	11q21	Développement et maintien des cellules souches germinales	c.1861G>A & c.2503C>A	1 (/149)	/	(Yaqian Li et al., 2021)
<i>CHPT1</i>	Choline phosphotransferase 1	12q23.2	Choline phospho transférase	c.715dup	1 (/149)	/	(Yaqian Li et al., 2021)
<i>ITPRID2</i>	Sperm specific antigen 2	2q31.3	Formation de l'acrosome et activation de l'ovocyte	c.3671G > A	1	/	(Huang et al., 2022, p. 2)

Table 3. Gènes causaux de la globozoospermie identifiés chez l'homme. (Cazin, GETI, 2023)

b. Le syndrome des spermatozoïdes acéphales

Le syndrome des spermatozoïdes acéphales (SSA) est caractérisé par la présence d'une majorité de flagelles isolés et de quelques têtes seules dans l'éjaculat. Précédemment, ce syndrome était décrit comme le syndrome des spermatozoïdes à tête d'épingle (Zaneveld and Polakoski, 1977) car le résidu de gouttelette cytoplasmique restant était confondu avec une tête de petite taille. Ce phénotype est dû à un développement anormal de la pièce connective au cours de la spermiogénèse dans le testicule. Il a été supposé que ce phénotype pouvait être lié à une cause génétique en raison des cas familiaux identifiés (Chemes et al., 1999). On peut distinguer trois sous types de SSA selon l'ultrastructure des spermatozoïdes acéphales : le SSA de type I où le centriole proximal reste attaché à la tête ; le SSA de type II où les flagelles seuls contiennent les centrioles distal et proximal et le SSA de type III où les têtes isolées contiennent les centrioles distal et proximal (Nie et al., 2020).

Le gène causal le plus fréquemment identifié chez les patients atteints du SSA est le gène *SUN5* aussi appelé *SPAG4L/TSARG4* (Frohnert et al., 2011). *SUN5* est localisé sur le chromosome 20 et son expression est spécifique des cellules germinales masculines. *SUN5* code pour une protéine transmembranaire localisée à la membrane nucléaire interne des spermatides allongés et spermatozoïdes matures, à la jonction tête-flagelle (Yassine et al., 2015, p. 5). Les protéines de la famille des protéines à domaine SUN interagissent avec les protéines à domaines KASH et forment ainsi des complexes appelés LINC pour relier le noyau au cytosquelette. Les souris mâles KO pour *Sun5* se sont avérées infertiles (Shang et al., 2017; Yunfei Zhang et al., 2021). En effet, *SUN5* étant absent, l'appareil de jonction tête-flagelle est alors désorganisé et les flagelles sont ainsi libérés dans la lumière des tubes séminifères tandis que les têtes des spermatozoïdes sont phagocytées par la cellule de Sertoli, expliquant le phénotype. *SUN5* a donc été décrit comme nécessaire pour la connexion de la tête du spermatozoïde à la pièce intermédiaire. Depuis 2016, plusieurs études ont permis d'identifier par WES, 20 mutations bi-alléliques dans *SUN5* (**Table 4**) retrouvées chez 43 patients au total (sur un total de 91 patients, toutes publications confondues). Les mutations dans le gène *SUN5* sont donc retrouvées chez 47% des patients présentant ce phénotype. La majorité des mutations identifiées ont lieu au niveau du domaine SUN et du domaine « *coiled-coil* » et ont un impact délétère sur la protéine en induisant l'apparition d'un codon stop prématuré, empêchant ainsi *SUN5* d'interagir avec d'autres protéines telles que les protéines ODF1

(« *Outer Dense Fiber 1* ») et Nesprin3 (Yan-Wei Sha et al., 2018; D. Zhang et al., 2021) et DNAJB13 (Shang et al., 2018). ODF1 est nécessaire à la structure de l'appareil de jonction tête-flagelle et à l'organisation du manchon mitochondrial, Nesprin3 est une protéine à domaine KASH nécessaire à l'organisation du cytosquelette et à l'attachement du centrosome à l'enveloppe nucléaire (Yunfei Zhang et al., 2021) et DNAJB13 est essentiel à la formation et à la fonction des axonèmes flagellaires (M. Liu et al., 2022).

D'autres gènes causaux de ce phénotype ont été identifiés par séquençage exomique comme c'est le cas de *PMFBP1*, dont les mutations représentent la deuxième cause génétique la plus fréquente de ce phénotype. En effet, 13 variants bi-alléliques ont été identifiés (**Table 4**) chez 14 patients (sur un total de 39 patients toutes publications confondues). Des mutations dans le gène *PMFBP1* sont donc retrouvées chez 36% des patients présents un SSA. *PMFBP1* est localisé au niveau de la jonction tête-flagelle des spermatozoïdes et a un rôle dans la liaison de la pièce connective à l'enveloppe nucléaire en interagissant indirectement avec *SUN5* et *SPATA6* (Zhu et al., 2018). *PMFBP1* et *SUN5* interagissent directement avec CENTLEIN, protéine indispensable à l'intégrité et à la fonction du HTCA, et sont nécessaires à l'assemblage de l'appareil de jonction tête-flagelle (Y. Zhang et al., 2021). Les souris mâles KO produites à l'aide de CRISPR-Cas9 étaient infertiles et présentaient un phénotype de spermatozoïdes acéphales, confirmant le phénotype retrouvé chez l'homme (Zhu et al., 2018).

Des mutations dans le gène *TSGA10* ont également été identifiées par WES (**Table 4**). *TSGA10* est spécifique du testicule et code pour une protéine localisée dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Elle joue un rôle important dans l'organisation et la position des centrioles et dans l'organisation du manchon mitochondrial (G. Liu et al., 2020; Y.-W. Sha et al., 2018; Ye et al., 2020). Les variants identifiés impactent la fonction protéique et mènent à une désorganisation de la structure de la pièce intermédiaire et une rupture au niveau du centriole proximal. Ces résultats sont à prendre avec précaution car aucune validation fonctionnelle avec un modèle animal KO n'a été réalisée. Cependant des souris mâles hétérozygote *Tsga10* ont été rapportées comme ayant des spermatozoïdes à motilité réduite due à une désorganisation de la gaine mitochondriale (Luo et al., 2021).

Très récemment en 2022, une étude a permis d'identifier par WES des variants bi alléliques du gène *SPATC1L* (**Table 4**) chez un patient présentant 100% de spermatozoïdes acéphales

parmi une cohorte de 22 patients (Y.-Z. Li et al., 2022). Le modèle murin KO créé par CRISPR-Cas9 a permis de mettre en évidence que l'intégrité de la jonction tête-flagelle était altérée produisant ainsi des spermatozoïdes acéphales (Kim et al., 2018) mimant alors le phénotype reproductif de l'homme. *SPATC1L* semble alors jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du spermatozoïde murin et humain.

Après analyse par WES d'une cohorte de 34 patients avec SSA, 2 variants du gène lié au chromosome X *ACTRT1* ont été identifiés chez deux patients (Yanwei Sha et al., 2021) et les souris mâles KO présentaient le même phénotype. *ACTRT1* est une protéine apparentée à l'actine et est un constituant majeur du matériel péricentriolaire et a un rôle dans la formation des spermatides. Chez l'homme, *ACTRT1* est localisée dans la HTCA. De fait les mutations dans *ACTRT1* peuvent donc affecter la jonction tête-flagelle des spermatozoïdes en interagissant avec les centrioles menant à un SSA.

Un variant hétérozygote faux sens (c.848T>C ; p.Gln286Arg) du gène *HOOK1* a également été identifié par WES chez trois patients d'un groupe de 7 patients présentant plus de 95% de spermatozoïdes acéphales dans leur éjaculat (Chen et al., 2018). Les souris KO pour *Hook1* ont une forme de la tête du spermatozoïde anormale et une fragilité au niveau de la jonction tête-flagelle. *Hook1* est nécessaire pour la différenciation des spermatides et est impliqué dans le positionnement des microtubules favorisant ainsi la fixation des organelles intracellulaires et l'élongation de la manchette durant la spermiogénèse (Mendoza-Lujambio et al., 2002).

En 2022, une étude a rapporté un variant homozygote dans le gène *SPATA20* identifié par WES chez un patient. Ce variant est un variant hétérozygote non-sens menant à un codon stop prématuré et à une protéine tronquée non fonctionnelle (X. Wang et al., 2022). L'étude a montré que *SPATA20* co-localisait avec *SPATA6*, une protéine nécessaire à la formation du HTCA, et régulait son expression. La mutation perte de fonction identifiée dans *SPATA20* pourrait être une cause d'infertilité masculine liée au SSA. De plus, en 2017, une étude a montré que la perte d'expression de *Spata20* chez la souris (aussi connue sous le nom de *Ssp411*) entraînait l'infertilité des mâles avec des déformations flagellaires et de la tête des spermatozoïdes ainsi qu'un détachement de la tête (Liu et al., 2018). Cependant, une autre étude a été menée en 2022 chez un patient, parmi une cohorte de 69 patients, présentant une globozoospermie partielle et très peu de spermatozoïdes acéphales (Martinez et al.,

2022b, p. 20). Dans cette étude, Martinez *et al.*, ont identifié un variant homozygote dans le site consensus donneur d'épissage (c.1957+2T>A). Cette nouvelle mutation pathogène biallélique dans *SPATA20* confirme l'implication de ce gène dans les défauts de la tête des spermatozoïdes mais avec un phénotype ne correspondant pas à un SSA typique suggérant une hétérogénéité phénotypique soulevant ainsi l'hypothèse d'un continuum phénotypique entre la globozoospermie partielle et le SSA.

DNAH6, *BRDT* et *CEP112* ont également été identifiés comme étant associées au SSA, mais leur implication reste à confirmer car les variants (répertoriés dans la **table 4**) n'ont été trouvés qu'une fois et aucune validation fonctionnelle sur modèle animal n'a été faite.

DNAH6 code pour une chaîne lourde de dynéine axonémale et est localisée à la jonction tête-flagelle des spermatozoïdes. Un variant a été identifié chez un patient présentant 30% de spermatozoïdes acéphales (Li *et al.*, 2018) (**Table 4**). Toutefois, l'association entre les mutations de *DNAH6* et le SSA reste à confirmer. En effet, d'autres études ont montré que les mutations de *DNAH6* étaient liées aux dyskinésies ciliaires primitives (DCP), AMMF et azoospermie.

De même, un variant homozygote faux sens du gène *BRDT* a été identifié (L. Li *et al.*, 2017) chez un patient présentant 99,5% de spermatozoïdes acéphales (**Table 4**). La protéine codée par *BRDT* agit comme régulateur transcriptionnel et de nombreux gènes ont eu un changement d'expression suite à la mutation du gène *BRDT* dont des gènes impliqués dans le transport intracellulaire qui peuvent expliquer le phénotype en perturbant l'attachement du centriole proximal au noyau spermatique. Cependant le rôle de *BRDT* dans le SSA est à confirmer car *BRDT* a aussi été rapporté comme étant associé à l'ANO (Zhang *et al.*, 2015). De plus chez la souris, un phénotype de décondensation de la chromatine et de macrozoospermie (Gaucher *et al.*, 2012) a également été rapporté nous permettant de penser qu'il est peu probable que ce gène soit associé au SSA.

En 2020, deux variants de *CEP112* ont été identifiés chez deux patients présentant un SSA (**Table 4**) (Sha *et al.*, 2020a). *CEP112* est exprimé spécifiquement dans le testicule, il code pour une protéine du centrosome, il joue un rôle prépondérant dans la jonction tête-flagelle durant la biogenèse du centriole et permet la morphologie normale de la tête du spermatozoïde.

D'autres gènes liés au SSA ont été identifiés dans les modèles animaux mais n'ont pas encore été trouvés chez l'homme comme c'est le cas de *Prss21*, *Oaz3*, *Cntrob*, *Ift88*, *Odf1* et *Spata6* (Y. Wang et al., 2022).

Pour les couples dont les hommes présentent une infertilité primaire liée à un SSA, aucune grossesse spontanée n'a été rapportée. L'ICSI peut alors être proposée en utilisant les quelques spermatozoïdes entiers retrouvés dans l'éjaculat, l'utilisation de cette technique chez les patients atteints de SSA a été rapportée pour la première fois en 2003 (Porcu et al., 2003) et s'est ensuite avérée efficace chez certains patients. En effet les études portant sur les patients avec des mutations dans les gènes *SUN5* (Fang et al., 2018) et *PMFBP1* (Zhu et al., 2018) montrent un bon pronostic d'ICSI avec des grossesses et naissances rapportées. L'ICSI est donc une bonne option thérapeutique pour ces patients. Malgré cela, une tentative d'ICSI a échoué chez un couple dont l'homme était porteur d'une mutation *SUN5*, dû à l'impossibilité d'obtenir des embryons transplantables (G. Liu et al., 2020). Deux tentatives d'ICSI chez deux couples dont les hommes portaient des mutations dans *TSGA10* ont mené successivement à un échec (Y.-W. Sha et al., 2018) et à une grossesse (G. Liu et al., 2020). Pour un couple dont le patient portait une mutation dans *SPATC1L* l'ICSI a échoué, en effet aucun embryon transplantable n'a été obtenu (Y.-Z. Li et al., 2022). Les résultats d'ICSI sont donc complexes, et des études ont évalué l'impact du type de SSA sur les résultats cliniques de l'ICSI. Les patients appartenant au SSA de type II (*SUN5*, *PMFBP1*, *HOOK1*) ont de meilleurs résultats par ICSI que les types I et III (*TSGA10*, *BRDT*) qui présentent un mauvais développement embryonnaire et un échec de grossesse clinique. De ce fait, l'ICSI pourrait être une approche thérapeutique optimale pour surmonter l'infertilité chez ces patients. Néanmoins, en raison du nombre limité d'études, il reste difficile de conclure définitivement (Nie et al., 2020).

Gène	Position chromosomique	Variant sur la séquence codante	Variant sur la protéine	Références
SUN5	20:31571580-31592240	c.824C>T	p.Thr275Met	(Zhu et al., 2016)
		c.851C>G	p.Ser284Ter	
		c.340G>A	p.Gly114Arg	
		c.1066C>T/ c.485T>A	p.Arg356Cys and p.Met162Lys	
		c.381delA/ c.824C>T	p.Val128SerfsTer7 and p.Thr275Met	
		c.381delA/ c.781G>A	p.Val128SerfsTer7 and p.Val261Met	
		c.216G>A/ c.1043A>T	p.Trp72Ter and p.Asn348Ile	
		c.425+1G>A/c.1043A>T	p.Asn348Ile	
		GRCh38 chr20:32995761_32990672 delinsTGGT	p.Leu143SerfsTer30	(Elkhatib et al., 2017)
		c.829C>T	p.Gln277Ter	(Fang et al., 2018)
		c.1067G>A	p.Arg356His	
		c.211+1_211+2 dupGT	p.Ser71Cysfs11Ter	(Cazin et al., 2021a; Fang et al., 2018)
		c.381delA	p.Val128SerfsTer7	(Yan-Wei Sha et al., 2018; D. Zhang et al., 2021)
		c.781G>A/ c.1043A>T	p.Val261Met and p.Asn348Ile	(Shang et al., 2018)
		c.425+1G>A/c.475C>T	p.Arg159Ter	
		c.772C>T	p.Arg258Cys	(G. Liu et al., 2020)
c.675C>A	p.Tyr225Ter			

		c.88 C>T/c.381delA	p.Arg30Ter and p.Val128Serfs7Ter	(D. Zhang et al., 2021)
		c.775G>A	p.Gly259Ser	(Xiang et al., 2022a)
PMFBP1	16:72,112,157-72,176,878	c.1462C>T	p.Gln488Ter	(Zhu et al., 2018)
		c.2404C>T	p.Gln802Ter	
		c.2725C>T	p.Arg909Ter	
		c.2725C>T/ c.2092delG	p.Arg909Ter and p.Ala698ProfsTer7	
		c.2561_2562del	p.Lys854ArgfsTer5	(Y.-W. Sha et al., 2019a)
		c.2561_2562del/ c.327T>A	p.Lys854ArgfsTer5 and p.Trp109Ter	
		c.361C>T/ c.2089-1G>T	p.Gln121Ter and p.Ile697LeufsTer257	(G. Liu et al., 2020)
		c.301A>C	p.Thr101Pro	(M. Lu et al., 2021)
		c.327T>A/c.2243C>A	p.Tyr109Ter and p.Ala748Asp	(G. Liu et al., 2021)
		c.414+1G>T	p.Val139Glufs	
		c.361C>T	p.Gln121Ter	
		c.2089-1G>T	p.Ile697LeufsTer257	
		c.459_460delAG/ c.2725C>T	p.Lys156fs and p.Arg909Ter	
		c.414+1G>T/ c.361C>T	p.Val139Glufs and p.Gln121Ter	
		c.414+1G>T/c.393del	p.Val139Glufs and p.Cys132AlafsTer3	(Deng et al., 2022)
TSGA10	2:98,997,261-99,154,964	c.211delG	p.A71HfsTer12	(Y.-W. Sha et al., 2018)
		c.1739A>C	p.Gln580Pro	(G. Liu et al., 2020)
		c.545dupT	p.Ala183SerfsTer10	(Ye et al., 2020)

		c.1108-1G>T	p. Ala370GlufsTer293	(Xiang et al., 2021)
		c.1150delG/c.1739A>C	p.Asp384fs and p.Gln580Pro	(G. Liu et al., 2021, p. 10)
		c.1919A>G	p.Glu640Gly	
DNAH6	2:84,516,455-84,819,589	c.7706G>A/ c.2454A>T	, p.Arg2569His and p.Glu818Asp	(Li et al., 2018, p. 6)
BRDT	1:91,949,371-92,014,426	c.G2783A	p.Gly928Asp	(L. Li et al., 2017)
CEP112	17: 65,635,537-66,192,133	c.496C>T	p.Arg166Ter	(Sha et al., 2020a)
		c.2074C>T/ c.2104C>T	p.Arg692Trp and p.Arg702Cys	
SPATC1L	21: 46,161,148-46,184,476	c.910C>T/c.994G>T	p.Arg304Cys and p.Glu332Ter	(Y.-Z. Li et al., 2022)
ACTRT1	X: 128,050,962-128,052,403	c.95G>A	p.Arg32His	(Yanwei Sha et al., 2021)
		c.662A>G	pTyr221Cys	
SPATA20	17: 50,543,058-50,555,852	c.619C>T	p.Arg207Ter	(X. Wang et al., 2022)

Table 4. Liste de mutations identifiées dans les gènes impliqués dans le syndrome des spermatozoïdes acéphales. Adapté de (Beurois et al., 2020)

c. La macrozoospermie

La macrozoospermie, décrite pour la première fois en 1977 (Nistal et al., 1977), est une cause d'infertilité masculine observée dans < 1% des cas, elle se caractérise par la présence dans l'éjaculat d'une majorité de spermatozoïdes multi-flagellaires à grosse tête. La macrozoospermie est souvent associée à une OAT (Ray et al., 2017). Une ségrégation incomplète des chromosomes et des chromatides pendant les méiose I et II suivi d'un échec de cytokinèse a lieu (Dieterich et al., 2009) comme le suggèrent les études montrant un taux d'aneuploïdie très élevé dans tous les spermatozoïdes quelle que soit la morphologie de la tête (Guthauser et al., 2006; Perrin et al., 2007).

En 2007, une étude a décrit des cas familiaux issus de familles consanguines suggérant une transmission autosomique récessive (Dieterich et al., 2007). Tous les sujets étudiés étaient

porteurs du même variant homozygote délétère dans le gène *AURKC* (c.144delC, renommé ensuite c.145delC ; p.Leu49TrpfsTer23). Cette étude a permis d'identifier *AURKC* comme le premier et principal gène associé à la macrozoospermie. *AURKC* est fortement exprimé dans le testicule, notamment dans les spermatocytes en division mais aussi dans les ovocytes. Il appartient à la famille des kinases Aurora qui codent pour des sérine/thréonine kinases hautement conservées jouant des rôles importants dans la mitose et la méiose. Il existe 3 membres de la famille des Aurora kinases chez l'homme, *AURKA*, *AURKB* et *AURKC* (Willems et al., 2018). *AURKA* agit au niveau des centrosomes et microtubules dans les cellules mitotiques (Magnaghi-Jaulin et al., 2019) tandis qu'*AURKB* et *AURKC* sont des composants du CPC (« *Chromosomal Passenger Complex* ») (Slattery et al., 2008). Le CPC est un complexe protéique qui se lie aux centromères pour réguler la ségrégation des chromosomes. Il contient la protéine du centromère interne (INCENP) et deux protéines d'ancrage des histones : la Survivine et la Boréoline (Avo Santos et al., 2011). Les cellules mitotiques ne nécessitent qu'*AURKA* et *AURKB* alors que les cellules germinales ont aussi besoin d'*AURKC* pour assurer la méiose. La perturbation du CPC entraîne des erreurs de ségrégation des chromosomes, de fait les mutations perte de fonction d'*AURKC* peuvent entraîner des troubles de la méiose et une macrozoospermie.

D'autres études ont décrit des mutations d'*AURKC* chez des patients mettant en évidence les deux principaux variants du gène confirmant la prédominance du variant c.145delC (représentant 90% des mutations *AURKC*) trouvé principalement chez les sujets d'origine Nord-africaine (Ounis et al., 2015) et c.744C>A (p.Tyr248Ter) retrouvé principalement dans la population européenne (Ben Khelifa et al., 2012; Ortega et al., 2019). Par ailleurs, le taux élevé d'aneuploïdie et de polyploïdie rapporté chez les hommes atteints de macrozoospermie et en particulier chez les patients présentant des variants *AURKC* bi-alléliques dont les spermatozoïdes sont tétraploïdes empêche le recours à la FIV pour ces hommes. Ainsi, l'ICSI est contre-indiquée pour les hommes porteurs de mutations *AURKC* même après sélection des spermatozoïdes.

L'impact de ces deux variants a été étudié par des tests fonctionnels chez la souris *Aurkc* KO. Les résultats ont montré que les deux mutations perturbaient la localisation normale du CPC ce qui a pour conséquence un mauvais alignement des chromosomes en métaphase (Fellmeth et al., 2016). Les souris mâles KO générées par recombinaison homologue ont une fertilité

réduite et produisent des spermatozoïdes anormaux présentant un acrosome malformé et une condensation hétérogène de la chromatine (Kimmins et al., 2007). Ceci suggère un rôle d'*Aurkc* pendant la spermiogénèse murine ce qui n'est pas observé chez l'homme. Cela pourrait être expliqué par une compensation de l'activité d'AURKC par une activité plus élevée d'un autre membre de la famille AURK tel qu'AURKB (Wellard et al., 2020).

D'autres variants du gène *AURKC*, causaux de la macrozoospermie, ont été identifiés. En effet, un variant faux-sens perte de fonction dans l'exon 6 (c.686G>A; p.Cys229Tyr) a été identifié chez un patient (Fellmeth et al., 2016). En 2011, chez deux frères Tunisiens présentant une infertilité primaire due à une production de spermatozoïdes macrocéphales (Ben Khelifa et al., 2011), un variant hétérozygote dans le site donneur d'épissage de l'exon 5 (c.436-2A>G) a été identifié. Ce variant mène au saut de l'exon 5 résultant en une protéine tronquée. Plus récemment un variant homozygote pathogénique faux sens dans l'exon 3 (c.269G>A ; p.Arg90Gln) a été identifié chez un patient Chinois issu d'une famille consanguine (Hua and Wan, 2019).

En 2021, un variant homozygote perte de fonction (c.718-1G>A) dans le gène *NUP210L* a été identifié par WES chez un patient infertile présentant une oligozoospermie, une faible mobilité des spermatozoïdes et une macrozoospermie (Arafah et al., 2021). Contrairement aux défauts dans *AURKC*, la macrozoospermie chez ce patient n'est pas due à un échec de cytokinèse durant la méiose mais à une décondensation extrême de la chromatine. Le même phénotype, bien que plus modéré, avait été observé chez des souris KO pour le gène *Brdt* comme évoqué précédemment (Gaucher et al., 2012). Ce défaut de la spermatogénèse pourrait avoir lieu après la méiose au moment de l'échange des histones avec les protéines de transition. En effet, une coloration des spermatozoïdes de ce patient a permis de montrer la présence d'un taux élevé d'histones. Le patient présentait également de nombreux défauts flagellaires et des spermatozoïdes sans flagelle. Ceci suggère que l'altération de la structure nucléaire empêche la fixation correcte du flagelle. La souris KO, produite dans une autre étude, présente des arrêts partiels de maturation pré-méiotique et méiotique (Walters et al., 2009). Quelques cellules germinales cependant continuent leur différenciation mais présentent une chromatine fortement décondensée et des défauts dans la formation des flagelles. Des études supplémentaires pour caractériser le rôle précis de *NUP210L* dans la méiose et la

spermiogénèse sont cependant nécessaires. Compte tenu de la gravité du phénotype, l'ICSI ne semble pas être recommandable.

Récemment, un variant homozygote perte de fonction (c.1520_1523delAACA) dans le gène *ZMYND15* a été identifié par WES chez un patient d'origine Turc présentant une oligozoospermie sévère, une nécrozoospermie et une macrozoospermie non causée par un variant dans *AURKC* (Kherraf et al., 2022b, p. 15). Pour ce patient l'ICSI a échoué et aucune grossesse n'a pu être obtenue. *ZMYND15* a une expression testiculaire-spécifique et a été décrit comme étant un répresseur transcriptionnel en recrutant des histones désacétylases pour réguler l'expression de nombreux gènes haploïdes. *ZMYND15* joue un rôle important dans la spermatogenèse. En effet, les souris KO pour *Zmynd15* présentent une infertilité due à une ANO. Ceci est dû à une activation précoce de la transcription de gènes haploïdes tels que *Prm1*, *Tnp1*, *Spem1* et *Catsper3* ce qui entraîne une perte des spermatides et une azoospermie (Yan et al., 2010). Chez l'homme, le même variant *ZMYND15* a été associé à la NOA et à l'oligozoospermie sévère chez trois frères d'origine Turc (Ayhan et al., 2014), d'autres variants ont été identifiés chez trois patients non apparentés d'origine Chinoise présentant une oligozoospermie sévère (T.-Y. Hu et al., 2021). Pour l'un des patients Chinois, l'ICSI a été réalisée avec succès. L'oligozoospermie sévère est souvent associée à une tératozoospermie (OATS). En effet, une spermatogenèse altérée produit des spermatozoïdes peu nombreux et anormaux. Ceci montre qu'un même évènement génétique peut mener à des phénotypes différents confirmant qu'il existe un *continuum* phénotypique entre ces anomalies (ANO, oligozoospermie, OATS). Ces erreurs de diagnostic phénotypique mènent alors à un retard de diagnostic génétique. En effet, dans le cas où le phénotype n'est pas un phénotype typique de macrozoospermie, le diagnostic d'*AURKC* est généralement négatif et l'analyse génétique doit donc être étendue.

Très récemment, une étude a établi une corrélation génotype-phénotype afin d'établir un algorithme pour optimiser le diagnostic génétique des patients macrozoospermes (Coudert et al., 2023). Dans cette étude, l'analyse génétique de 156 patients macrozoospermes a été faite, parmi ces patients 90 avait un variant dans *AURKC* et 66 n'avaient pas de diagnostic génétique. Parmi ces 66 patients, le WES a été fait chez 27 patients. De cette façon, une cause génétique chez trois patients de la cohorte présentant des variants homozygotes délétères dans les gènes *MEIKIN*, *ADAD2* et *MDC1* a été identifiée. C'est la première fois que ces gènes étaient 98

rapportés chez l'homme dans ce phénotype. Actuellement, un séquençage ciblé d'*AURKC* est fait pour tous les patients présentant ce phénotype puis en seconde intention, si aucune cause n'a été trouvée, un séquençage de l'exome entier est réalisé. L'objectif de cette étude était de déterminer si les paramètres spermatiques des patients pouvaient permettre de décider entre deux stratégies d'analyse génétique : faire un séquençage ciblé d'*AURKC* en première intention ou faire le séquençage de l'exome directement, soit chez tous les patients, soit chez ceux présentant un phénotype de macrozoospermie atypique. Pour cela, deux groupes de patients ont été constitués selon leur génotype *AURKC* afin de comparer les paramètres spermatiques entre les patients présentant un variant dans *AURKC* et ceux qui n'en ont pas. Le groupe positif pour *AURKC* présentait significativement plus de spermatozoïdes macrocéphales et multiflagellés que l'autre groupe (85% vs. 32%). Ainsi, ce travail a permis de proposer une stratégie optimisée pour l'analyse génétique de routine de la macrozoospermie. En effet, selon cette étude, le séquençage ciblé d'*AURKC* devrait être fait chez les patients présentant plus de 20% de spermatozoïdes macrocéphales et plus de 10% de spermatozoïdes multiflagellés. Pour les patients dont les paramètres sont inférieurs à ces seuils, le séquençage de l'exome devrait être proposé directement.

Les gènes associés à ce phénotype sont répertoriés **Table 5**.

Gène	Nom complet	Locus	Fonction	Phénotype souris	Références
<i>AURKC</i>	Aurora Kinase C	19q13.43	Composant du CPC, régulateur de la mitose.	Mauvais alignement des chromosomes, acrosome anormal, chromatine décondensée	(Ben Khelifa et al., 2012; Dieterich et al., 2007)
<i>ZMYND15</i>	Zinc Finger MYND-Type Containing 15	17p13.2	Répresseur transcriptionnel, rôle dans la spermatogenèse	ANO	(Kherraf et al., 2022b)
<i>NUP210L</i>	Nucleoporin 210 Like	1q21.3	Agit en amont ou dans le développement des cellules de Sertoli et des spermatides.	Arrêts partiels de maturation pré-méiotique et méiotique	(Arafah et al., 2021)
<i>MEIKIN</i>	Meiotic Kinetochore Factor	5q31.1	Code pour une protéine du kinétochore spécifique de la méiose I dont la localisation est médiée par son interaction avec CENP-C.	Les spermatides rondes sont plus grosses en raison d'une absence apparente de méiose II.	(Coudert et al., 2023; Kim et al., 2015)
<i>ADAD2</i>	Adenosine Deaminase	16q24.1	Requis pour la fertilité masculine et la différenciation	Arrêt méiotique	(Coudert et al., 2023; Snyder et al., 2020)

	Domain Containing 2		normale des cellules germinales mâles.		
<i>MDC1</i>	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1	6p21.33	Méiateur du point de contrôle des dommages à l'ADN en facilitant l'amplification et la transduction des signaux de dommages à l'ADN	Retard de croissance, infertilité masculine, déficiences immunitaires, instabilité chromosomique et défauts de réparation de l'ADN	(Coudert et al., 2023; Lou et al., 2006, p. 1)

Table 5. Gènes impliqués dans le phénotype de macrozoospermie (Cazin, GETI, 2023)

d. L'asthénozoospermie

Les défauts morphologiques ou fonctionnels du flagelle spermatique entraînent systématiquement une infertilité masculine due à une motilité réduite (asthénozoospermie) ou absente (akinétopermie) des spermatozoïdes. Etant donné que la structure de l'axonème est conservée entre les cils mobiles et les flagelles, l'asthénozoospermie peut être syndromique et faire partie des dyskinésies ciliaires primaires (DCP ou PCD : « *Primary Ciliary Dyskinesia* ») qui se caractérise par des infections chroniques des voies respiratoires supérieures et inférieures. Par ailleurs, l'asthénozoospermie peut également être isolée. En effet, elle a été mise en évidence chez plusieurs hommes infertiles ne présentant aucun autre symptôme. L'asthénozoospermie et ses degrés de sévérité variables est l'anomalie spermatique la plus fréquemment observée chez les hommes infertiles et est responsable de 80% des cas d'infertilité chez l'homme (Tu et al., 2020b). Dans la plupart des cas, l'étiologie des asthénozoospermies isolées est inconnue. Etant donné que plus de 1000 protéines associées aux structures du flagelle spermatique ont été identifiées chez l'homme (Kumar and Singh, 2021), de nombreux défauts ultra structuraux peuvent avoir une origine génétique. Récemment, avec le développement des outils de génétique moléculaire, plusieurs défauts monogéniques conduisant à l'asthénozoospermie ont été identifiés, le plus souvent associés à des défauts flagellaires mais les causes de l'asthénozoospermie purement fonctionnelle sont encore mal définies. En effet, au vu de la complexité de ce phénotype, la connaissance des causes monogéniques responsables de ce phénotype est encore très limitée. Des patients asthénozoospermes avec des mutations dans les gènes *SEPT12* ou *SLC26A8*, présentant des défauts de l'annulus ou un manchon mitochondrial anormal ont été décrits (Dirami et al., 2013; Kuo et al., 2013). L'asthénozoospermie purement fonctionnelle, sans défauts

morphologiques a été rapportée chez des patients présentant des défauts dans les gènes *GALNTL5*, *CATSPER1-2-ε*, *SLC9C1* (Avenarius et al., 2009; Avidan et al., 2003; Brown et al., 2018; Cavarocchi et al., 2021, p. 1; Takasaki et al., 2014, p. 5). Ces gènes sont rapportés dans la **Table 6**. Ceci montre qu'il ne suffit pas que les spermatozoïdes présentent une morphologie et une structure correcte pour pouvoir féconder l'ovocyte mais il faut également que les voies de signalisation régulant la motilité, le métabolisme et la production d'énergie soient activées correctement.

Nom gène	Locus	Fonction	Variants	Références	Phénotype souris	Références
Septin 12, <i>SEPT12</i>	16p13.3	Protéine de liaison au GTP constitutive de l'annulus	2 mutations hétérozygotes identifiées chez deux patients asthénozoospermes non apparentés	(Kuo et al., 2013)	Arrêt de maturation et défauts flagellaires	(Lin et al., 2009)
Solute carrier family 26 member 8 <i>SLC26A8</i>	6p21.31	Transporteurs d'anions localisés à l'annulus.	Mutations hétérozygotes identifiées chez 3 patients non apparentés.	(Dirami et al., 2013)	Souris males KO infertiles, spermatozoïdes des immotiles	(Touré et al., 2007)
Cation channel sperm-associate d 1 <i>CATSPEAR1</i>	11q13.1	Partie d'un canal cationique médiant le calcium pendant la motilité et la capacité des spermatozoïdes	Mutations identifiées chez deux frères consanguins Iraniens	(Avenarius et al., 2009)	Pas de motilité hyperactive	(Carlson et al., 2005; Ren et al., 2001)
Cation channel sperm-associate d 2 <i>CATSPEAR2</i>	15q13.3	Partie d'un canal cationique médiant le calcium pendant la motilité et la capacité des spermatozoïdes	Mutations identifiées dans une famille Française et 3 familles Iraniennes	(Avidan et al., 2003, p. 2; Zhang et al., 2009)	Pas de motilité hyperactive	(Carlson et al., 2005, p. 2; Quill et al., 2003)

Cation channel sperm-associat e d ϵ <i>CATSPE R</i> ϵ	1q44	Composan t auxiliaire du complexe CatSper, impliqué dans l'hyperacti vation des spermatoz oïdes.	Mutation homozygote délétère chez un patient	(Brown et al., 2018)	/	/
<i>GALNTL5</i>	7q36. 1	Chargeme nt des protéines dans les acrosome s et accumulati on des systèmes ubiquitine - protéaso me autour de l'HTCA	Mutation hétérozygote chez un patient	(Takasaki et al., 2014)	Souris heterozygot e : Motilité réduite	(Takasaki et al., 2014)
Solute carrier family 9 member C1 <i>SLC9C1</i>	3q13. 2	Echangeur Na ⁺ /H ⁺ , impliqué dans la régulation du pH et du volume cellulaire	Mutation homozygote d'épissage chez un patient	(Cavarocch i et al., 2021)	Immotilité totale	(Wang et al., 2003)

Table 6. Liste des gènes identifiés liés à l'asthénozoospermie chez l'homme. (Cazin, GETI, 2023)

e. Les anomalies morphologiques multiples des flagelles spermatisques (AMMF)

L'asthénozoospermie peut être associée à des défauts ultra structuraux du flagelle mais également associée à une nécrozoospermie et diverses anomalies flagellaires. Plus particulièrement, le phénotype des anomalies morphologiques multiples des flagelles spermatisques, connues sous le nom de MMAF (« *Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella* ») comptent parmi les formes les plus sévères d'anomalies du flagelle spermatisque (Ben Khelifa et al., 2014). Il se caractérise par une fréquence accrue d'anomalies flagellaires telles que la présence de spermatozoïdes courts, enroulés, de calibre irrégulier voire absents. La structure de l'axonème est désorganisée avec une perte des microtubules périphériques ou de la paire centrale. Les structures paraxonémales (gaine fibreuse, colonnes longitudinales)

sont également anormales. Ce phénotype est associé à une motilité progressive nulle ou très faible mais une vitalité des spermatozoïdes normale dans la plupart des cas. En 1987, Chemes et al., ont qualifié ce phénotype de DFS (« *Dysplasia of the fibrous sheath* » ou Dysplasie de la gaine fibreuse) étant donné que le principal défaut d'ultrastructure observé était une gaine fibreuse désorganisée (Chemes et al., 1987).

Il a été montré que ce phénotype était génétiquement très hétérogène. En effet une quarantaine de gènes ont été identifiés comme étant causaux d'infertilité liée au phénotype MMAF. La première étude ayant permis d'identifier une cause génétique des MMAF a eu lieu en 2014 (Ben Khelifa et al., 2014). Ben Khelifa *et al.*, ont découvert des mutations dans le gène *DNAH1* (« *dynein axonemal heavy chain 1* ») exprimé majoritairement dans le testicule et codant pour une dynéine axonémale des IDA. Depuis cette étude, avec le développement du NGS et du nombre de cohortes, il y a eu une forte augmentation du nombre de gènes identifiés. En effet, une quarantaine de gènes (répertoriés dans la **Table 7** et **Figure 34**) associés aux MMAF, représentant 30 à 60% des patients atteints (Touré et al., 2020), ont été identifiés tels que *ARMC2* codant pour une protéine contenant des répétitions armadillo, *FSIP2* codant pour une protéine d'interaction de la gaine fibreuse, les gènes codant pour la chaîne lourde axonémale de la dynéine (*DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH6*, *DNAH8*, *DNAH17*) ou encore les gènes codant pour les protéines associées aux cils et aux flagelles (*CFAP43*, *CFAP44*, *CFAP65*, *CFAP69*, *CFAP70*, *CFAP75*, *CFAP251*) entre autres. Parmi ces gènes, 24 ont des mutations qui peuvent causer d'autres maladies (DCP, ciliopathies...) (**Figure 34**). Cependant, environ la moitié des patients restent sans diagnostic, ce qui démontre la grande hétérogénéité génétique de ce phénotype. Le développement des connaissances sur les causes génétiques de ce phénotype permet d'optimiser les soins médicaux et la prise en charge des hommes infertiles montrant l'importance de poursuivre l'effort d'identification de nouvelles mutations et de nouveaux gènes dans ce phénotype.

La technique d'AMP la plus appropriée pour les patients présentant un phénotype MMAF est la technique d'ICSI en raison de la mobilité effondrée des spermatozoïdes. Le plus souvent, la sévérité du phénotype MMAF n'altère pas les résultats d'ICSI (Ferreux et al., 2021), cependant des cas d'échec subsistent qui peuvent être expliqués un défaut de développement embryonnaire (J. Wang et al., 2022b). Par exemple, *CEP135* est un gène qui code pour une protéine essentielle à la formation des centrioles, par conséquent il a un rôle dans la division

cellulaire et le développement embryonnaire expliquant potentiellement l'échec d'ICSI pour les patients porteurs de variants dans ce gène (González-Martínez et al., 2021). C'est pourquoi le diagnostic génétique est important, voire indispensable pour les patients atteints de MMAF afin d'éviter les échecs potentiels d'ICSI.

Un tableau détaillé présentant les différents variants retrouvés dans chaque gène ainsi que les résultats d'ICSI est présenté en annexe 1 (**Table supplémentaire 3**).

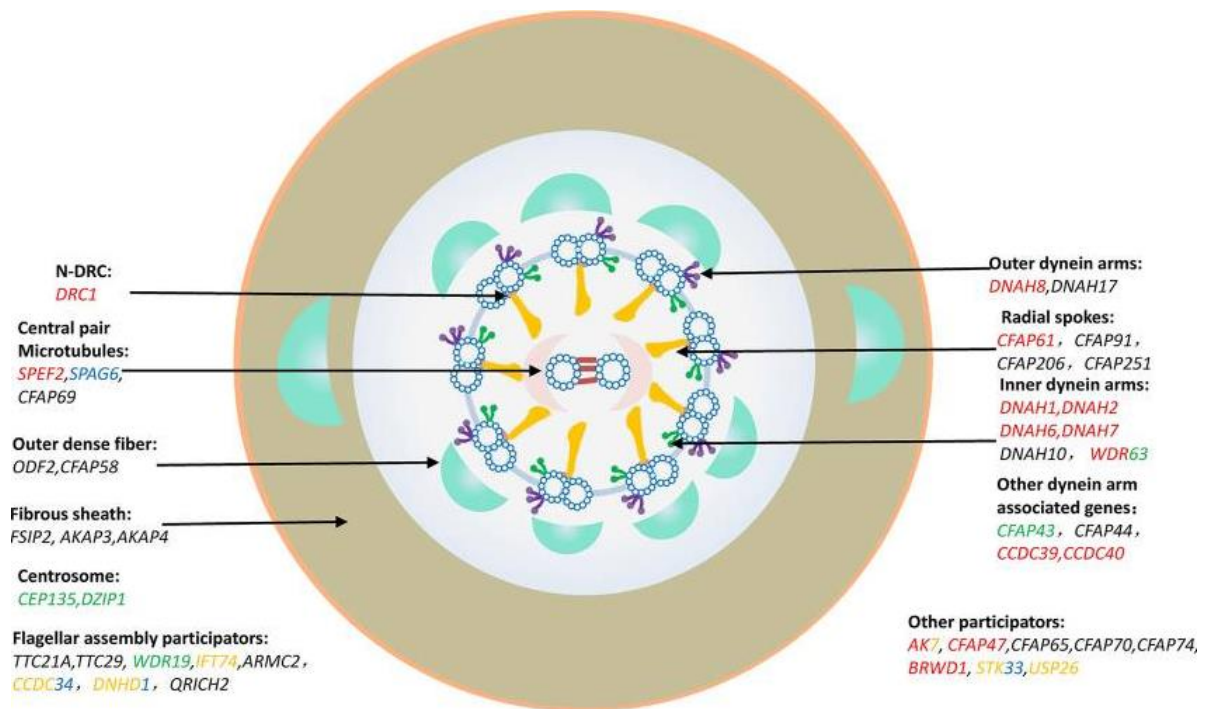


Figure 34. Gènes causaux des MMAF. Classification et description des gènes pathogènes des MMAF par structure et mécanisme d'affectation des protéines. Les gènes marqués en rouge sont impliqués dans les DCP, en vert dans les troubles neurologiques, en bleu dans la tumorigenèse, en jaune dans des conditions génétiques rares. Tiré de la publication (J. Wang et al., 2022b).

Gene	Nom complet	Locus	DCP	Modèles mutants	Réf.
Complexes des bras de dynéine interne et externe (IDA, ODA)					
<i>DNAH1</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 1	3p21.1	Non	Souris : asthénozoospermie (Neesen et al., 2001)	(Amiri-Yekta et al., 2016; Ben Khelifa et al., 2014; H.-Y. Hu et al., 2021; Jiang et al., 2021; R. Khan et al., 2021; Wambergue et al., 2016; M. Wang et al., 2022; X. Wang et al., 2017; Yu et al., 2021; Zhuang et al., 2022)
<i>DNAH2</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 2	17p13.1	Non	Souris : MMAF (Hwang et al., 2021)	(Gao et al., 2021; Hwang et al., 2021; Y. Li et al., 2019)
<i>DNAH8</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 8	6p21.2	Oui	Souris : MMAF (C. Liu et al., 2020b)	(Dil et al., 2022; C. Liu et al., 2020b; Weng et al., 2021; Yang et al., 2020)
<i>DNAH10</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 10	12q24.31	Non	Souris : MMAF (Tu et al., 2021)	
<i>DNAH17</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 17	17q25.3	Non	Souris : MMAF (B. Zhang et al., 2021)	(Z. Liu et al., 2022; Y. Sha et al., 2019b; B. Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2021)
<i>DRC1</i>	Dynein Regulatory Complex Subunit 1	2p23.3	Oui	Souris : MMAF (J. Zhang et al., 2021)	(Lei et al., 2022, p. 1; Y. Liu et al., 2022, p. 1; J. Zhang et al., 2021)
Complexes associés aux IDA					
<i>CCDC39</i>	Coiled-Coil Domain Containing 39	3q26.33	Oui	/	(D. Chen et al., 2021, p. 39)
<i>CCDC40</i>	Coiled-Coil Domain Containing 40	17q25.3	Oui	/	(Y. Xu et al., 2022)
<i>CFAP43</i>	Cilia and Flagella associated protein 43	10q25.1	Non	Souris : MMAF (Tang et al., 2017)	(Coutton et al., 2018, p. 43; I. Khan et al., 2021b; Y.-W. Sha et al., 2019b; Tang et al., 2017, p. 43; H. Wu et al., 2019)
<i>CFAP44</i>	Cilia and Flagella associated protein 44	2q35	Non	Souris : asthénozoospermie (Coutton et al., 2018, p. 44) et MMAF (Tang et al., 2017, p. 44)	(Coutton et al., 2018, p. 43; Y.-W. Sha et al., 2019b; Tang et al., 2017, p. 43; H. Wu et al., 2019)
<i>CFAP65</i>	Cilia and Flagella associated protein 65	2q35	Non	Souris : MMAF (W. Li et al., 2020)	(W. Li et al., 2020; X. Zhang et al., 2019)
<i>DNAI3</i>	Dynein axonemal intermediate chain 3	1p22.3	Non	Souris : MMAF (S. Lu et al., 2021)	(S. Lu et al., 2021)
Complexes associés aux ODA					
<i>CFAP70</i>	Cilia and Flagella associated protein 70	10q22.2	Non	/	(Beurois et al., 2019)

Complexe des ponts radiaires					
<i>CFAP61</i>	Cilia and Flagella associated protein 61	20p11.23	Non	Souris : MMAF (Huang et al., 2020)	(Ma et al., 2022)
<i>CFAP91</i>	Cilia and Flagella associated protein 91	3q13.33	Non	Trypanosome	(Martinez et al., 2020)
<i>CFAP206</i>	Cilia and Flagella associated protein 206	6q15	Non	Souris : MMAF (Shen et al., 2021)	(Shen et al., 2021)
<i>CFAP251</i>	Cilia and Flagella associated protein 251	12q24.31	Non	/	(Auguste et al., 2018; Kherraf et al., 2018a, p. 66; W. Li et al., 2019; J. Wang et al., 2022c)
Structures péri-axonémales					
<i>AK7</i>	Adenylate Kinase 7	14q32.2	Non	Souris : MMAF (Lorès et al., 2018) et PCD (Fernandez-Gonzalez et al., 2009)	(Lorès et al., 2018; Xiang et al., 2022b)
<i>AKAP3</i>	A-Kinase Anchoring Protein 3	12p13.32	Non	/	(Liu et al., 2023)
<i>CFAP58</i>	Cilia and Flagella associated protein 58	10q25.1	Non	Souris : asthénotérazoospermie (He et al., 2020)	(Yankun Sha et al., 2021)
<i>FSIP2</i>	Fibrous Sheath Interacting Protein 2	2q32.1	Non	/	(Hou et al., 2022, p. 2; M. Liu et al., 2021, p. 2; Martinez et al., 2018; Yuan et al., 2022, p. 2)
<i>ODF2</i>	Outer Dense Fiber Protein 2	9q34.11	Non	Souris : SSA (Ito et al., 2019)	(Zhu et al., 2022)
Centrosome					
<i>CEP135</i>	Centrosomal protein 135	4q12	Non	/	(Sha et al., 2017)
<i>DZIP1</i>	DAZ interacting zinc finger protein 1	13q32.1	Non	Souris : MMAF (Lv et al., 2020)	(Lv et al., 2020)
Transport intra-flagellaire (IFT)					
<i>CCDC34</i>	Coiled-Coil Domain Containing 34	11p14.1	Non	Souris : MMAF (Cong et al., 2021)	(Cong et al., 2021)
<i>CFAP69</i>	Cilia and Flagella associated protein 69	7q21.13	Non	Souris : MMAF (Dong et al., 2018; He et al., 2019)	(Dong et al., 2018; He et al., 2019)
<i>IFT74</i>	Intra Flagellar Transport 74	9p21.2	Non	Souris : asthénotérazoospermie (Shi et al., 2019)	(Lorès et al., 2021)
<i>SPEF2</i>	Sperm flagellar protein 2	5p13.2	Oui	Souris : MMAF (Tu et al., 2020a, p. 2)	(C. Liu et al., 2020a; Wensheng Liu et al., 2019, p. 2; Y. Sha et al., 2019a; Tu et al., 2020a)

<i>TTC21A</i>	Tetratricopeptide Repeat Domain 21A	3p22.2	Non	Souris : MMAF (Wangjie Liu et al., 2019, p. 21)	(G. Liu et al., 2022; Wangjie Liu et al., 2019)
<i>TTC29</i>	Tetratricopeptide Repeat Domain 29	4q31.22	Non	Souris : asthénotérazoospermie (Lorès et al., 2019, p. 29)	(S. Dai et al., 2022; Chunyu Liu et al., 2019; Lorès et al., 2019)
<i>WDR19</i>	WD Repeat Domain 19	4p14	Oui	/	(Ni et al., 2020)
Complexe de dégradation des protéines					
<i>QRICH2</i>	Glutamine-rich protein 2	17q25.1	Non	Souris : MMAF (Shen et al., 2019b)	(Kherraf et al., 2019, p. 2; Shen et al., 2019b)
Rôle non défini					
<i>ARMC2</i>	Armadillo Repeat Containing 2	6q21	Non	Souris : MMAF (Coutton et al., 2019, p. 2)	(Coutton et al., 2019; I. Khan et al., 2021a; J. Wang et al., 2022a)
<i>BRWD1</i>	bromodomain and WD repeat domain containing 1	21q22.2	Oui	/	(Guo et al., 2021, p. 1)
<i>CFAP47</i>	Cilia and Flagella associated protein 47	Xp21.1	Non	Souris : asthénotérazoospermie (C. Liu et al., 2021)	(C. Liu et al., 2021)
<i>CFAP74</i>	Cilia and Flagella associated protein 74	1p36.33	Non	/	(Sha et al., 2020b)
<i>DNHD1</i>	Dynein Heavy Chain Domain 1	11p15.4	Non	Souris : MMAF (C. Tan et al., 2022)	(Martinez et al., 2023, p. 1; C. Tan et al., 2022)
<i>SPAG6</i>	Sperm-associated antigen 6	10p12.2	Oui	/	(C. Xu et al., 2022)
<i>STK33</i>	Serine/threonine kinase 33	11p15.4	Non	Souris : MMAF (Martins et al., 2018, p. 33)	(Ma et al., 2021, p. 33)

Table 7. Liste des gènes et variants impliqués dans le phénotype MMAF (Cazin, GETI, 2023)

f. Les échecs de fécondation

L'infertilité masculine est parfois due à des échecs d'activation ovocytaire et par conséquent des échecs de fécondation. En effet, l'activation de l'ovocyte dépend de la libération d'enzymes spermatiques qui déclenchent des oscillations calciques au moment de la fécondation. Des mutations dans le gène *PLCZ1* ont été décrites chez des patients avec une infertilité idiopathique suite à un échec d'activation ovocytaire. Comme évoqué précédemment, l'échec d'activation ovocytaire liée à un défaut d'expression de *PLCZ1* est souvent retrouvé chez les patients présentant une globozoospermie. Cependant, une mutation a été identifiée dans *PLCZ1* chez deux frères issus d'une famille consanguine sans altération morphologique de leurs spermatozoïdes (Escoffier et al., 2016) (**Table 8**). Cette mutation altère l'adressage de la protéine à l'acrosome et la protéine n'est pas présente sur les spermatozoïdes de ces sujets. D'autres études ont permis d'identifier des mutations dans *PLCZ1* chez des hommes infertiles ne présentant pas de défauts morphologiques de leurs spermatozoïdes mais un échec de fécondation après ICSI. En effet, depuis 2020, 7 mutations bi-alléliques dans *PLCZ1* délétères sur la fonction de la protéine ont été identifiés chez 8 patients (**Table 8**) (Peng et al., 2023; Yan et al., 2020; Yuan et al., 2020). Les échecs d'ICSI peuvent être palliés grâce à une activation artificielle des ovocytes et l'ICSI a pu être réalisée avec succès chez 6 patients (Peng et al., 2023, p. 1; Yan et al., 2020, p. 1). Dans l'étude de Peng et al., en 2023 (Peng et al., 2023), une mutation homozygote a été identifiée chez un patient présentant une polyspermie après une FIV et une mutation hétérozygote composite a été identifiée chez un patient présentant un échec de fécondation après ICSI, montrant ainsi que des mutations dans *PLCZ1* peuvent provoquer une polyspermie ainsi qu'un échec de fécondation.

Depuis 2020 d'autres mutations dans des gènes menant à un échec de fécondation ont été identifiées et sont répertoriées (**Table 8**), cependant les patients présentaient tous une tératozoospermie excepté un patient avec un variant dans le gène *DNAH17*.

En effet, trois variants homozygotes dans le gène *ACTL9* ont été identifiés chez 3 patients parmi 21 présentant un échec de fécondation après ICSI (Dai et al., 2021, p. 9). Ces variants entraînent une ultrastructure anormale de la thèque périnucléaire et une localisation aberrante de PLCZ à la jonction tête flagelle, expliquant l'échec d'activation ovocytaire et

l'échec de fécondation. Le modèle mutin présentait le même phénotype que les patients. Suite à l'ajout de calcium ionophore lors de l'ICSI, celle-ci a pu être réalisée avec succès.

De la même façon, un variant hétérozygote composite dans le gène *ACTL7A* a été identifié chez un patient présentant ce phénotype (Wang et al., 2021, p. 7). Les patients présentaient également une expression de PLC ζ significativement réduite et leurs spermatozoïdes présentaient des défauts ultra-structuraux dans l'acrosome et la thèque périnucléaire. L'ICSI a pu être réalisée avec succès après ajout de calcium ionophore. Un variant homozygote dans ce gène avait été identifié en 2020 chez deux frères infertiles présentant des paramètres spermatiques normaux mais un arrêt de développement embryonnaire précoce après ICSI (Xin et al., 2020). L'analyse ultra-structurale des spermatozoïdes a permis de mettre en évidence des défauts ultra-structuraux de l'acrosome et le modèle murin présentait les mêmes défauts. Les spermatozoïdes des patients présentaient une expression réduite et une localisation anormale de PLC ζ . Pour ces patients, l'activation artificielle de l'ovocyte a permis de réaliser l'ICSI avec succès.

En 2021, un variant hétérozygote composite dans le gène *DNAH17* a été identifié chez un patient présentant une infertilité primaire liée à un échec de fécondation après deux cycles d'ICSI, sans anomalie spermatiques (Jia et al., 2021). *DNAH17* code pour une protéine des bras de dynéine externe du flagelle spermatique et son expression est testiculaire. Des variants dans *DNAH17* ont été reportés chez des patients présentant un phénotype MMAF (**Table 7**). Ces données montrent l'importance des variants dans ce gène et leur implication dans l'infertilité masculine primaire.

En 2022, Dai *et al.*, (J. Dai et al., 2022) ont identifié deux variants homozygotes dans le gène *IQCN* chez deux patients parmi une cohorte de 42 hommes infertiles présentant un échec de fécondation après ICSI. Les structures acrosomales des spermatozoïdes étaient anormales chez les deux hommes présentant la mutation dans *IQCN*. Les souris KO pour ce gène, générées à l'aide de CRISPR-Cas9, présentaient le même phénotype que l'homme. Ils ont ainsi pu établir qu'*IQCN* régule la nucléation des microtubules pendant l'assemblage de la manchette par l'intermédiaire de la calmoduline, jouant ainsi un rôle important dans la spermatogenèse. De fait, un variant délétère dans *IQCN* peut entraîner une déformation de la tête du spermatozoïde et ainsi une localisation aberrante de PLC ζ à la jonction tête-flagelle.

L'activation ovocytaire artificielle a permis de surmonter les échecs de fécondations auxquels faisaient face ces patients.

Aujourd'hui, des variants pathogéniques dans dix gènes exprimés dans les spermatozoïdes ou les ovocytes sont recherchés en routine (*PLCZ1*, *ACTL7A*, *ACTL9*, *DNAH17*, *IQCN*, *WEE2*, *TUBB8*, *NLRP5*, *ZP2*, *TLE6*) (Xue et al., 2022).

Gène	Nom complet	Locus	Variant	Références
<i>PLCZ1</i>	Phospholipase C Zeta 1	12p12.3	(c.1465A>T; p.Ile489Phe)	(Escoffier et al., 2016)
			c.588C>A ; p. C196*	(Yan et al., 2020)
			c.1151C>T (p.A384V)	
			c.588C>A (p. C196*) & c.830T>C (p.L277P)	
			c.1129_1131delAAT (p.N377del) & c.1733T>C (p.M578T)	
			c.570+1G>T & c.1344A>T (p.K448N)	
			c.1658 G>C; p. R553P	(Yuan et al., 2020)
c.2 T > C (p.Met1Thr) & c.590G > A (p.Arg197His)	(Peng et al., 2023)			
<i>ACTL7A</i>	Actin Like 7 A	9q31.3	c. [463C>T] ; [1084G>A], p. [(Arg155Ter)] ; [(Gly362Arg)]	(Wang et al., 2021, p. 7)
			c.733G>A ; p.Ala245Thr	(Xin et al., 2020)
<i>ACTL9</i>	Actin Like 9	19p13.2	c.1034C>T p.Ser345Leu	(Dai et al., 2021, p. 9)
			c.1138G>T p.Val380Leu	
			c.1209C>G p.Tyr403Ter	
<i>DNAH17</i>	Dynein Axonemal Heavy Chain 17	17q25.3	(c.1048 C > T & c.3390G > A; p.Arg350* & p.Met1130Ile.)	(Jia et al., 2021)
<i>IQCN</i>	IQ motif Containing N	19p13.11	c.910C > T [p.Gln304Ter]	(J. Dai et al., 2022)
			c.2453_2454del [p.Gln818Argfs*9]	

Table 8. Gènes impliqués dans le phénotype d'échec de fécondation chez l'homme (Cazin, GETI, 2023)

Objectifs de la thèse

L'identification de nouveaux gènes candidats responsables de l'infertilité chez l'homme est primordiale pour mieux comprendre l'étiologie génétique de cette pathologie. Etant donné que des milliers de gènes sont impliqués dans la spermatogénèse et potentiellement impliqués dans différents phénotypes d'infertilité, leur identification et leur interprétation est difficile. Cependant, grâce aux techniques de séquençage à haut débit, cette identification est en constante augmentation.

Ainsi, les objectifs de cette thèse sont multiples, tout d'abord **l'objectif principal** a été d'identifier des variants délétères dans des nouveaux gènes associés à l'infertilité masculine. Ce dépistage génétique est pertinent pour sa valeur diagnostique, la prise de décision clinique et le conseil génétique approprié. Dans ce contexte et dans le cas des ANO particulièrement j'ai pu développer une nouvelle stratégie diagnostique et pronostique pour prédire les chances de succès de la TESE selon la prédiction génotype/phénotype testiculaire. Pour cela, nous avons mis en place deux bases de données, la première est une liste de gènes candidats causaux de l'ANO selon les informations fournies dans la littérature. La seconde est une corrélation génotype/phénotype testiculaire et la chance de récupération des spermatozoïdes testiculaires par TESE. Cette technique innovante et efficace est déjà appliquée au CHU de Grenoble. Ensuite, **le second objectif** a été de valider l'implication des altérations géniques d'interprétation incertaine ou dans des gènes candidats forts mais non validés pour leur implication dans l'infertilité. Ceci a pu être réalisé par l'utilisation de modèles murins en mimant au mieux les altérations génétiques des patients grâce à l'outil CRISPR/Cas9. Enfin, **le troisième objectif** de cette thèse a été d'évaluer la pertinence et le rendement diagnostique de la stratégie de séquençage exomique dans l'investigation génétique du patient infertile. **Au total**, cette thèse a pour but de participer au développement de la génomique de la reproduction et d'améliorer la prise en charge de l'infertilité.

Partie 2 : Etude Expérimentale

Chapitre I. Les patients et méthodes principales

Dans ce chapitre, je décrirai les méthodes principales utilisées lors de cette thèse et le processus de recrutement des patients au laboratoire ainsi que le pipeline bio-informatique utilisé pour interprétation des variants. Les méthodes non décrites dans ce chapitre seront décrites dans les articles (Partie 2, Chapitre II et III).

I. Le recrutement des patients

Les patients en parcours d'AMP présentant une infertilité primaire sont adressés au laboratoire pour investigation génétique. Tous les patients ont une consultation médicale et une analyse de leur sperme. Le consentement de tous les patients participant à nos études est obtenu selon les principes de la Déclaration d'Helsinki. Nos études sont approuvées par des comités d'éthique locaux et les échantillons des patients sont conservés à la CRB Germethèque (certification ISO-9001 et NF-S 93-900) selon une procédure standardisée ou font partie de la collection de la Fertithèque déclarée au ministère français de la santé (DC-2015-2580) et à la Commission nationale de l'informatique et des libertés. Nos patients sont originaires majoritairement de France (46%), de Tunisie (35%) et d'Iran (19%).

Au cours de cette thèse j'ai travaillé sur différentes cohortes de patients répartis par phénotypes tels que l'ANO, le SSA, le syndrome d'AMMF, la macrozoospermie et la globozoospermie. La majorité de nos patients présentent une ANO. A ce jour, les cohortes regroupant le plus de patients pour lesquels un séquençage exomique a été réalisé sont les cohortes ANO (n=245) et AMMF (n=192). En ce qui concerne les patients ANO, jusqu'en 2022 nous avons étudié 96 patients de cette cohorte, non apparentés, originaires de Tunis qui avaient tous bénéficié d'une TESE (Kherraf et al., 2022a). Les patients présentant un phénotype MMAF sont au nombre de 192, mais le nombre de patients inclus dans les études auxquelles j'ai participé était de 167 (Beurois et al., 2019; Cong et al., 2021; W. Li et al., 2020; C. Liu et al., 2020b; S. Liu et al., 2021; Lorès et al., 2019, 2021; Martinez et al., 2020, 2023; Shen et al., 2021).

II. Le séquençage Sanger

La méthode de séquençage Sanger, développée en 1977 par F. Sanger (Sanger et al., 1977), repose sur le processus de réplication de l'ADN. Cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce (oligonucléotide) dont la séquence est complémentaire d'une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation se fait par une polymérase (appelé fragment de Klenow) et les quatre dNTP (désoxyribonucléotides dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ainsi qu'une faible concentration de ddNTP (didésoxyribonucléotides ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) sont ajoutés. Ces ddNTP, dépourvu d'extrémité 3'-OH, empêchent la poursuite de l'élongation une fois incorporés dans le nouveau brin. Un mélange de fragments d'ADN de différentes tailles se terminant à un nucléotide précis est ainsi obtenu. Ceci permet de repérer la position des différents nucléotides dans la séquence grâce à une séparation de ces fragments par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La détection des fragments synthétisés se fait en incorporant un marqueur fluorescent.

Au cours de cette thèse, j'ai utilisé cette technique afin de valider les variants identifiés par WES.

III. Le séquençage à haut débit (HTS)

L'arrivée du séquençage de haut débit (*HTS, High Throughput Sequencing*) ou séquençage de nouvelle génération (*NGS, Next Generation Sequencing*) en 2005 et son accessibilité à partir de 2010, a grandement changé le paysage des analyses génétiques. Le NGS a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des maladies monogéniques et fait désormais partie intégrante du diagnostic génétique. Le NGS est une méthode de séquençage massivement parallèle de lectures courtes ou « *short-read* » de millions de molécules d'ADN (T. Hu et al., 2021) qui accélère considérablement le processus et réduit son coût à grande échelle. Plusieurs étapes composent le NGS, la première étant la fragmentation de l'ADN, la préparation d'une banque d'ADN par ligation d'adaptateurs puis l'amplification des fragments et séquençage émettant des signaux convertis ensuite en information de séquence (**Figure 35**). L'analyse des données de séquençage se fait grâce à l'utilisation d'outils bio-informatiques et comporte plusieurs étapes : l'étape de détermination des bases (*base calling*), l'étape de filtrage, l'étape d'alignement, l'étape d'analyse de la profondeur de lecture

et de la couverture de séquence, l'étape d'identification des variants (*variant calling*) et enfin l'étape d'annotation.

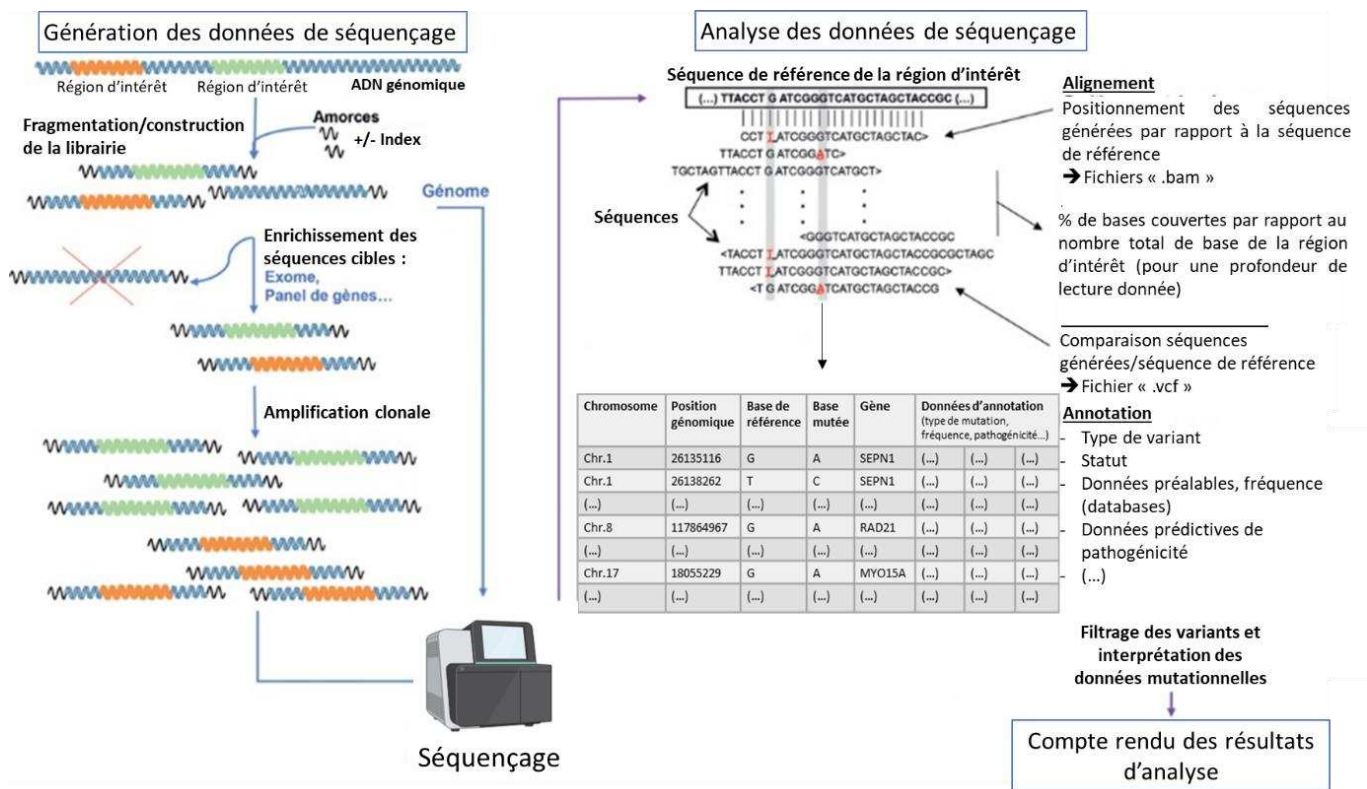
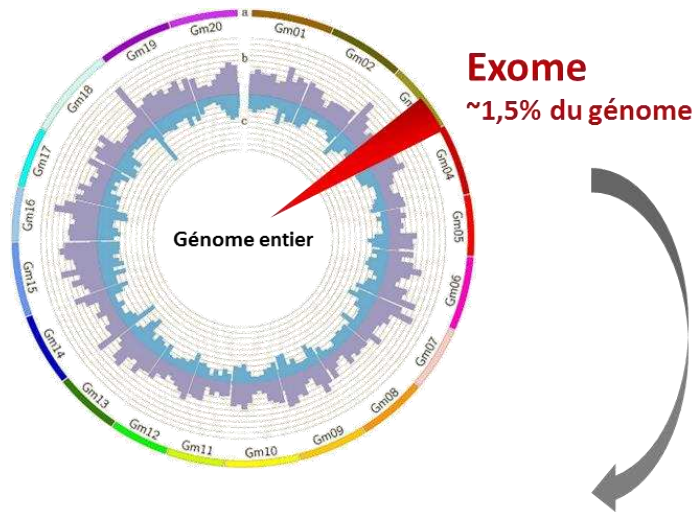


Figure 35. Principales étapes du NGS

Trois principales stratégies d'analyses mutationnelles sont actuellement utilisées : l'analyse de panels de gènes, l'analyse de l'exome entier (*WES, Whole Exome Sequencing*) et l'analyse du génome entier (*WGS, Whole Genome Sequencing*) (Krahn et al., 2016).

L'analyse limitée à un panel de gènes est une analyse simultanée de séquences de régions codantes (exons) de gènes d'intérêt et des bornes introniques flanquantes. Il s'agit de l'approche la plus utilisée en diagnostic pour analyser des gènes connus impliqués dans certaines pathologies. Certains panels sont répertoriés dans la base de données OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, www.omim.org), il s'agit de larges panels de gènes répertoriés comme étant impliqués dans la pathologie humaine.

L'analyse de l'exome (*WES* : « *Whole Exome Sequencing* ») correspond à l'analyse de toutes les séquences codantes du génome ou exons, et des bornes introniques flanquantes. On considère que ces régions représentent environ 1,5% (~30 Mb) du génome mais que 89% des variants pathogéniques y sont retrouvés (Barbitoff et al., 2020) (Figure 36).



- Limité aux séquences codantes
- Détecte 89% des variants pathogéniques
- Coût < séquençage génomique

Figure 36. Le séquençage exomique (Kherraf, GETI, 2023)

Certains laboratoires utilisent cette analyse puis restreignent leur analyse par filtrage à une liste de gènes d'intérêt en première intention. Cette analyse générant en moyenne 30 000 variants par individu, la difficulté est d'identifier un variant pathogénique. Le traitement et l'analyse bio-informatique est essentielle. L'annotation des variants permet de regrouper les informations sur le type de variant, s'il est homo-/hémi-/hétérozygote, sa fréquence, les données prédictives de pathogénicité etc. Ces informations permettent ensuite d'appliquer des filtres de tri afin de conclure, si possible, sur l'implication d'un variant dans la pathologie étudiée. Les principaux filtres de tri portent sur le mode d'hérédité du variant (dominant, récessif, lié au chromosome X), la fréquence allélique dans la population générale (< 1%), la présence du variant chez des individus sains, la fonction et profil d'expression du gène et la pathogénicité du variant. Selon les données les variants sont classés selon leur degré de pathogénicité allant de la classe 1 (bénin) à la classe 5 (pathogène) selon les critères de recommandations de l'ACMG (Richards et al., 2015) (**Table supplémentaire 1**). Des analyses fonctionnelles peuvent être nécessaires pour confirmer l'implication d'un variant dans la pathologie. Le rendement diagnostique est de l'ordre de 20 à 40% selon les pathologies (Clark et al., 2018) et parfois même supérieur à 50%. L'utilisation du séquençage génomique (WGS : « *Whole Genome Sequencing* ») correspondant à l'analyse du génome entier (3 Gb), peut

améliorer ce rendement comme par exemple dans le cas comme les mutations introniques profondes non détectables par exome. Cependant, la quantité de données générée est cent fois plus élevée que pour l'analyse de l'exome et l'interprétation est encore très difficile mais cette technique reste prometteuse.

Au cours de cette thèse, la méthode utilisée pour l'identification de nouveaux gènes et variant a été le WES. Un pipeline développé par Nicolas Thierry-Mieg a été utilisé pour analyser les données et trier les variants.

IV. Le pipeline bioinformatique développé pour l'analyse de nos patients

L'ADN génomique est isolé à partir de sang EDTA. Les données génétiques sont obtenues auprès de différents centres de séquençage, notamment Novogene, Macrogen, Integragen et la plateforme de séquençage du CHU Grenoble-Alpes. Les régions codantes et les bornes introniques sont alors séquencées. Le génome de référence utilisé pour l'alignement est la version GRCh38. Le pipeline utilisé est détaillé dans l'article 1 (Partie 2, Chapitre II) et a été développé par le Dr Nicolas Thierry Mieg, chargé de recherche en bioinformatique, en étroite collaboration avec l'équipe GETI. Pour rendre l'analyse possible, chaque variant est annoté pour prédire son impact *via* le logiciel *Variant Effect Predictor*. Ceci permet de filtrer les variants à faible impact et de donner la priorité aux variants à fort impact tels que les variant perte de fonction qui entraînent la survenue précoce d'un codon stop par mutation ponctuelle par un décalage du cadre de lecture « *frameshift* ». Les données d'expression tissulaires issues de la base de données GTex (www.gtexportal.org) sont ajoutées. Les variants avec une fréquence allélique mineure > 1% dans gnomAD, > 3% dans 1000 Genome Project ou > 5% dans NHLBI ESP6500 sont écartés. Les variants sont également comparés à ceux obtenus chez d'autres individus. Ces contrôles peuvent être des contrôles sains ou des patients présentant des phénotypes différents traités avec le même pipeline. De cette façon, les patients présentant un phénotype d'ANO ou d'AO par exemple peuvent être contrôles des patients présentant un phénotype d'AMMF, de SSA et de globozoospermie et inversement. En effet, comme évoqué lors de l'étude bibliographique, un *continuum* phénotypique est possible (Martinez et al., 2022b, p. 20), un patient recruté comme présentant un phénotype de globozoospermie, par exemple, peut également être recruté comme présentant un phénotype de SSA. C'est pourquoi tous les phénotypes ne peuvent pas être contrôle d'un

autre. Ainsi les variants sont triés selon : leur génotype ; s'ils sont retrouvés à l'état hétérozygote et homozygote chez les contrôles négatifs, chez les contrôles du même phénotype et chez les contrôles de phénotypes différents ; leur impact sur la protéine et le type de mutation ; leur fréquence allélique dans la population (gnomAD) ; l'expression tissulaire du gène (GTEx) ; la prédiction de l'impact du variant (SIFT, Polyphen CADD...) et la prédiction de l'impact sur l'épissage (SpliceAI) (**Figure 37**). L'avantage de ce pipeline est que les données de tous les patients sont regroupées, il est donc possible d'identifier des variants rares dans des gènes inconnus présents chez plusieurs de nos patients. Par exemple, nous avons pu identifier une même délétion dans le gène *CFAP251* chez 12 patients avec le syndrome AMMF sur 192 patients (6%) et une délétion dans le gène *DPY19L2* chez 7 patients globozoospermes sur 45 patients (16%).

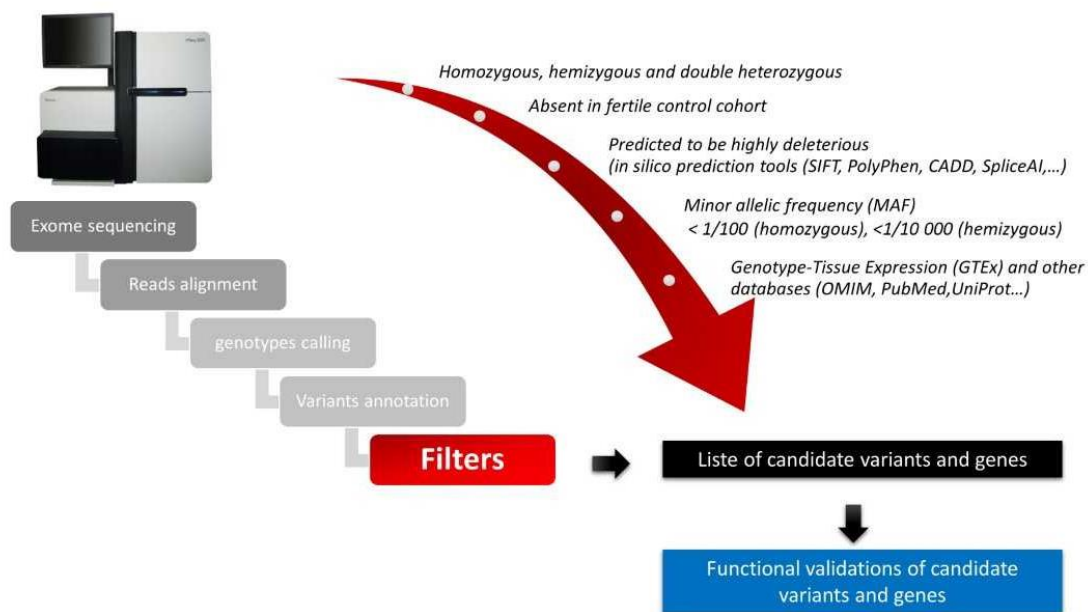


Figure 37. Le tri des variants après séquençage exomique (GETI, 2023)

V. Le système CRISPR/Cas9 pour la validation fonctionnelle des gènes et variants dans le modèle murin

Afin de valider certains variants de signification incertaine ou certains gènes dont la fonction n'est pas connue, nous avons eu recours au modèle murin entre autres. Ce modèle est très utilisé en recherche en raison de son homologie génétique avec l'homme et de la similarité

des processus physiologiques et moléculaires. Afin d'invalider ou de déléter un gène dans ce modèle, nous avons recours à la technologie CRISPR/Cas9.

Le système CRISPR/Cas9 est un mécanisme de défense immunitaire des archaebactéries. Il comprend plusieurs éléments clés, notamment l'enzyme Cas9 et un ARN guide (gRNA). L'enzyme Cas9 est une endonucléase capable de couper l'ADN à un site spécifique, tandis que le gRNA est une molécule courte d'ARN permettant de diriger la Cas9 vers une séquence d'ADN cible spécifique. Les séquences CRISPR, quant à elles, sont des séquences palindromiques répétées. En plus du gRNA, la Cas9 nécessite la reconnaissance d'un motif PAM (« *Protospacer Adjacent Motif* »), une séquence de trois nucléotides adjacents à l'extrémité 3' du brin complémentaire de la séquence cible. Le gRNA et la Cas9 sont alors introduits par micro-injection ou par électroporation dans la cellule (zygote ou lors de l'ICSI en même temps que le spermatozoïde dans l'ovocyte). Une fois dans la cellule, la Cas9 est guidée vers le PAM par le gRNA afin d'induire une cassure double brin. Cette cassure mène alors à plusieurs types de réparations tels que le NHEJ (« *non homologous end joining* ») qui est un système de réparation aléatoire et le HDR (« *homology-directed repair* ») qui est un système de réparation dirigée (**Figure 38**). Le NHEJ peut entraîner des mutations aléatoires ainsi qu'un décalage du cadre de lecture et donc mener à un ARN instable pouvant être dégradé par le système NMD (« *non sense mediated mRNA decay* ») ou produire une protéine tronquée non fonctionnelle. Le mécanisme de réparation HDR quant à lui, permet de réaliser une réparation fidèle ou introduire un changement spécifique (délétion, insertion ou substitution désirée) dans la séquence nucléotidique cible. Le système de réparation HDR permet donc de produire des modèles cellulaires ou animaux *knock-in*. Pour cela, une matrice d'ADN simple brin homologue à la séquence ciblée doit être co-injectée afin de permettre une réparation dirigée.

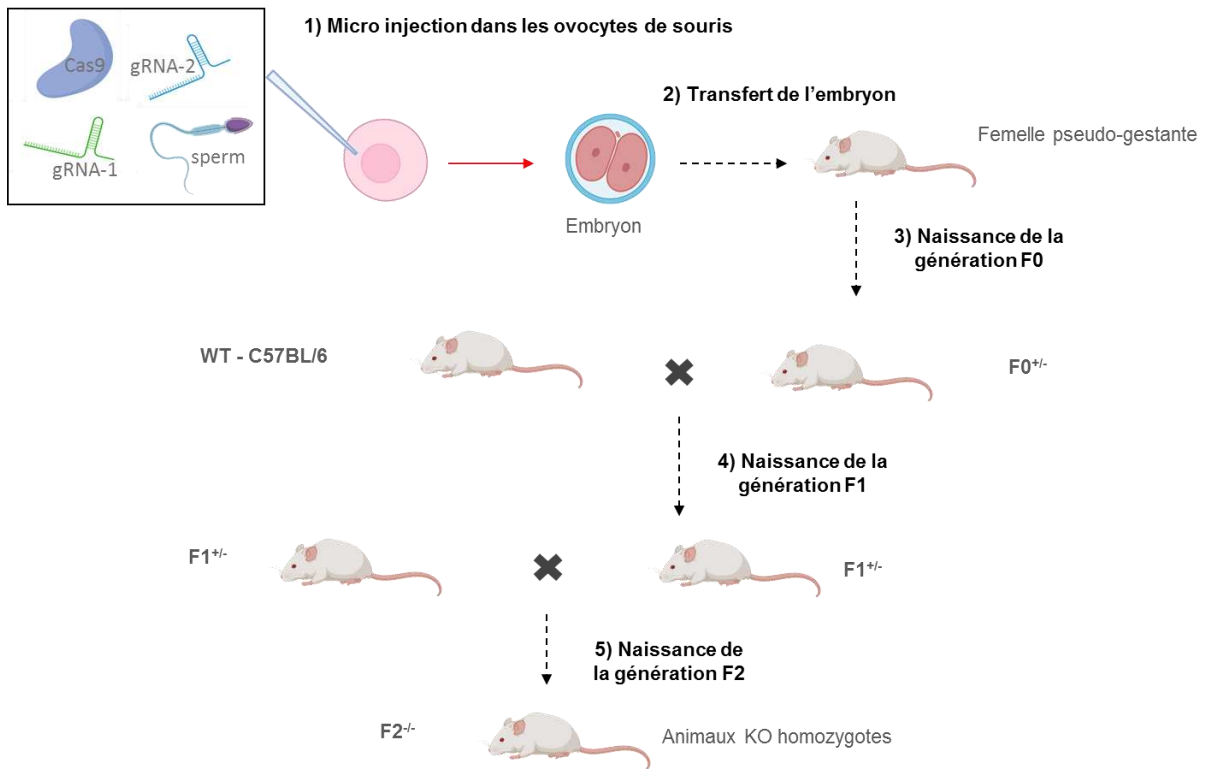


Figure 39. Création d'une lignée murine KO par la technique CRISPR/Cas9 (Cazin et al., 2021b)

Chapitre II. L'azoospermie non-obstructive

I. Article 1

« Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. »

Zine-Eddine Kherraf*, **Caroline Cazin***, Amine Bouker, Selima Fourati Ben Mustapha, Sylviane Hennebicq, Amandine Septier, Charles Coutton, Laure Raymond, Marc Nouchy, Nicolas Thierry-Mieg, Raoudha Zouari, Christophe Arnoult, Pierre F Ray.

American Journal of Human Genetics, 2022 Mar 3;109(3):508-517. doi: 10.1016/j.ajhg.2022.01.011. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35172124; PMCID: PMC8948161.

*** Co-premiers auteurs**

Contexte

L'azoospermie non obstructive (ANO), définie par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat liée à une altération de la spermatogenèse, est une cause fréquente et sévère d'infertilité masculine. Dans certains cas, la récupération de spermatozoïdes testiculaires est possible et offre aux couples des chances de conception intraconjugale par fécondation in vitro assistée par micro-injection intra-ovocytaire (FIV-ICSI) de ces spermatozoïdes. Cependant, les chances de succès de la biopsie testiculaire sont imprévisibles en l'absence de facteurs prédictifs positifs ou négatifs. Comme l'ANO repose sur une base génétique importante mais très hétérogène, l'identification de nouvelles causes génétiques et la caractérisation de la physiopathologie associée permettraient d'établir une corrélation génotype-phénotype spermatogénique et de prédire les chances de succès de récupération de spermatozoïdes testiculaires. C'est ainsi que j'ai pu contribuer au développement d'une nouvelle stratégie diagnostique et pronostique pour prédire les chances de succès de la TESE. Pour cela, j'ai participé à la mise en place de deux bases de données. La première a été d'établir une liste de gènes candidats causaux de l'ANO selon les données de la littérature. Pour établir cette liste, j'ai interrogé des bases de données telles que OMIM et PubMed et analysés plus de 1000 publications. Lorsque cela était possible, j'ai consigné le nom des gènes, leur fonction, leur expression, leur mode de transmission, le phénotype testiculaire associé, les modèles animaux étudiés, les tests fonctionnels, l'origine des patients, s'il s'agit de cas isolés ou familiaux et la nature des variants identifiés. Au total, 151 gènes ont été retenus comme causaux ou candidats connus pour l'ANO. La deuxième base de données que nous

avons mise en place est une corrélation entre le génotype et le phénotype testiculaire et la chance de récupération des spermatozoïdes par TESE. Ainsi, dans cette étude, nous avons recruté une cohorte de 96 sujets infertiles atteints d'ANO idiopathique. Tous les sujets avaient bénéficié d'une biopsie testiculaire pour récupération de spermatozoïdes dans les tubules séminifères et d'une étude histologique pour caractériser l'anomalie spermatogénique responsable du phénotype spermatique (aplasie germinale, blocage de la maturation ou hypospermatogénèse). Nous avons également obtenu pour chacun de ces patients des lames histologiques des tubes séminifères et j'ai participé à la lecture et à l'interprétation de ces coupes pour homogénéiser leur interprétation et réalisé une classification précise des sous-phénotypes testiculaires.

Un séquençage exomique a été réalisé par la suite pour l'ensemble des sujets de la cohorte. L'analyse bio-informatique a été limitée au panel de 151 gènes précédemment établi. Seuls les variants homozygotes ou hémizyotes hautement délétères, c'est-à-dire prédits pour ne pas produire de protéine fonctionnelle, ont été retenus comme candidats. Une cause génétique probable a pu être identifiée dans 16 gènes chez un total de 22 sujets (23%). Sept gènes n'avaient pas été décrits auparavant chez l'homme (*DDX25*, *HENMT1*, *HFM1*, *MCMDC2*, *MSH5*, *REC8*, *TDRKH*). Pour chacun de ces gènes, notre étude confirme fortement leur implication dans l'infertilité masculine, mais des travaux supplémentaires devraient être réalisés pour corroborer ces résultats et mieux caractériser la fonction de ces gènes dans la spermatogénèse. Les 9 autres gènes identifiés avaient déjà été rapportés dans la littérature (*C14orf39*, *DMC1*, *FANCM*, *GCNA*, *MCM8*, *MEIOB*, *PDHA2*, *TDRD9*, *TERB1*). Il est intéressant de noter que 7 sujets présentaient des défauts dans des gènes codant pour des protéines importantes pour le maintien de la stabilité génomique des cellules germinales, 12 dans des gènes de la méiose et trois dans des gènes impliqués dans la maturation post-méiotique. Comme attendu, tous les sujets présentant des défauts dans des gènes méiotiques ont subi un échec de récupération de spermatozoïdes testiculaires, ce qui indique que le diagnostic génétique et l'établissement d'une corrélation génotype-phénotype spermatogénique peuvent aider le chirurgien andrologue à identifier les patients présentant de faibles chances de réussite de cette procédure chirurgicale. Dans l'ensemble, la stratégie présentée ici pour l'analyse des données du WES dans le contexte de l'ANO devrait permettre de doubler

l'efficacité du diagnostic génétique. L'efficacité et la pertinence de ce diagnostic devraient rapidement progresser avec la publication de nouveaux gènes candidats mieux caractérisés.

Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia

Authors

Zine-Eddine Kherraf, Caroline Cazin,
Amine Bouker, ..., Raoudha Zouari,
Christophe Arnoult, Pierre F. Ray

Correspondence

pray@chu-grenoble.fr



Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia

Zine-Eddine Kherraf,^{1,2,8} Caroline Cazin,^{1,2,7,8} Amine Bouker,³ Selima Fourati Ben Mustapha,³ Sylviane Hennebicq,^{1,4} Amandine Septier,⁵ Charles Coutton,^{1,6} Laure Raymond,⁷ Marc Nouchy,⁷ Nicolas Thierry-Mieg,⁵ Raoudha Zouari,³ Christophe Arnoult,¹ and Pierre F. Ray^{1,2,*}

Summary

Non-obstructive azoospermia (NOA) is a severe and frequent cause of male infertility, often treated by testicular sperm extraction followed by intracytoplasmic sperm injection. The aim of this study is to improve the genetic diagnosis of NOA, by identifying new genes involved in human NOA and to better assess the chances of successful sperm extraction according to the individual's genotype. Exome sequencing was performed on 96 NOA-affected individuals negative for routine genetic tests. Bioinformatics analysis was limited to a panel of 151 genes selected as known causal or candidate genes for NOA. Only highly deleterious homozygous or hemizygous variants were retained as candidates. A likely causal defect was identified in 16 genes in a total of 22 individuals (23%). Six genes had not been described in man (*DDX25*, *HENMT1*, *MCMDC2*, *MSH5*, *REC8*, *TDRKH*) and 10 were previously reported (*C14orf39*, *DMC1*, *FANCM*, *GCNA*, *HFM1*, *MCM8*, *MEIOB*, *PDHA2*, *TDRD9*, *TERB1*). Seven individuals had defects in genes from piwi or DNA repair pathways, three in genes involved in post-meiotic maturation, and 12 in meiotic processes. Interestingly, all individuals with defects in meiotic genes had an unsuccessful sperm retrieval, indicating that genetic diagnosis prior to TESE could help identify individuals with low or null chances of successful sperm retrieval and thus avoid unsuccessful surgeries.

Introduction

Male infertility is considered by the World Health Organization (WHO) as a global health concern affecting more than 50 million couples worldwide. Non-obstructive azoospermia (NOA), defined by the complete absence of spermatozoa in the ejaculate, even after centrifugation of the semen sample followed by microscopic examination of the pellet,¹ occurs in approximately 1% of men and 10% of infertile men.² It is a highly heterogeneous condition with a broad genetic basis. Spermatogenesis is a highly complex process comprising three main successive steps: spermatocytogenesis that allows the proliferation and growth of spermatogonia, meiosis (I and II) which produces haploid cells, and spermiogenesis during which round spermatids undergo numerous biochemical and morphological changes including chromatin compaction, acrosome biogenesis, and flagellum assembly and elongation, to produce mature spermatozoa. Defects in any of these complex and specialized processes can prevent the production of sperm cells and induce NOA, which is expected to be extremely genetically heterogeneous. Consistent with these observations, mutations in more than 600 genes were shown to decrease fertility in animal models³ and 2,274 genes present an elevated expression in testis,

including 474 genes that are detected only in testis.⁴ Currently, only two genetic analyses are performed routinely for NOA-affected individuals: a karyotype which identifies sex chromosome anomalies, in particular Klinefelter syndrome (47 XXY) and various translocations, and the search for microdeletions in the AZF region. Using these tests, a diagnosis is obtained for approximately 20% of the studied individuals⁵ suggesting that the overwhelming majority of affected individuals remains undiagnosed.

Regardless of the diagnosis results or lack thereof, most couples want to initiate a pregnancy if possible with their own gametes. For NOA-affected individuals, the only option to achieve intra-couple pregnancy is to perform testicular sperm extraction (TESE) followed by *in vitro* fertilization (IVF) performed using intracytoplasmic sperm injection (ICSI), but success rates remains low and sperm cells are found in only 30%–50% of cases.⁵ The whole TESE-ICSI procedure is invasive, lengthy, psychologically wounding, and expensive and should be avoided when the chances of success are too low. Renouncing TESE is a difficult decision but it is the physician's responsibility to propose a medical procedure only if the expected gain outweighs the risks. In the absence of a precise diagnosis, the practitioner has no predictive information and in

¹Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, 38000 Grenoble, France; ²CHU Grenoble Alpes, UM GI-DPI, Grenoble 38000, France; ³Polyclinique les Jasmins, Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Centre Urbain Nord, 1003 Tunis, Tunisia; ⁴CHU Grenoble Alpes, UM laboratoire d'aide à la procréation-CECOS, 38 000 Grenoble, France; ⁵Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR5525, TIMC, 38000 Grenoble, France; ⁶CHU Grenoble Alpes, UM de Génétique Chromosomique, 38000 Grenoble, France; ⁷Laboratoire Eurofins Biomnis, Département de Génétique Moléculaire, 69 007 Lyon, France

⁸These authors contributed equally

*Correspondence: pray@chu-grenoble.fr

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.01.011>

© 2022 American Society of Human Genetics.



many cases, a TESE-ICSI will be unsuccessfully performed rather than moving faster toward the alternative procedures of sperm donation or adoption. In addition, infertile men, and by extension their relatives and potential offspring, are at higher risk of related adverse health issues requiring preventive follow up or specific treatments. This is well established for Klinefelter syndrome, Kallmann syndrome, or primary ciliary dyskinesia but increasing evidence also points to important links between cancer risks and infertility.⁶ Genetic diagnosis is therefore essential, especially when associated with a prognostic value, to provide informed counselling to individuals undergoing TESE and/or endocrine therapy.⁷

In the past decade, the overwhelming development of high-throughput sequencing and in particular the use of whole-exome sequencing (WES) has permitted the identification of many pathological genes in the field of male infertility.^{8,9} Recent cohort studies or familial studies also demonstrated the relevance of WES and highlighted the involvement of addition genes in the etiology of NOA.^{10–12} In view of the extreme genetic heterogeneity of NOA and the increasing affordability of the technique, we believe that WES should now be included in the panel of genetic techniques proposed to infertile men.

Here, we recruited 96 infertile men with idiopathic NOA who had undergone TESE, and we performed WES on each one. To facilitate data analysis and to focus on high-confidence gene defects, we defined a list including 151 candidate genes and we considered only highly deleterious homo or hemizygous variants.

Subjects and methods

Study subjects

A total of 96 unrelated men originating from North Africa affected by primary infertility and displaying non-syndromic non-obstructive azoospermia were recruited and treated at the “Clinique les Jasmins” in Tunis, Tunisia according to the established routine protocol. All individuals had a normal karyotype and no microdeletion of the Y chromosome. None declared to have any other health defect. In particular, they did not present anosmia, any disorder of sex development, or abnormal secondary sex characteristics. Details on all individuals are provided in [Table S1](#).

Informed consent was obtained from all the individuals participating in the study according to local protocols and the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by local ethics committees, and samples were then stored in the Fertithèque collection declared to the French Ministry of health (DC-2015-2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016-392).

All individuals had two sperm collections realized at least 2 months apart, to establish the diagnosis of azoospermia. Semen was collected by masturbation after 3 days of sexual abstinence. Semen samples were incubated for 30 min at 37°C for liquefaction and then centrifuged at 3,000 × *g* for 15 min.

Tissue samples collection and histological examination

All samples were obtained during routine therapeutic testicular sperm extraction (TESE) from all individuals recruited in the study.

In all cases, a micro-TESE procedure was performed using a 6-fold magnifying loupe as described previously.¹³

Tissues were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) for 14 h, embedded in paraffin, and sectioned (5 μm). For histological analysis, after being deparaffinized, slides were stained with hematoxylin and eosin. The colored sections were analyzed under light microscope.

Gene panel design and predictive outcome

Two independent reviewers conducted a literature search in Pubmed using the following keywords: (azoospermia gene) OR (non-obstructive azoospermia gene) OR (genetics of male infertility) OR (meiotic gene). The MGI database describing the phenotypes of KO mice was also interrogated using the keyword “azoospermia.” The search was performed on several occasions, the last search occurring on July 1, 2021.

Whole-exome sequencing and variants filtering

Genomic DNA was isolated from EDTA blood using the DNeasy Blood & Tissue Kits from QIAGEN SA. Genetic data were obtained from various sequencing centers, in particular Novogene and Integragen. Coding regions and intron/exon boundaries were sequenced after enrichment using SureSelect Human All Exon V6 –from Agilent.

An alignment-ready GRCh38 reference genome (including ALT, decoy, and HLA) was produced using “run-gen-ref hs38DH” from Heng Li’s bwakit package (<https://github.com/lh3/bwa>). The exomes were analyzed using a bioinformatics pipeline developed in-house. The pipeline consists of two modules, both distributed under the GNU General Public License v3.0 and available on github.

The first module (URL of this primary module in indicated in the [web resources](#)) takes FASTQ files as input and produces a single merged GVCF file per variant-caller, as follows. Adaptors are trimmed and low-quality reads filtered with fastp 0.20.0 (FASTP),¹⁴ reads are aligned with BWA-MEM 0.7.17 (BWA-MEM),¹⁵ duplicates are marked using samblaster 0.1.24 (SAMBLASTER),¹⁶ and BAM files are sorted and indexed with samtools 1.9 (SAMTOOLS). SNVs and short indels are called from each BAM file using strelka 2.9.10 (STRELKA)¹⁷ and GATK 4.1.8.1 to produce individual GVCF files from each variant-caller. These are finally merged with mergeGVCFs.pl to obtain a single multi-sample GVCF per caller. Using several variant-callers allows to compensate for each caller’s flaws.

The second module (URL of this secondary module in indicated in the [web resources](#)) takes each merged GVCF as input and produces annotated analysis-ready TSV files. This is achieved by performing up to 15 streamlined tasks, including the following. Low-quality variant calls (DP < 10, GQ < 20, or less than 15% of reads supporting the ALT allele) are discarded. Variant Effect Predictor v104¹⁸ is used to annotate the variants and predict their impact, allowing to filter low-impact (MODIFIER) variants and/or prioritize high-impact ones (e.g., stop-gain or frameshift variants). Variants with a minor allele frequency greater than 1% in gnomAD v2.0 or 3% in 1000 Genomes Project phase 3 are filtered. Additional information can be found in Arafah et al.¹⁹ Copy number variants (CNVs) were searched using the ExomeDepth software package as previously reported.^{20,21}

Sanger verification of candidate variants

Candidate variants were subjected to Sanger verification using an Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer. Analyses were

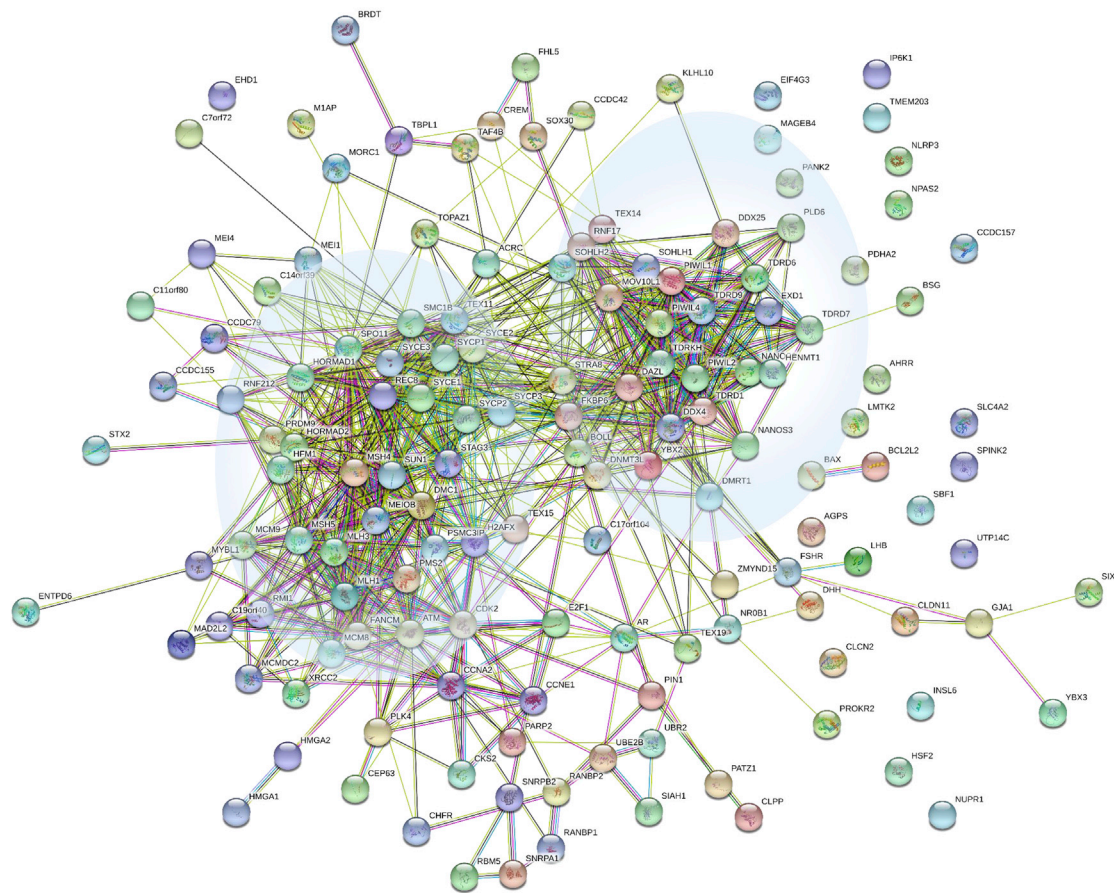


Figure 1. STRING analysis of physical and functional protein-protein interactions between the proteins encoded by the 151 candidate genes including in the NOA panel
 Analysis performed using STRING: <https://string-db.org/>. Two main clusters are highlighted in blue circles, loosely regrouping meiotic genes (left) and PIWI and DNA repair genes (right).

performed using SeqScape software (Applied Biosystems). Sequences of primers used and expected product sizes are summarized in [Table S2](#).

Results

Established gene panel

An initial search using selected keywords selected 20,595 manuscripts. Based on titles and abstracts, we excluded all manuscripts describing genes related to other spermatogenic phenotypes, genetic associations and risk factors, chromosome anomalies, AZF deletions, and CNVs affecting multiple genes and syndromic NOA, leading to the selection of approximately 1,000 manuscripts, which were analyzed in detail. From these eligible publications, we extracted the gene names, inheritance pattern, the testicular histological information when available, animal models if studied, functional tests if performed, the ethnicity and geographic origin of the investigated individuals, sporadic cases or familial cases, and nature of the identified variants. Data from the MGI database (<http://www.informatics.jax.org/>) describing the phenotypes of KO mice using the keyword “azoos-

spermia” yielded 313 hits. The described phenotypes were analyzed and correlated with the characteristics of generated knock-out mice (conditional/spontaneous mutation etc.). Candidate genes were retained only if strong evidence was available from the studied documents. Overall a total of 151 genes were selected as likely implicated in NOA ([Table S3](#)). This list is available as an open evolving resource that can be updated by all actors of the field in a free access URL (see the link in the [web resources](#)). A STRING analysis was performed on all the selected gene products ([Figure 1](#)), highlighting numerous interactions between many of the selected proteins.

Exome sequencing

After variant filtering, each person carried on average 62 homozygous and 1,497 heterozygous variants. Overall, among these variants 3.3% were classified by Variant Effect Predictor as having a HIGH impact (alleles with such variants are not expected to produce a functional protein). In addition, 7.2% of variants were classified as having a likely deleterious effect (L-HIGH): this includes missense variants predicted as deleterious by at

Table 1. List of all candidate variants identified

Gene	Subject	Variant	Type of variant	MAF, gnomAD
Loss-of-function (LoF) variants in previously reported candidate genes				
<i>C14orf39</i>	P0142	NM_174978.3: c.204_205del; p.His68GlnfsTer2	frameshift	4.1E-06
<i>FANCM</i>	P0138	NM_020937.4: c.5791C>T; p.Arg1931Ter	stop gained	1.0E-03
<i>GCNA</i>	P0137	NM_052957.5: c.1507del; p.Glu504LysfsTer11	frameshift	0.0E+00
<i>HFM1</i>	P0369	NM_001017975.6: c.3588+1G>A	splice donor	0.0E+00
<i>MEIOB</i>	P0074	NM_001163560.3: c.1118_1121del; p.Phe373SerfsTer6	frameshift	0.0E+00
<i>TDRD9</i>	P0080	NM_153046.3: c.3483_3484dup; p.Ser1162IlefsTer3	frameshift	0.0E+00
	P0279	NM_153046.3: c.720_723del; p.Ser241ProfsTer4	frameshift	7.7E-05
Deleterious missense variants previously reported in NOA candidate genes				
<i>MCM8</i>	P0370	NM_001281520.2: c.482A>C; p.His161Pro	missense	0.0E+00
	P0281	NM_001281520.2: c.482A>C; p.His161Pro	missense	0.0E+00
<i>PDHA2</i>	P0253	NM_005390.5: c.679A>G; p.Met227Val	missense	6.0E-05
	P0144	NM_005390.5: c.679A>G; p.Met227Val	missense	6.0E-05
Loss-of-function (LoF) variants in novel strong candidate genes (no mutations described in NOA-affected men)				
<i>DDX25</i>	P0283	NM_013264.5: c.1129C>T; p.Arg377Ter	stop gained	1.6E-05
<i>HENMT1</i>	P0272	NM_001102592.2: c.456C>G; p.Tyr152Ter	stop gained	0.0E+00
<i>MCMDC2</i>	P0085	NM_173518.5: c.1795C>T; p.Arg599Ter	stop gained	1.3E-04
<i>MSH5</i>	P0355	NM_172166.4: c.537+1G>A	splice donor	0.0E+00
	P0321	ENST00000375703.7: c.1015_2508del	CNV (homo)	0.0E+00
<i>REC8</i>	P0088	NM_001048205.2: c.860_861del; p.Pro287ArgfsTer74	frameshift	0.0E+00
<i>TDRKH</i>	P0110	NM_001083965.2: c.1003A>T; p.Lys335Ter	stop gained	0.0E+00
Novel deleterious missense variants in NOA candidate genes				
<i>DMC1</i>	P0352	NM_007068.4: c.364A>G; p.Thr122Ala	missense	0.0E+00
	P0082	NM_007068.4: c.860C>A; p.Pro287His	missense	0.0E+00
<i>HENMT1</i>	P0109	NM_001102592.2: c.226G>A; p.Gly76Arg	missense	8.0E-06
<i>TERB1</i>	P0145	NM_001136505.2: c.733G>A; p.Gly245Arg	missense	6.5E-06

All variants were homozygous and considered to be most likely deleterious and responsible for the studied phenotype.

least three methods among SIFT, PolyPhen, CADD, mutationTaster, or REVEL, as well as splice-region variants predicted deleterious by both ada and rfmeths from dbSNV.²² On average, each person carried 2.1 homozygous HIGH variants and 3.6 homozygous L-HIGH variants passing all previous filters. We identified a total of 25 heterozygous HIGH variants and 47 L-HIGH heterozygous variants in one of the 151 candidate genes. At this stage, as the confirmation of the segregation of the variants was not possible (to establish if the variants were *de novo*, mother transmitted, or localized in *trans*), we did not investigate the potentially dominant transmission nor did we consider compound heterozygous variants. Overall we identified 22 subjects (23%) with a homozygous or hemizygous HIGH ($n = 14$) or L-HIGH ($n = 8$) variant in one of the 151 candidate genes (Table 1). We focused on the variants that present a high probability of being responsible for the individuals' NOA.

Identified gene variants

A total of seven individuals had a homozygous loss-of-function variant (mainly frameshift variants) in six genes (*C14orf39* [MIM: 617307], *FANCM* [MIM: 609644], *GCNA* [MIM: 300369], *HFM1* [MIM: 615684], *MEIOB* [MIM: 617670], *TDRD9* [MIM: 617963]) previously described to be associated with NOA²³⁻³⁰ (Table 1). In addition, two individuals harbored the same homozygous missense variants in *MCM8* (MIM: 608187): GenBank: NM_001281520.2: c.482A>C (p.His161Pro). Similarly, two other persons carried the same homozygous variants in *PDHA2*. Both these genes have previously been associated with NOA.^{31,32} Overall, for these 11 individuals we can consider that a near certain diagnosis has been obtained.

An additional seven individuals were identified with a homozygous loss-of-function variant in six genes whose function was described as critical for spermatogenesis (Table 1). For each of these genes (*DDX25* [MIM: 607663],

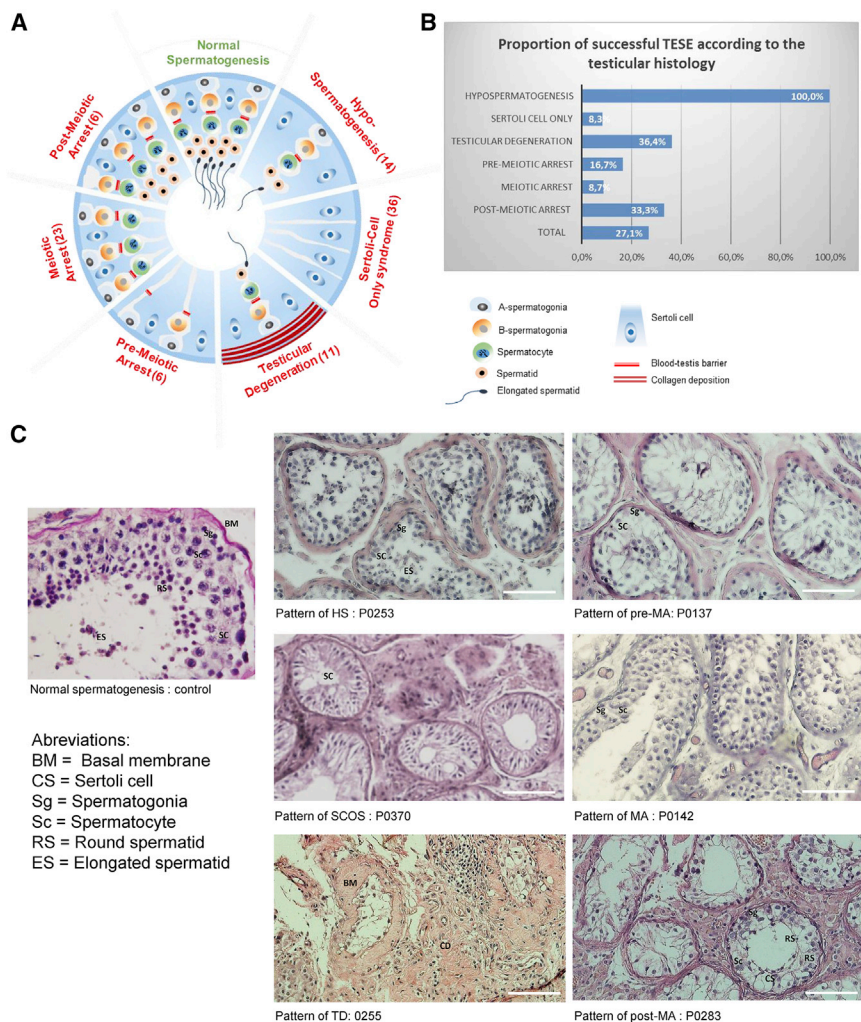


Figure 2. Definition and schematic representation of the different NOA subphenotypes illustrated by subjects' histological sections

(A) The testicular biopsies were categorized into different histopathological patterns, indication of the total number of individuals with each anomaly.

Normal spermatogenesis: the seminiferous tubules are lined by a thin basement membrane and the germinal epithelium shows normal progression from spermatogonia to spermatozoa along with spermatocytes and spermatisids.

Hypospermatogenesis (HS): the germinal epithelium shows all the stages of germ cells but their number is reduced.

Sertoli cell only syndrome: the tubules contain only Sertoli cells and no germ cells.

Testicular degeneration: including both seminiferous tubule hyalinization and degenerating tubules. Hyalinized tubules are characterized by a thickened basement membrane, smaller diameter devoid of epithelial cells, and collagen deposition. Degenerating tubules are characterized by hypocellularity.

Germ cell maturation arrest (pre-meiotic arrest [PreMA], meiotic arrest [MA], and post-meiotic arrest [Post-M]): at a specific cell stage the process of spermatogenesis is arrested.

Mixed pattern (not shown): there is variation in the histopathological pattern in the same testicular biopsy.

(B) Proportion of individuals with successful TESE according to the testis histology.

(C) Examples of testis sections from individuals with different testicular defects.

HENMT1 [MIM: 612178], *MCMDC2* [MIM: 617545], *MSH5* [MIM: 603382], *REC8* [MIM: 608193], *TDRKH* [MIM: 609501]), knock out mouse models have been produced which all exhibit male sterility.^{33–40} Some of these genes have been described to be linked with female infertility (*MSH5*),⁴¹ but no deleterious variants have yet been described in men with NOA. We can therefore consider that the data presented here confirm the direct link of these genes with NOA. Last, four individuals carried missense variants in genes already described to induce NOA (*DMC1* [MIM: 602721], *HENMT1* [MIM: 612178], and *TERB1* [MIM: 617332]). *DMC1* homozygous missense variants have been described in male and female infertile siblings and KO mice present with male and female sterility.^{42,43} Here, two individuals carried a distinct homozygous missense variant in *DMC1*. The two *DMC1* variants identified, GenBank: NM_007068.4: c.364A>G (p.Thr122Ala) and c.860C>A (p.Pro287His), are not found in gnomAD and are respectively predicted as pathogenic by 9 and 11 out of 12 prediction software (see varsome in [web resources](#)). Similarly, the *HENMT1* and *TERB1* variants are very rare in gnomAD (2 occurrences) and are respectively predicted as pathogenic by 9/12 and 7/11 prediction

software. The presence of all variants was confirmed by Sanger sequencing ([Figure S1](#)), and all variants were submitted to Clinvar (see [web resources](#)) under the reference SUB10823688.

Overall, we obtained a high-confidence diagnosis for 18 individuals (HIGH impact variants or L-HIGH variants in genes identified in two individuals) and a likely diagnosis for 4 additional individuals (missense variant not previously published).

Histological phenotype and TESE outcome

All subjects underwent surgery to perform a testicular sperm extraction (TESE). In all cases one part of the extracted tissues was fixed and colored for histological analysis and the other part was dilacerated for attempts to extract living spermatozoa. Fixed slides were carefully examined to obtain a histological diagnosis. Overall, 14 individuals were classified as having hypospermatogenesis, 36 a Sertoli cell only syndrome, 11 a testicular degeneration, 6 a pre-meiotic arrest, 23 a meiotic arrest, and 6 a post-meiotic arrest ([Figure 2A](#)). All individuals with hypospermatogenesis had a positive TESE (100%), subjects with testicular degeneration had 36.6% positive TESE,

Table 2. Predicted gene function and clinical information on affected individuals

Gene	Function	Patient	Left/right testis volume (mL)	FSH (IU/L)	Testis histology	Sperm retrieval
Genes involved in meiosis						
<i>C14orf39</i>	synaptonemal complex	P0142	10–15/10–15	N/A	MeA	NEG
<i>DMC1</i>	chiasma strand invasion	P0352*	>15/>15	N/A	MeA	NEG
		P0082*	10–15/10–15	9	MeA	NEG
<i>HFM1</i>	chiasma strand invasion	P0369	5–10/5–10	5.16	MeA	NEG
<i>MCM8</i>	chiasma synthesis and stabilization	P0370	5–10/5–10	16.7	SCOS	NEG
		P0281	<5/<5	27	SCOS	NEG
<i>MCMD2</i>	meiotic recombination	P0085	5–10/5–10	N/A	MeA	NEG
<i>MEIOB</i>	chiasma synthesis and stabilization	P0074	10–15/10–15	2.16	MeA	NEG
<i>MSH5</i>	chiasma synthesis and stabilization	P0355	10–15/10–15	6.08	MeA	NEG
		P0321	>15/>15	9.65	MeA	NEG
<i>REC8</i>	meiotic recombination	P0088	5–10/5–10	12.9	MeA	NEG
<i>TERB1</i>	assembly of a meiotic telomere complex	P0145*	10–15/10–15	4.23	MeA	NEG
Genes involved in Piwi pathway and/or DNA repair						
<i>FANCM</i>	DNA repair pathway	P0138	5–10/5–10	N/A	TD	NEG
<i>GCNA</i>	regulator of genome stability	P0137	>15/>15	2.24	PrMeA	NEG
<i>HENMT1</i>	component of the piwi pathway	P0272	10–15/10–15	3.29	HS	POS
		P0109	–	–	MeA	NEG
<i>TDRD9</i>	Piwi pathway, transposon silencing	P0080	<5/<5	16	HS	POS
		P0279	10–15/10–15	4.6	MeA	NEG
<i>TDRKH</i>	component of the piwi pathway	P0110	5–10/5–10	27.6	MeA	NEG
Genes involved in post-meiotic maturation						
<i>DDX25</i>	post-transcriptional regulation	P0283	5–10/5–10	N/A	PoMA	NEG
<i>PDHA2</i>	carbohydrate oxidation	P0253	10–15/10–15	2.87	HS	POS
		P0144	10–15/10–15	2.4	MeA	NEG

Indicated testis histology are: Sertoli cell only (SCOS), testicular degeneration (TD), hypospermatogenesis (HS), spermatogenic arrest : pre-meiotic (PrMeA), meiotic (MeA), post-meiotic (PoMA). Sperm retrieval is either positive (POS) or negative (NEG).

those with post-meiotic arrest 33.3%, Sertoli-cell only syndrome 8.3%, and pre-meiotic and meiotic arrest had 16.7 and 8.7%, respectively (Figures 2B and 2C). The positive TESE results might seem in conflict with the histological diagnoses of Sertoli-cell only syndrome and pre-meiotic and meiotic arrest. This can be explained by the fact that the tubules might be unevenly affected and some of the histological results might not be representative of the whole testis environment.

Genotype phenotype correlation

Among the 22 diagnosed persons, 12 (55%) had gene defects altering a gene described to be critical for meiosis (*C14orf39*, *DMC1*, *HFM1*, *MCM8*, *MCMD2*, *MEIOB*, *MSH5*, *REC8*, *TERB1*) (Table 2). The histological diagnosis was concordant for 10 individuals, evidencing a meiotic arrest. For all these individuals, diagnosed with genetic defect in a meiotic gene, the TESE was negative (Table 2). Only two individuals with a missense variant in the

meiotic *MCM8* gene were scored as having a Sertoli-cell only syndrome. Seven individuals had defects in genes described to be involved in the Piwi pathway or in DNA repair (*FANCM*, *GCNA*, *HENMT1*, *TDRD9*). Among these individuals, TESE was positive for 2 individuals (29%). Last, three individuals had defects in genes involved in post-meiotic maturation (*DDX25*, *PDHA2*) and one (33%) had a positive TESE.

Discussion

The recent development of high-throughput sequencing methods permitted the identification of an exponential number of candidate genes in all genetic disorders. The field of male infertility also benefited from these advances and the past years saw the identification and characterization of numerous infertility genes. For example, we identified *SPINK2* as a cause for post-meiotic arrest⁴⁴ and a recent

cohort study focusing on NOA-affected individuals with spermatogenic maturation arrest (MA) identified 5 candidate genes and a likely genetic defect in 23 out of 147 individuals (16%).¹⁰ Here we performed WES analysis on 96 NOA-affected individuals showing different testicular histologies; we identified 7 candidate genes and identified a likely genetic defect in 22 out of 96 individual (23%). For men with NOA, the benefit of a clear molecular diagnosis following exome sequencing has however been limited as the genetic diagnosis only rarely has a direct impact on the subject's proposed treatment. Clear guidelines associated with the predicted treatment outcome are necessary to turn WES into a useful tool for the routine diagnosis and care of NOA-affected individuals.

Exome sequencing is a powerful tool in the framework of infertility diagnosis

Following exome sequencing, using our list of candidate genes and strict guidelines designed to be integrated into an automated bioinformatics process, we obtained a high-confidence diagnosis for 19% of the analyzed persons and an additional very likely diagnosis for 4%. Currently, the only genetic tests carried out routinely for NOA-affected individuals are a karyotype and the search for microdeletions in the AZF region of the Y chromosome. These analyses yield a diagnosis for less than 20% of the tested individuals.⁵ In this study, we see that exome sequencing combined with our proposed analysis method permits clinicians to double the diagnosis efficiency for this pathology. Here, all subjects were recruited at the Clinique les Jasmins in Tunis and originated from North Africa. We can estimate that half of the included individuals were born to related parents and this certainly contributed to this high diagnosis efficiency. The yield of diagnosis of a genetically more heterogeneous population might therefore be lower but diagnosis efficiency should improve rapidly for all individuals with the publication of new studies which will permit researchers to quickly enrich the list of candidate genes. Here, we presented only the variants affecting the genes from a limited list of genes likely linked with NOA. Despite all our efforts, this list is likely incomplete and may contain mistakes, but more importantly, considering how fast the field is moving, it will certainly be incomplete by the time this article is printed. However, this list is available online and we aim to keep it updated, to serve as a shared tool for the analysis of WES data in the context of NOA. Variants in other genes not included in the list of candidate genes appeared interesting but were not discussed in this manuscript, as additional work has to be carried out to confirm or infirm their implication in NOA. To that end we generated four knock-out mice lines using CRISPR-Cas9 technology to gain additional information on their function. Also, we were very restrictive in the selection of the candidate variants. As we did not have the possibility to perform familial studies to assess the segregation of the variants, we only considered homozygous or hemizygous variants and did not

select the individuals with two deleterious variants in the same candidate genes as we could not confirm that the variants were bi-allelic. Several variants did not fulfill our selection criteria but appeared interesting. This was the case for potential splice variants, not affecting consensus acceptor or donor site, but appearing as good candidates necessitating further functional validation.

Interestingly, some of the identified genes have been described to be linked with female infertility and primary ovarian insufficiency (C14orf39,^{29,45} HFM1,⁴⁶ MCM8,³² MEIOB,⁴⁷ MSH5,⁴¹ DMC1⁴²) highlighting common mechanisms between male and female meiosis. As many genes have been described to induce both male and female infertility, it might be relevant to produce a large list of candidate genes regrouping genes described to be associated with either and both male and female fertility.

Overall, the use of a well-established candidate gene list and strict criteria for variant selection permits a quick and easy analysis of WES results, allowing a rapid clinical diagnosis. As highlighted before, the list of candidate genes is expected to be in constant evolution, so WES appears much preferable to a targeted sequencing approach that would very rapidly become obsolete and would not permit the discovery of new candidate genes.

Histological phenotype and identified gene defects

Careful examination of histological results permitted to identify 6 types of testicular defects. The most frequent defects were SCOS observed in 36 individuals and meiotic arrest observed in 23 (Figure 2). There was a relatively good correlation between the histological phenotype and the outcome of TESE. All individuals with hypospermatogenesis had a positive TESE (100%); results were fair for individuals with testicular degeneration (36.6% positive TESE) and post-meiotic arrest (33.3%) and poor for Sertoli-cell only syndrome (8.3%) and pre-meiotic and meiotic arrest (16.7 and 8.7%, respectively). In some cases, this classification was difficult to make as different tubules might present slightly different anomalies and some persons might have several overlapping phenotypes (Table S2). Histological classification of testicular tissues has always been recognized as challenging. A large study performed on 1,418 samples show a matched phenotypic classification between right and left testicular biopsies in 81.2% of SCO cases whereas a matched classification was only obtained for 25%–67.7% of post-meiotic arrests.⁴⁸ This illustrates that multiple sampling is necessary to obtain an overall view of the spermatogenesis. Here, for simplification, we retained the observed majoritarian defect. Interestingly, a diagnosis was obtained for 12 out of 22 individuals (55%) identified as having a meiotic arrest. Conversely, diagnosis efficiency was low for the other testis histological categories and a likely variant was identified in 6% of SCOS-affected individuals, in 9% of testicular degeneration, in 21% of hypospermatogenesis, and in 17% of individuals with pre- and post-meiotic arrest. One of the main reasons to explain the predominance of individuals

with a genetic diagnosis among the subjects scored with a meiotic arrest might be that meiosis has been extensively studied and many meiotic genes have been identified and are present in our list of candidate genes.

We tried to group the identified genes by function. Nine of the identified genes were described to have a direct function in meiotic processes, five a role in piwi pathways or DNA repair (Table 2). Only two genes described to be involved in post-meiotic processes were identified. It is interesting to note that we observed genes regrouped in these broad functions following the string analysis of the 151 candidate genes (Figure 1). There was a relatively good correlation between the histological phenotype and what was expected from the presumed gene function. Nine out of the 16 identified genes are described to be directly involved in meiosis (Table 2) and 10 out of the 12 individuals concerned had a testis histology phenotype of meiotic arrest. The two remaining individuals had variants in *MCM8*, involved in chiasma synthesis and chromosomal pairing stabilization and were scored to have SCOS. Conversely, three individuals scored to have a meiotic arrest had variants in *HENMT1*, *TDRD9*, and *TDRKH*, three genes known to be involved in the PIWI pathway. These small discrepancies were also illustrated by the fact that several persons with defects in the same genes (*HENMT1*, *TDRD9*, and *PDHA2*) had a different histological subphenotype and a different TESE outcome. For *PDHA2*, two individuals had the same mutation and one had a hypospermatogenesis and a positive TESE, the other a meiotic arrest and a negative TESE. Overall these observations highlight the limit of the histological classification but also the difficulty of predicting the effects of different (or even identical) gene defects. Variable expressivity and penetrance of defects in a same gene or even of the very same genetic defects are well-known caveats of human genetics.⁴⁹ Here we see that individuals with the same gene defect (as observed for *PDHA2*) can present a different testicular phenotype and TESE outcome. It is not possible to know if these discrepancies are due to the testicular tissue heterogeneity and to the skill of the surgeon on the day of the biopsies, or to the variable expressivity or penetrance of the gene defect. The main goal for performing a genetic diagnosis for NOA-affected individuals is to obtain for the concerned persons a reliable negative diagnosis that may prevent a useless TESE procedure. Genes such as *PDHA2*, which do not provide a clear TESE prognostic, would be classified as uncertain and would not counter-indicate TESE.

It is interesting to note that all 12 individuals with defects in meiotic genes had a negative TESE indicating that a negative prognostic can be reached with a good degree of confidence, in particular for meiotic genes. In a recent study, Krausz and colleagues studied NOA-affected men with a maturation arrest and a negative TESE.¹⁰ Interestingly, they identified a total of 12 candidate genes of which 9 can be considered to be meiotic genes (*MEI1*, *MEIOB*, *MSH4*, *RAD51L1*, *SHOC1*, *STAG3*, *SYCE1*, *TERB1*, *TEX11*), thus confirming the strong link between defects in meiotic genes and negative TESE.

Conclusion

We used here a simple strategy based on a list of candidate genes to facilitate the interpretation of WES data and the identification of causal gene defects associated with a prediction of their consequence on spermatogenesis. Our results indicate that a clinical diagnosis interpreted in light of other clinical arguments can provide a strong argument against TESE. This demonstrates that exome sequencing can help the clinician to provide his patient with a more precise and relevant information which will help them adopt the most appropriate course of action, avoiding, in some instances, hopeless surgical procedures.

Data and code availability

All identified variants were submitted to Clinvar under the reference SUB10823688.

Details of the exome analysis pipeline used in the study is available on github (URL provided in the [web resources](#) section).

Supplemental information

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.01.011>.

Acknowledgments

This work was funded by the French National Research Agency (ANR), projects MASFLAGELLA (ANR-19-CE17-0014), FLAGEL-OME (ANR-19-CE17-0014), and the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and Bettencourt Foundation.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Received: November 12, 2021

Accepted: January 19, 2022

Published: February 15, 2022

Web Resources

ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
gnomAD Browser, <https://gnomad.broadinstitute.org/>
MGI database, <http://www.informatics.jax.org/>
OMIM, <https://www.omim.org/>
Varsome, <https://varsome.com>
TIMC primary, <https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Primary>
TIMC secondary, <https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Secondary>

References

1. Aziz, N. (2013). The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics (São Paulo)* 68 (Suppl 1), 35–38.

2. Tournaye, H., Krausz, C., and Oates, R.D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *5*, 544–553.
3. Matzuk, M.M., and Lamb, D.J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* *14*, 1197–1213.
4. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* *347*, 1260419.
5. Tüttelmann, F., Werny, F., Cooper, T.G., Kliesch, S., Simoni, M., and Nieschlag, E. (2011). Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *Int. J. Androl.* *34*, 291–298.
6. Eisenberg, M.L., Li, S., Behr, B., Pera, R.R., and Cullen, M.R. (2015). Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil. Steril.* *103*, 66–71.
7. Okutman, O., Rhouma, M.B., Benkhalifa, M., Muller, J., and Viville, S. (2018). Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* *35*, 1939–1951.
8. Mitchell, M.J., Metzler-Guillemain, C., Toure, A., Coutton, C., Arnoult, C., and Ray, P.F. (2017). Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin. Genet.* *91*, 208–216.
9. Ray, P.F., Toure, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M.J., Arnoult, C., and Coutton, C. (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin. Genet.* *91*, 217–232.
10. Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Moreno-Mendoza, D., Holleman, K., Cioppi, F., Algaba, F., Pybus, M., Friedrich, C., Wyrwoll, M.J., Casamonti, E., et al. (2020). Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet. Med.* *22*, 1956–1966.
11. Oud, M.S., Houston, B.J., Volozonoka, L., Mastroso, F.K., Holt, G.S., Alobaidi, B.K.S., deVries, P.F., Astuti, G., Ramos, L., Mclachlan, R.I., et al. (2021). Exome sequencing reveals variants in known and novel candidate genes for severe sperm motility disorders. *Hum. Reprod.* *36*, 2597–2611.
12. Fakhro, K.A., Elbardsi, H., Arafa, M., Robay, A., Rodriguez-Flores, J.L., Al-Shakaki, A., Syed, N., Mezey, J.G., Abi Khalil, C., Malek, J.A., et al. (2018). Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet. Med.* *20*, 1365–1373.
13. Bouker, A., Halouani, L., Kharouf, M., Latrous, H., Makni, M., Marrakchi, O., Zouari, R., and Fourati, S. (2019). Step-by-step loupes-mTESE in non-obstructive azoospermic men, a retrospective study. *Basic Clin. Androl.* *29*, 11.
14. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* *34*, i884–i890.
15. Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Preprint at arXiv, arXiv:1303.3997.
16. Faust, G.G., and Hall, I.M. (2014). SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics* *30*, 2503–2505.
17. Kim, S., Scheffler, K., Halpern, A.L., Bekritsky, M.A., Noh, E., Källberg, M., Chen, X., Kim, Y., Beyter, D., Krusche, P., and Saunders, C.T. (2018). Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat. Methods* *15*, 591–594.
18. McLaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R.S., Thormann, A., Flicek, P., and Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* *17*, 122.
19. Arafah, K., Lopez, F., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Tassistro, V., Loundou, A., Arnoult, C., Thierry-Mieg, N., Bulet, P., Guichaoua, M.-R., and Ray, P.F. (2021). Defect in the nuclear pore membrane glycoprotein 210-like gene is associated with extreme uncondensed sperm nuclear chromatin and male infertility: a case report. *Hum. Reprod.* *36*, 693–701.
20. Kherraf, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Dacheux, D., Karaouzène, T., Coutton, C., Christou-Kent, M., Martinez, G., Landrein, N., Le Tanno, P., Fourati Ben Mustapha, S., et al. (2018). A Homozygous Ancestral SVA-Insertion-Mediated Deletion in WDR66 Induces Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagellum and Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* *103*, 400–412.
21. Plagnol, V., Curtis, J., Epstein, M., Mok, K.Y., Stebbings, E., Grigoriadou, S., Wood, N.W., Hambleton, S., Burns, S.O., Thrasher, A.J., et al. (2012). A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* *28*, 2747–2754.
22. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* *17*, 405–424.
23. Kasak, L., Punab, M., Nagimaja, L., Grigorova, M., Minajeva, A., Lopes, A.M., Punab, A.M., Aston, K.I., Carvalho, F., Laasik, E., et al.; GEMINI Consortium (2018). Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* *103*, 200–212.
24. Yin, H., Ma, H., Hussain, S., Zhang, H., Xie, X., Jiang, L., Jiang, X., Iqbal, F., Bukhari, I., Jiang, H., et al. (2019). A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. *Genet. Med.* *21*, 62–70.
25. Arafat, M., Kleiman, S.E., AbuMadighem, A., Zeadna, A., Levitas, E., Vardi, I.H., Barda, S., Lehavi, O., Hauser, R., Lunenfeld, E., et al. (2021). Pathogenic variations in Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase (GCNA) are associated with human male infertility. *Eur. J. Hum. Genet.* *29*, 1781–1788.
26. Hardy, J.J., Wyrwoll, M.J., Mcfadden, W., Malcher, A., Rotte, N., Pollock, N.C., Munyoki, S., Veroli, M.V., Houston, B.J., Xavier, M.J., et al.; GEMINI Consortium (2021). Variants in GCNA, X-linked germ-cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure. *Hum. Genet.* *140*, 1169–1182.
27. Arafat, M., Har-Vardi, I., Harlev, A., Levitas, E., Zeadna, A., Abofoul-Azab, M., Dyomin, V., Sheffield, V.C., Lunenfeld, E., Huleihel, M., and Parvari, R. (2017). Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J. Med. Genet.* *54*, 633–639.
28. Tang, D., Lv, M., Gao, Y., Cheng, H., Li, K., Xu, C., Geng, H., Li, G., Shen, Q., Wang, C., et al. (2021). Novel variants in helicase for meiosis 1 lead to male infertility due to non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *19*, 129.
29. Fan, S., Jiao, Y., Khan, R., Jiang, X., Javed, A.R., Ali, A., Zhang, H., Zhou, J., Naeem, M., Murtaza, G., et al. (2021). Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *Am. J. Hum. Genet.* *108*, 324–336.

30. Wu, Y., Li, Y., Murtaza, G., Zhou, J., Jiao, Y., Gong, C., Hu, C., Han, Q., Zhang, H., Zhang, Y., et al. (2021). Whole-exome sequencing of consanguineous families with infertile men and women identifies homologous mutations in SPATA22 and MEIOB. *Hum. Reprod.* *36*, 2793–2804.
31. Yıldırım, Y., Ouriachi, T., Woehlbier, U., Ouahioune, W., Balkan, M., Malik, S., and Tolun, A. (2018). Linked homozygous BMPR1B and PDHA2 variants in a consanguineous family with complex digit malformation and male infertility. *Eur. J. Hum. Genet.* *26*, 876–885.
32. Bouali, N., Francou, B., Bouligand, J., Imanci, D., Dimassi, S., Tosca, L., Zaouali, M., Mougou, S., Young, J., Saad, A., and Guiochon-Mantel, A. (2017). New MCM8 mutation associated with premature ovarian insufficiency and chromosomal instability in a highly consanguineous Tunisian family. *Fertil. Steril.* *108*, 694–702.
33. Tsai-Morris, C.-H., Sheng, Y., Lee, E., Lei, K.-J., and Dufau, M.L. (2004). Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is essential for spermatid development and completion of spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 6373–6378.
34. Lim, S.L., Qu, Z.P., Kortschak, R.D., Lawrence, D.M., Geoghegan, J., Hempfling, A.-L., Bergmann, M., Goodnow, C.C., Ormandy, C.J., Wong, L., et al. (2015). HENMT1 and piRNA Stability Are Required for Adult Male Germ Cell Transposon Repression and to Define the Spermatogenic Program in the Mouse. *PLoS Genet.* *11*, e1005620.
35. Guiraldelli, M.F., Eyster, C., Wilkerson, J.L., Dresser, M.E., and Pezza, R.J. (2013). Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis. *PLoS Genet.* *9*, e1003383.
36. McNairn, A.J., Rinaldi, V.D., and Schimenti, J.C. (2017). Repair of Meiotic DNA Breaks and Homolog Pairing in Mouse Meiosis Requires a Minichromosome Maintenance (MCM) Paralog. *Genetics* *205*, 529–537.
37. de Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P., and te Riele, H. (1999). Mouse Mts-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* *13*, 523–531.
38. Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van der Horst, G.T.J., and McKay, M.J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell* *8*, 949–961.
39. Saxe, J.P., Chen, M., Zhao, H., and Lin, H. (2013). Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *EMBO J.* *32*, 1869–1885.
40. Finsterbusch, F., Ravindranathan, R., Dereli, I., Stanzione, M., Tränkner, D., and Tóth, A. (2016). Alignment of Homologous Chromosomes and Effective Repair of Programmed DNA Double-Strand Breaks during Mouse Meiosis Require the Minichromosome Maintenance Domain Containing 2 (MCMD2) Protein. *PLoS Genet.* *12*, e1006393.
41. Guo, T., Zhao, S., Zhao, S., Chen, M., Li, G., Jiao, X., Wang, Z., Zhao, Y., Qin, Y., Gao, F., and Chen, Z.J. (2017). Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 1452–1457.
42. He, W.-B., Tu, C.-F., Liu, Q., Meng, L.-L., Yuan, S.-M., Luo, A.-X., He, F.-S., Shen, J., Li, W., Du, J., et al. (2018). DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J. Med. Genet.* *55*, 198–204.
43. Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* *1*, 697–705.
44. Kherraf, Z.-E., Christou-Kent, M., Karaouzene, T., Amiri-Yekta, A., Martinez, G., Vargas, A.S., Lambert, E., Borel, C., Dorphin, B., Aknin-Seifer, I., et al. (2017). SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1132–1149.
45. Hou, D., Yao, C., Xu, B., Luo, W., Ke, H., Li, Z., Qin, Y., and Guo, T. (2021). Variations of C14ORF39 and SYCE1 identified in idiopathic premature ovarian insufficiency and nonobstructive azoospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Published online October 26, 2021. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab777>.
46. Wang, J., Zhang, W., Jiang, H., Wu, B.-L.; and Primary Ovarian Insufficiency Collaboration (2014). Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.* *370*, 972–974.
47. Caburet, S., Todeschini, A.-L., Petrillo, C., Martini, E., Faran, N.D., Legois, B., Livera, G., Younis, J.S., Shalev, S., and Veitia, R.A. (2019). A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine* *42*, 524–531.
48. Schulze, W., Thoms, F., and Knuth, U.A. (1999). Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum. Reprod.* *14 (Suppl 1)*, 82–96.
49. Maya, I., Sukenik-Halevy, R., Basel-Salmon, L., and Sagi-Dain, L. (2020). Ten points to consider when providing genetic counseling for variants of incomplete penetrance and variable expressivity detected in a prenatal setting. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *99*, 1427–1429.

Supplemental information

**Whole-exome sequencing improves
the diagnosis and care of men
with non-obstructive azoospermia**

Zine-Eddine Kherraf, Caroline Cazin, Amine Bouker, Selima Fourati Ben Mustapha, Sylviane Hennebicq, Amandine Septier, Charles Coutton, Laure Raymond, Marc Nouchy, Nicolas Thierry-Mieg, Raoudha Zouari, Christophe Arnoult, and Pierre F. Ray

Supplementary table 1: Origin and clinical information on all included patients.

sampleID	Country of origin	Testicular Phenotype	TESE
P0074	Algeria	MeA	NEG
P0075	Tunisia	SCOS	NEG
P0080	Algeria	HS	POS
P0081	Algeria	SCOS	NEG
P0082	Algeria	MeA	NEG
P0083	Tunisia	PrMeA	NEG
P0084	Tunisia	TD	NEG
P0085	Algeria	MeA	NEG
P0086	Tunisia	MeA	NEG
P0087	Tunisia	SCOS and PoMeA	NEG
P0088	Tunisia	MeA	NEG
P0089	Tunisia	SCOS	NEG
P0090	Tunisia	SCOS	NEG
P0091	Tunisia	SCOS	NEG
P0092	Algeria	SCOS	NEG
P0093	Algeria	PoMeA	NEG
P0109	Algeria	MeA	NEG
P0110	Tunisia	MeA	NEG
P0111	Tunisia	SCOS	NEG
P0112	Algeria	SCOS	NEG
P0113	Algeria	SCOS	NEG
P0133	Tunisia	SCOS	POS
P0134	Algeria	HS	POS
P0135	Algeria	TD	POS
P0136	Algeria	TD	POS
P0137	Algeria	PrMeA	NEG
P0138	Algeria	TD	NEG
P0139	Algeria	TD	NEG
P0140	Algeria	SCOS	POS
P0141	Algeria	SCOS	NEG
P0142	Algeria	MeA	NEG
P0143	Tunisia	SCOS	NEG
P0144	Tunisia	MeA	NEG
P0145	Algeria	MeA	NEG
P0195	Tunisia	SCOS	NEG
P0196	Algeria	TD	NEG
P0202	Algeria	MeA	NEG
P0203	Tunisia	MeA	NEG
P0242	Algeria	PrMeA	NEG
P0243	Tunisia	MeA	NEG
P0252	Algeria	PoMeA	NEG
P0253	Tunisia	HS	POS

P0254	Tunisia	TD	POS
P0255	Tunisia	HS and TD	POS
P0256	Lybia	HS	POS
P0257	Tunisia	PoMeA	NEG
P0258	Tunisia	HS	POS
P0259	Tunisia	HS	POS
P0260	Algeria	TD	NEG
P0270	Tunisia	TD	POS
P0271	Algeria	HS	POS
P0272	Algeria	HS	POS
P0273	Tunisia	SCOS	POS
P0274	Tunisia	MeA	POS
P0275	Tunisia	SCOS	NEG
P0276	Tunisia	TD	NEG
P0277	Algeria	SCOS	NEG
P0278	Tunisia	MeA	NEG
P0279	Tunisia	MeA	NEG
P0280	Tunisia	TD	NEG
P0281	Tunisia	SCOS	NEG
P0282	Tunisia	SCOS	NEG
P0283	Tunisia	PoMeA	NEG
P0321	Tunisia	MeA	NEG
P0322	Algeria	SCOS	NEG
P0323	Algeria	PoMeA	POS
P0324	Tunisia	SCOS	NEG
P0325	Tunisia	HS and TD	POS
P0326	Algeria	MeA	NEG
P0327	Tunisia	PoMeA	POS
P0328	Algeria	SCOS	NEG
P0349	Tunisia	SCOS	NEG
P0350	Tunisia	MeA	NEG
P0351	Tunisia	SCOS	NEG
P0352	Algeria	MeA	POS
P0353	Algeria	SCOS	NEG
P0354	Lybia	SCOS	NEG
P0355	Tunisia	MeA	NEG
P0356	Lybia	SCOS	NEG
P0357	Tunisia	SCOS	NEG
P0358	Tunisia	HS	POS
P0359	Lybia	PrMeA	NEG
P0360	Algeria	HS	POS
P0361	Algeria	SCOS	NEG
P0362	Tunisia	SCOS	NEG
P0363	Mauritania	SCOS and TD	NEG
P0364	Algeria	PrMeA	POS
P0365	Tunisia	HS	POS

P0366	Tunisia	SCOS	NEG
P0368	Algeria	MeA	NEG
P0369	Tunisia	MeA	NEG
P0370	Tunisia	SCOS	NEG
P0394	Tunisia	SCOS	NEG
P0400	Tunisia	SCOS	NEG
P0408	Tunisia	PrMeA	NEG
P0433	Algeria	HS	POS

Supplementary table 2: List of all nucleotide primers used in the study.

Gene name	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	Product length (bp)
C14ORF39_EX4-F	TCTGGCTCTAGGATCAGGCC	61.4	500
C14ORF39_EX4-R	AGTTCTATTTCTTCTGATCCTCT	60.1	
DDX25_EX10-F	CATGGTGTCAACAAGCACAGC	59.4	539
DDX25_EX10-F	ACGAGCATTATGTCAGGTGGA	57.9	
DMC1_EX6-F	GCTGATCCACTTGCCCATACA	60.41	490
DMC1_EX6-R	TGAAAAGTGTTGATAAGACCCATCT	58.46	
DMC1_EX13-F	AGCAGCTCCAAAACCTCACCT	59.52	502
DMC1_EX13-R	AACACACAGCATCTGGCAGT	60.18	
FANCM_EX22-F	AGGCGCTCATAGTTACCCCT	60.4	488
FANCM_EX22-R	ACCTGTTAGCCATCCTTTTCACA	60.18	
GCNA_EX10-F	AAACCACGGGCTTTACACCT	59.82	482
GCNA_EX10-R	ACCTGTACCAGGGCTCATCT	59.96	
HENMT1_EX4-F	ACTCCACTCTCCTCCTCA	59.4	555
HENMT1_EX4-R	GTTCAAATGCAGGCGGTGG	59.4	
HENMT1_EX6-F	TGCCTGGCCGAATAATTGT	57.3	518
HENMT1_EX6-R	TGCCAAATGCAATGGTTCC	57.3	
HFM1_EX32-F	TAGGAACGACTGCCAGCAAA	57.3	560
HFM1_EX32-R	TTCTTAGTCAAGCCACAAGT	55.9	
MCM8_EX5-F	TGGCACAAAGCTTATACTTATGTCA	58.1	568
MCM8_EX5-R	ATTTCTGCACAATCTTTAGCAAGA	55.9	

MCMDC2_EX14-F	AAAACCTTCGGGAGGGGAGTG	59.4	521
MCMDC2_EX14-R	TGCCCAAATTAACAGGCCT	55.9	
MEIOB_EX12-F	CAGAGGACTGGTGTACGCAG	61.4	528
MEIOB_EX12-R	TCCCAGGCTGTTTATTAGTGAA	56.5	
MSH5_EX8-F	TCAGGCTGTGCTTTCAGACA	59.53	419
MSH5_EX8-R	AGGCCAGTACCTCCAGAAT	59.96	
PDHA2_F	TCTGTCCGATCCATTCTCGC	59.61	380
PDHA2_R	CCTATCGACCTTTAGCCCAGG	60.18	
REC8_EX12-F	GGGGCTTTTCTGGGAGTACC	61.4	501
REC8_EX12-R	CAAGGCTGCCATTACTCCT	59.4	
TDRD9_EX5-F	TTAGATGAGCCAACCCCTGC	59.4	533
TDRD9_EX5-R	CAAACACAACATTCACCA	57.9	
TDRD9_EX30-F	TGAAGAGAATGAGTTACATCCAGA	59.28	438
TDRD9_EX30-R	CTGCACTCCAGCCTGAATGA	60.03	
TDRKH_EX7-F	TGTACCTCTCACTACCCTGGT	59.8	519
TDRKH_EX7-R	TTCCATTCTCCAAGGTGCC	59.4	

Supplementary table 3: Bibliographic information on the 151 NOA candidate genes.

See the online table:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/14uA4h43deSiwqdrKk81JYPOjnh-E0UI-jK9ntkyburg/edit?usp=sharing>

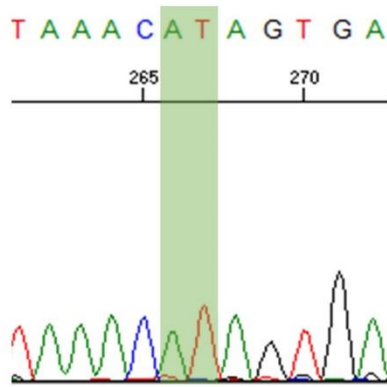
Supplementary Figure 1: Sanger sequencing confirmation of all identified gene variants.

Upper panels: Electrophoregrams from Sanger sequencing showing the identified variants. The substituted/deleted nucleotides are highlighted in green.

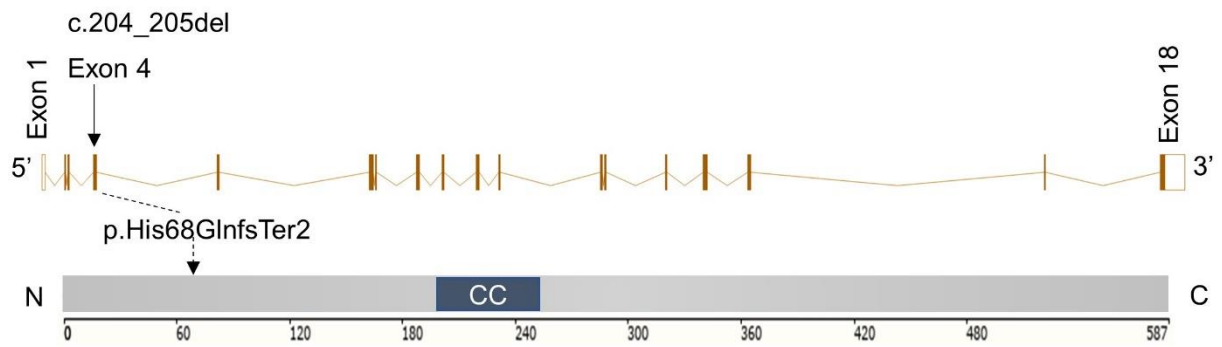
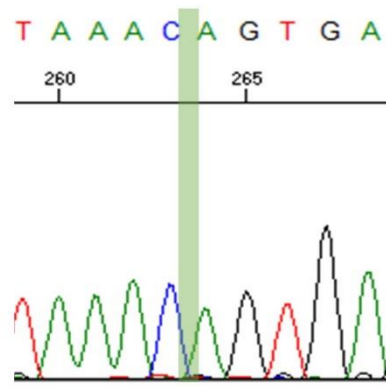
Lower Panel: Location of these variants within each gene and protein represented with domains (according to UniprotKB).

C14orf39 ENST00000321731.7

Control

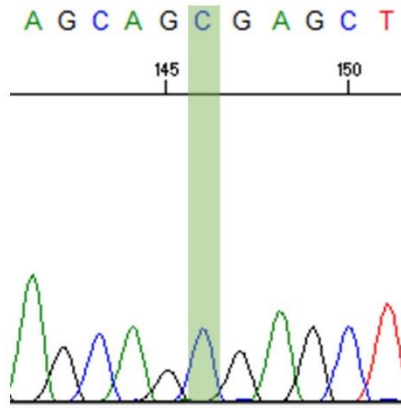


Patient

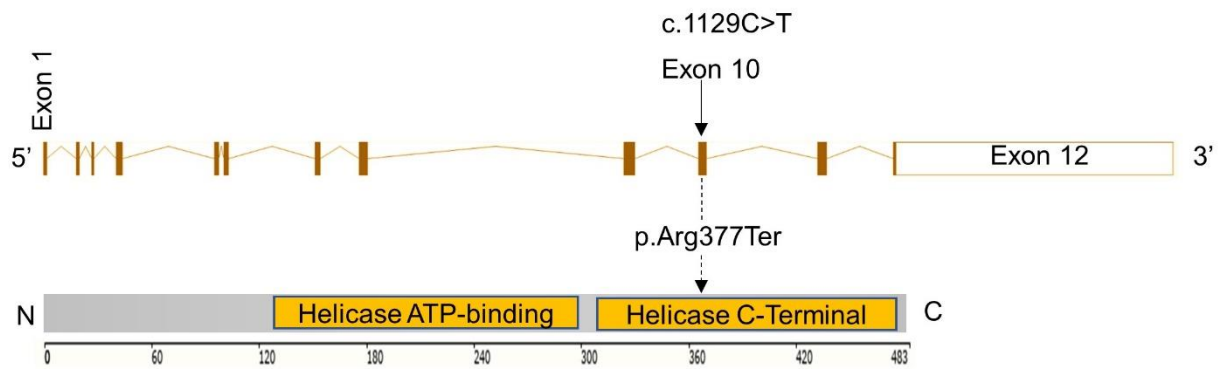
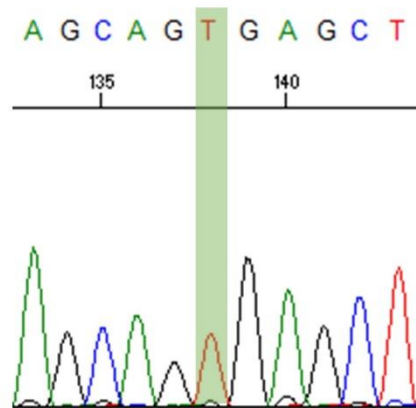


DDX25 ENST00000263576.10

Control



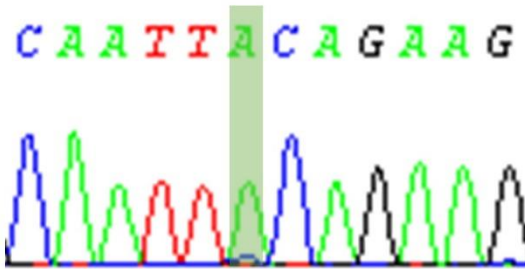
Patient



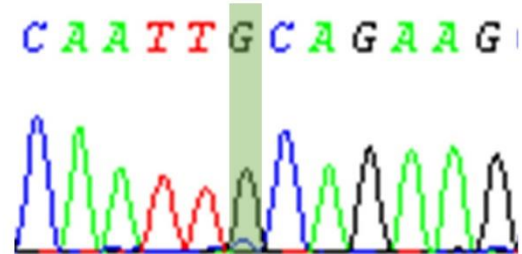
DMC1 ENST00000216024.6

Exon 6

Control

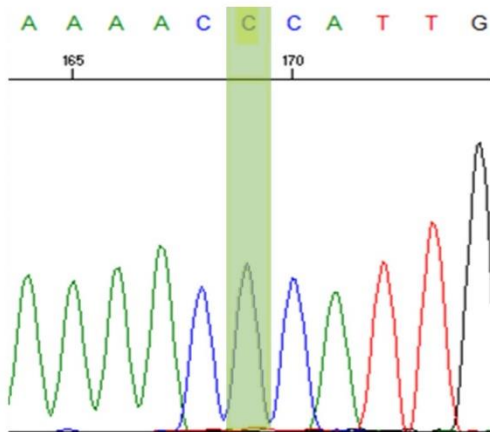


Patient

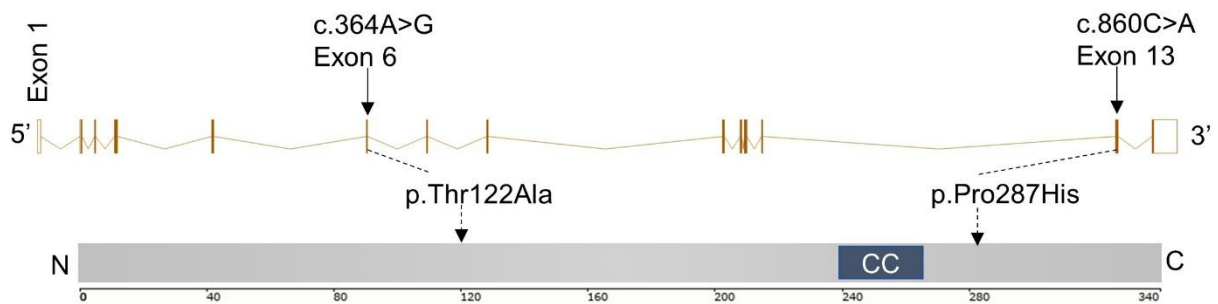
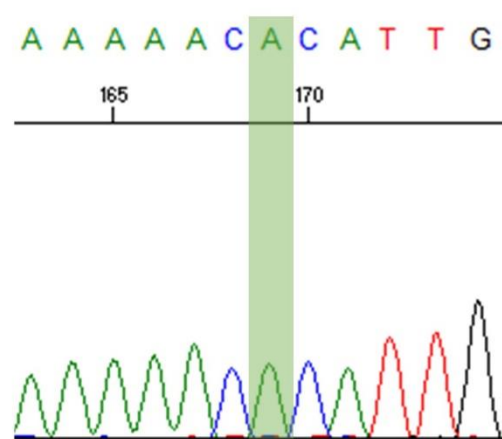


Exon 13

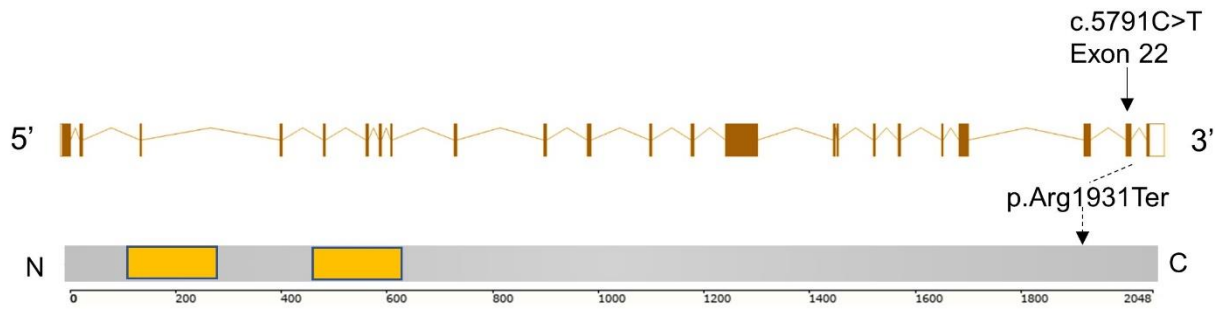
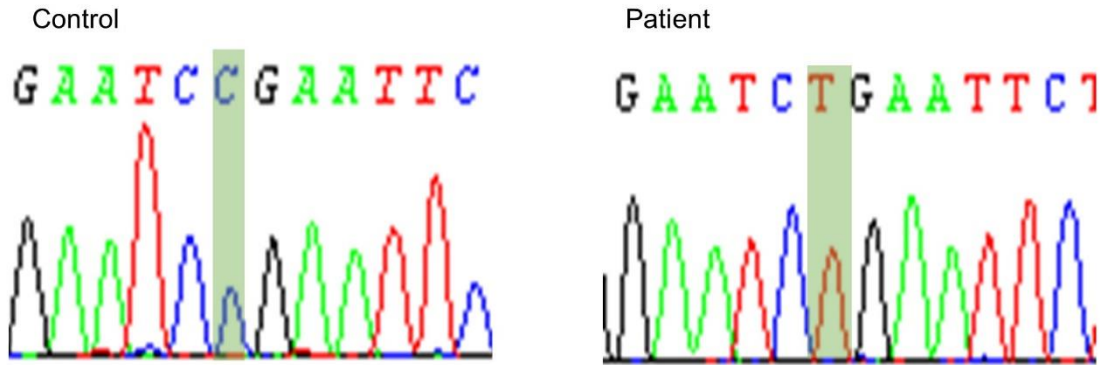
Control



Patient

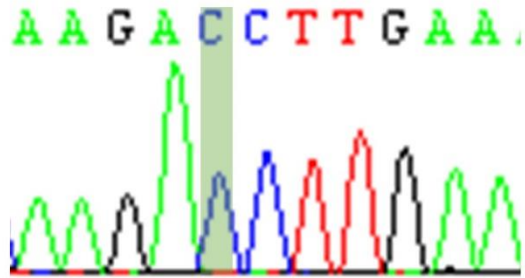


FANCM ENST00000267430.9

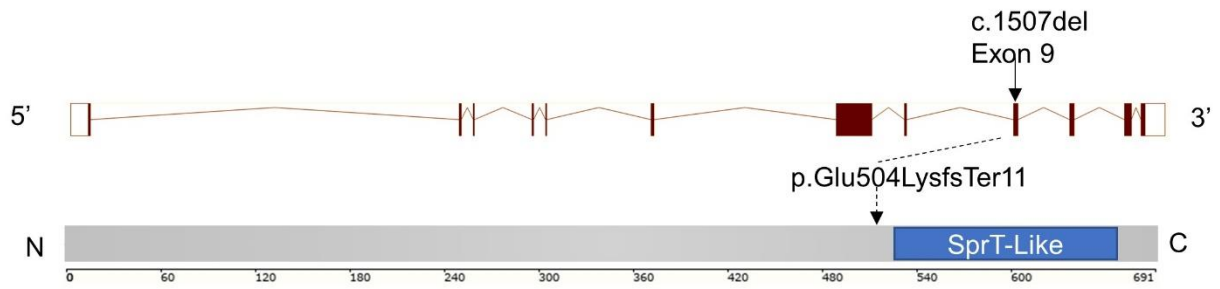
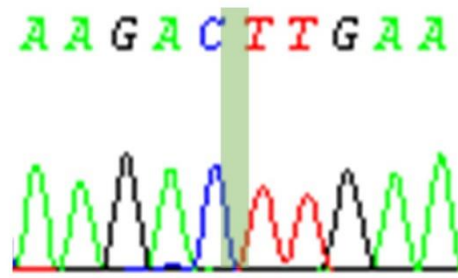


GCNA ENST00000373695.1

Control



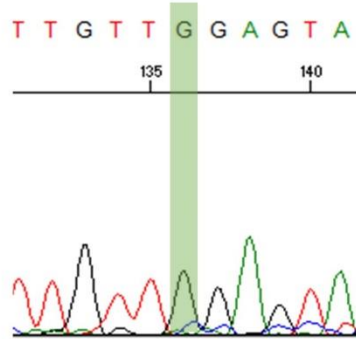
Patient



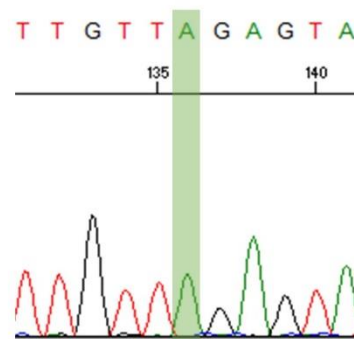
HENMT1 ENST00000370032

Exon 4

Control

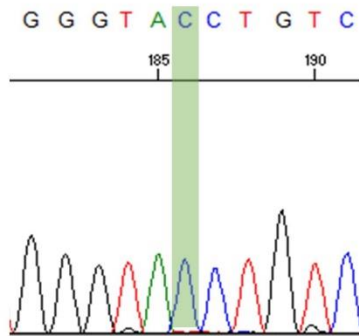


Patient

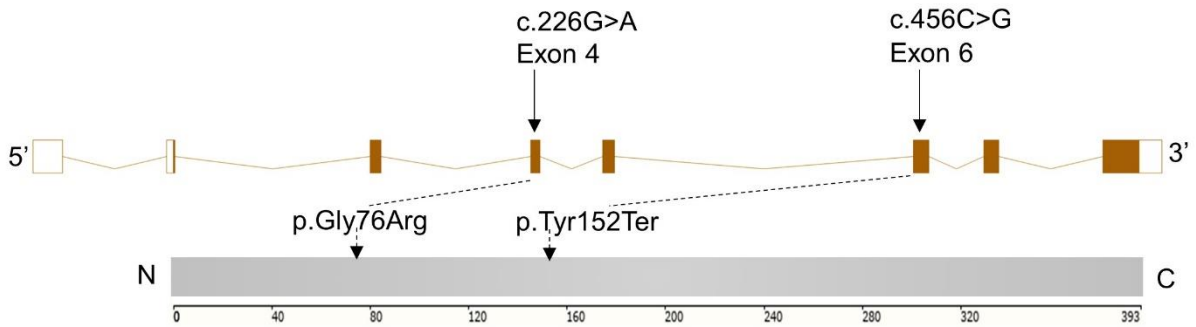
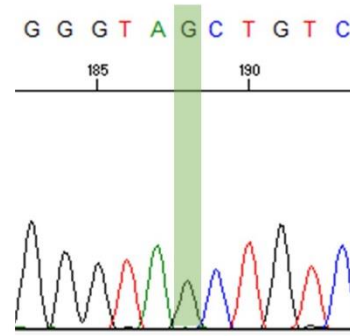


Exon 6

Control

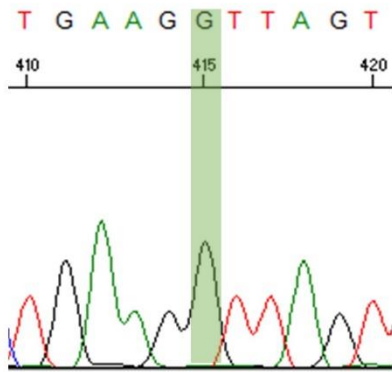


Patient

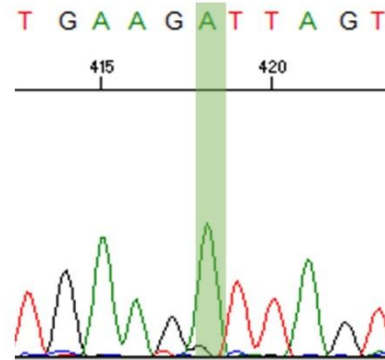


HFM1 ENST00000370425.7

Control

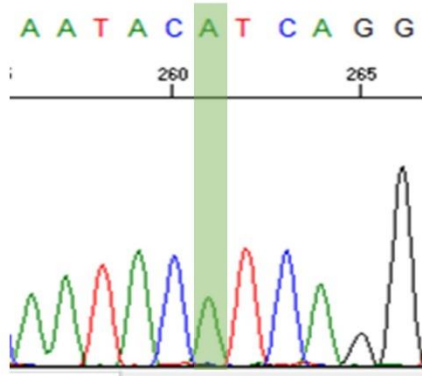


Patient

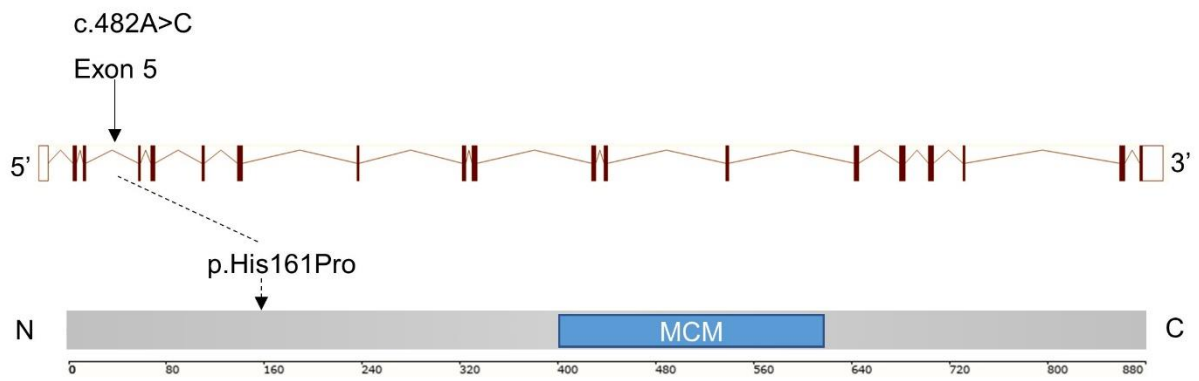
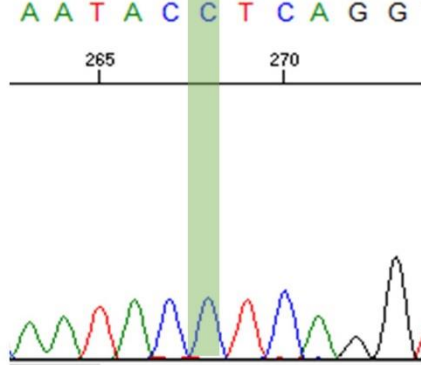


MCM8 ENST00000378886.6

Control

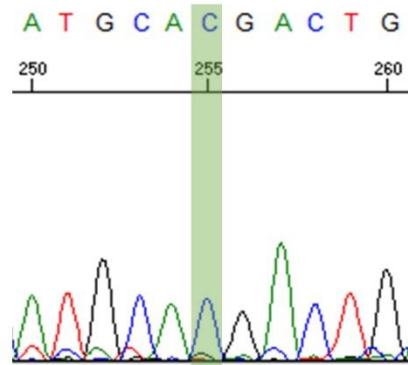


Patient

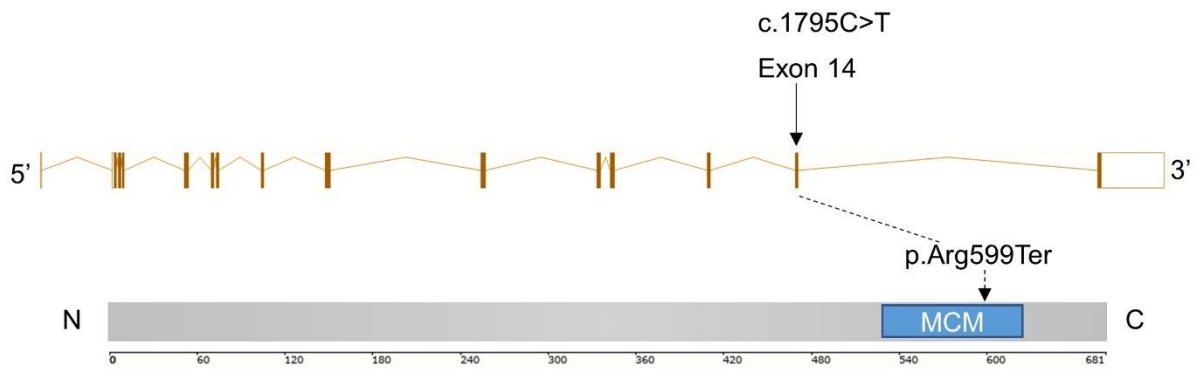
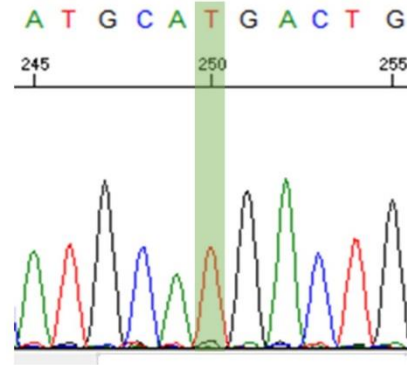


MCMD2 ENST00000422365.6

Control

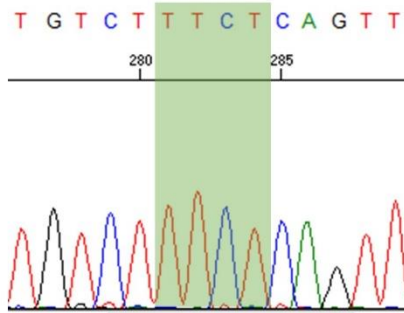


Patient

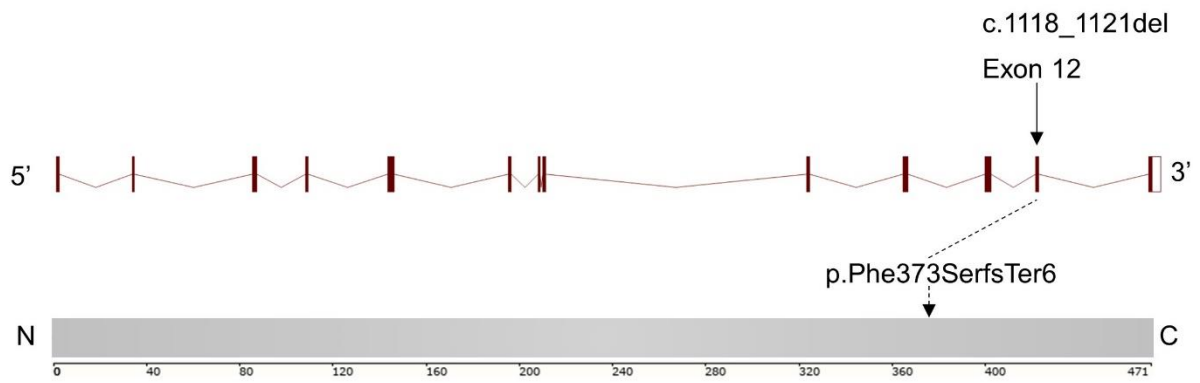
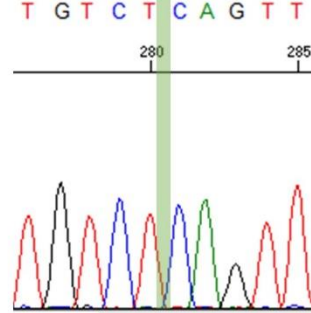


MEIOB ENST00000325962.7

Control

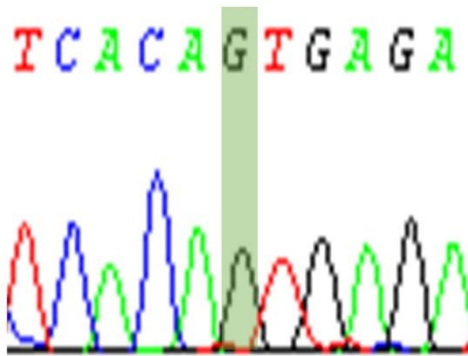


Patient

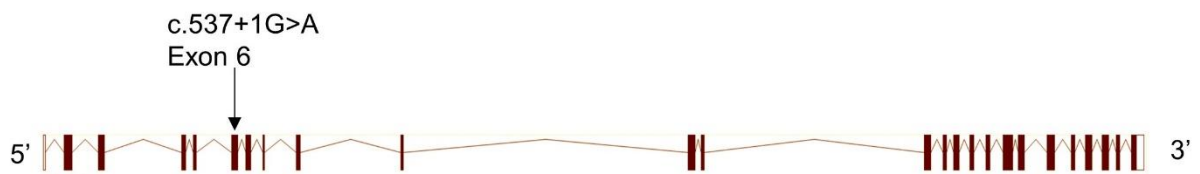
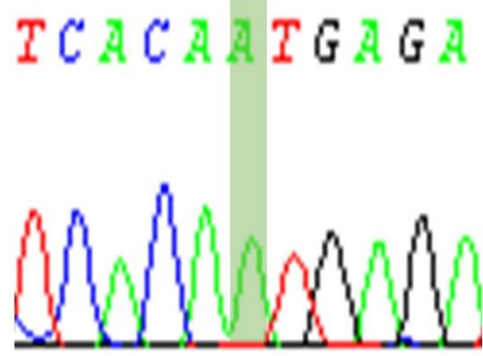


MSH5 ENST00000375703.7

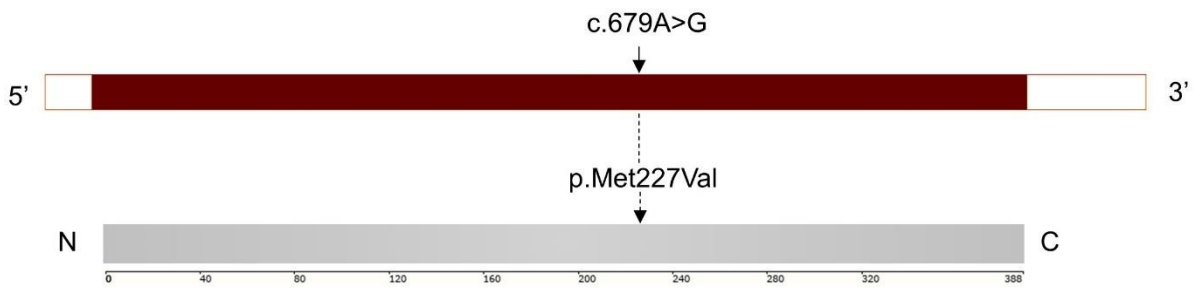
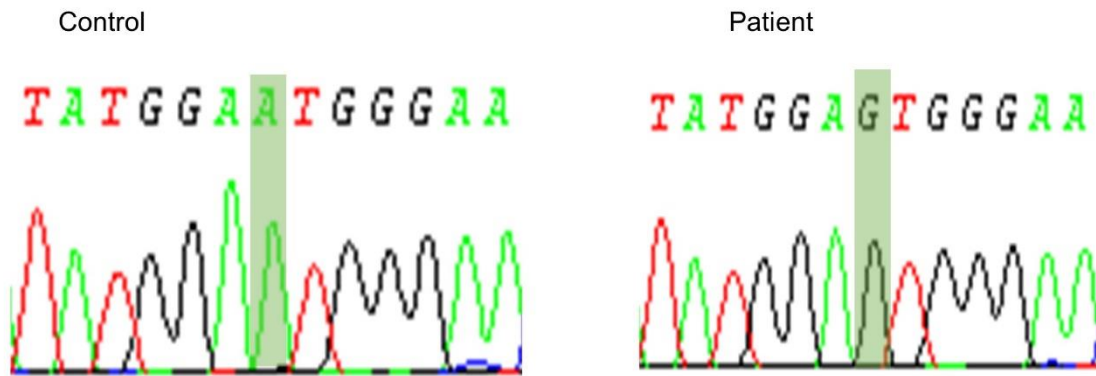
Control



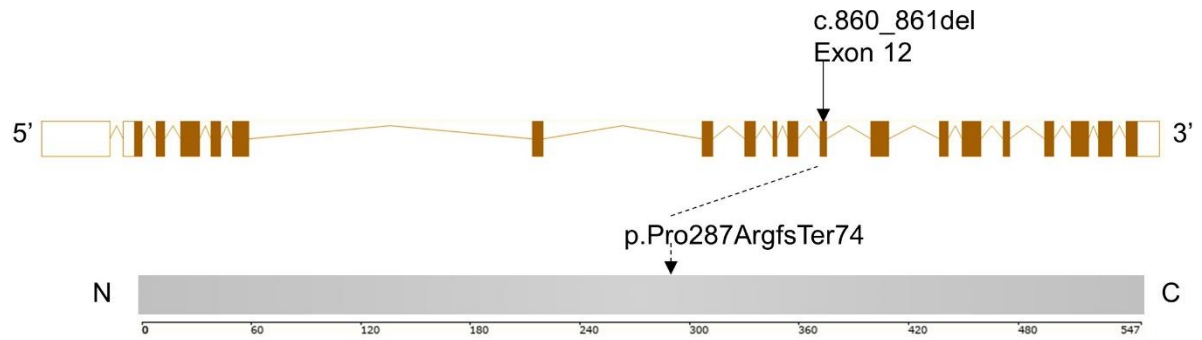
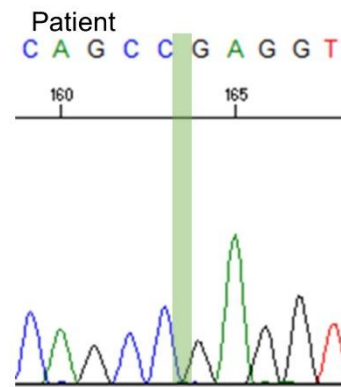
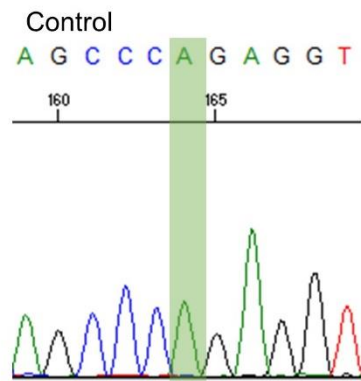
Patient



PDHA2 ENST00000295266.5



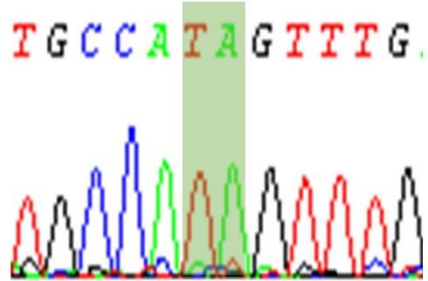
REC8 ENST00000620473.4



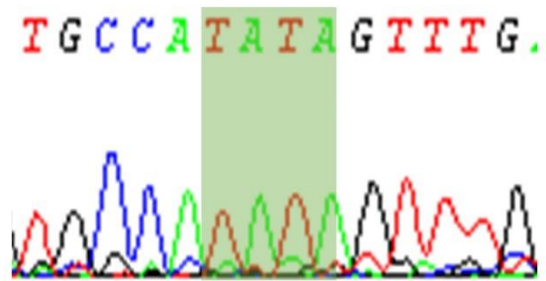
TDRD9 ENST00000409874.8

Exon 30

Control

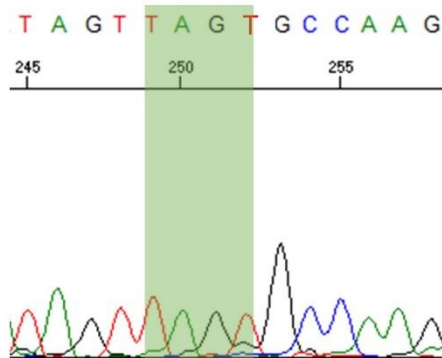


Patient

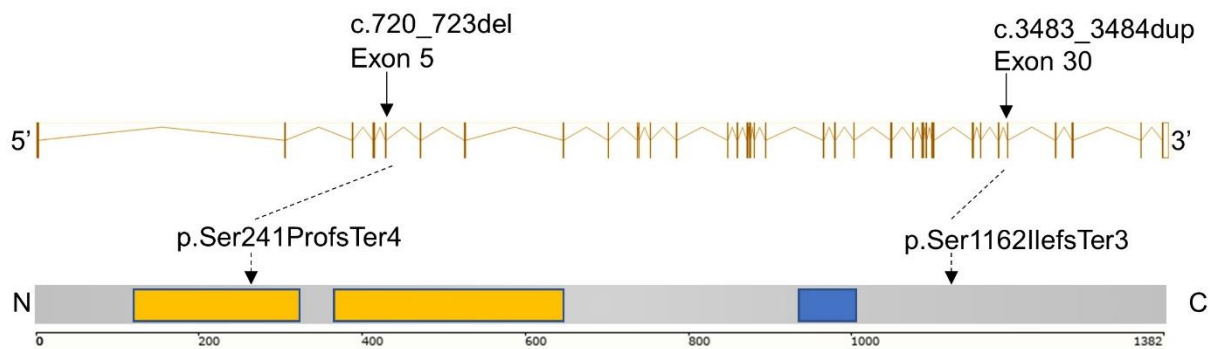
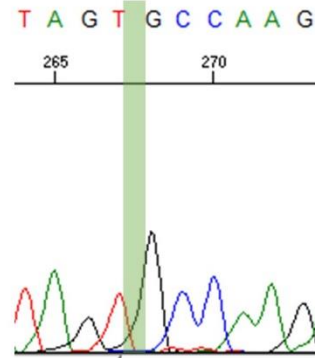


Exon 5

Control

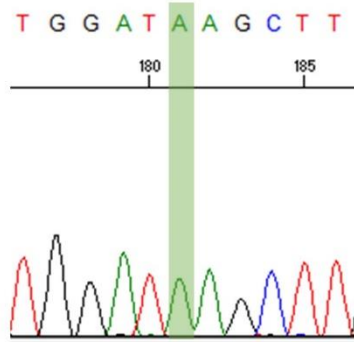


Patient

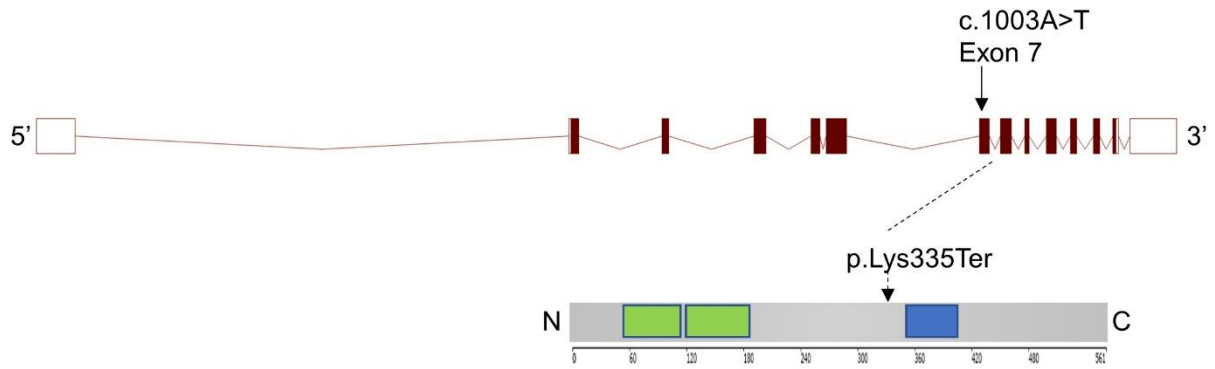
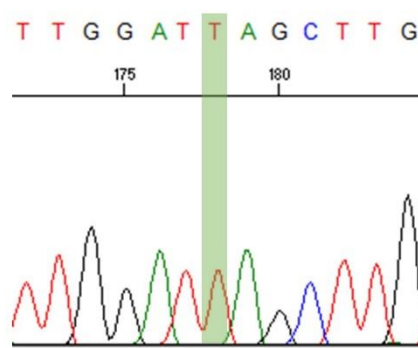


TDRKH ENST00000368822.5

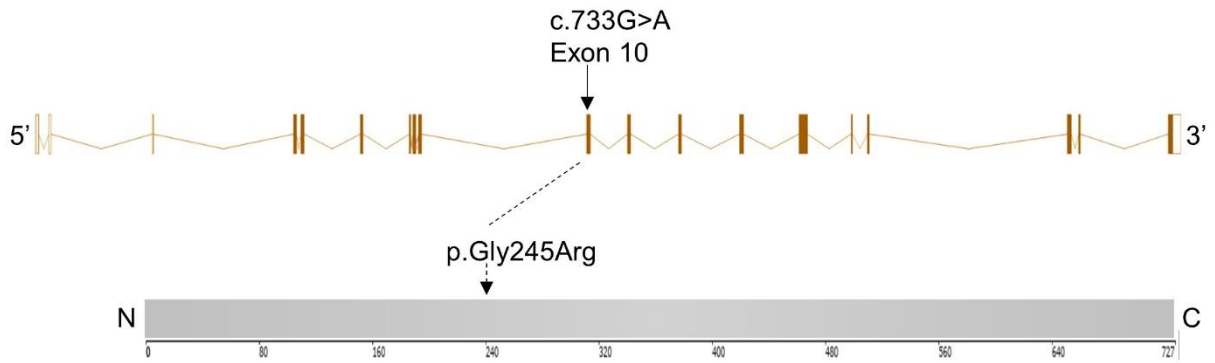
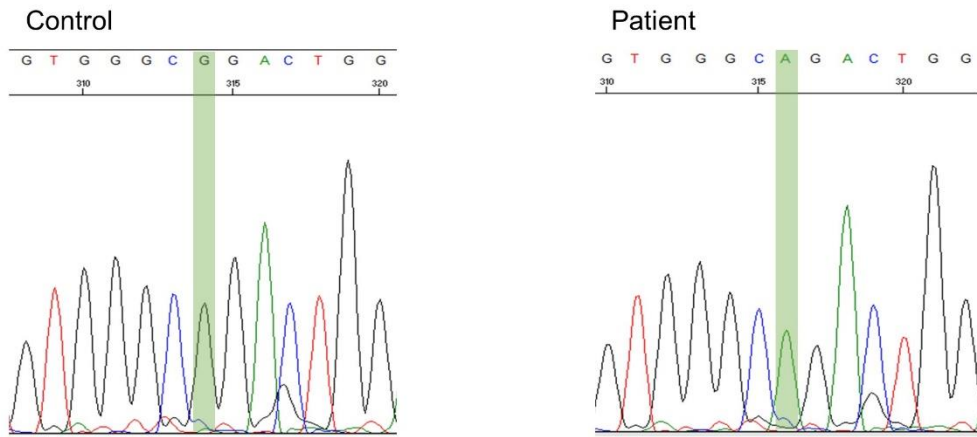
Control



Patient



TERB1 ENST00000433154.5



II. Article 2

« Combined Use of Whole Exome Sequencing and CRISPR/Cas9 to Study the Etiology of Non-Obstructive Azoospermia: Demonstration of the Dispensable Role of the Testis-Specific Genes *C1orf185* and *CCT6B*. »

Caroline Cazin, Yasmine Neirijnck, Corinne Loeuillet, Lydia Wehrl, Françoise Kühne, Isabelle Lordey, Selima Fourati Ben Mustapha, Amin Bouker, Raoudha Zouari, Nicolas Thierry-Mieg, Serge Nef, Christophe Arnoult, Pierre F Ray, Zine-Eddine Kherraf

Cells. 2021 Dec 30;11(1):118. doi: 10.3390/cells11010118. PMID: 35011680; PMCID: PMC8750304.





Contexte

On estime qu'au moins 4000 gènes sont impliqués dans la spermatogenèse humaine, ce qui représente autant de candidats potentiels pour expliquer les anomalies spermatiques responsables de la majorité des infertilités masculines. La composante génétique de l'infertilité masculine est complexe et hétérogène. Dans cette étude, nous avons analysé par séquençage exomique deux patients infertiles non apparentés. Ces deux sujets présentaient une ANO non syndromique et idiopathique. Comme ces sujets sont issus de parents consanguins, nous avons postulé que l'étiologie de leur affection était très probablement liée à une cause génétique à transmission autosomique récessive. L'analyse bio-informatique a donc été focalisée sur les variants homozygotes. Après une première étape d'analyse des données d'exome basée sur l'investigation des variants localisés dans des gènes candidats dans l'ANO (panel *in silico* de 151 gènes), nous nous sommes intéressés aux variants localisés dans des gènes à expression testiculaire spécifique ou dominante chez l'homme et la souris, et dont la fonction et/ou l'implication dans l'infertilité masculine ne sont pas connues. Cette dernière analyse m'a permis d'identifier pour chaque sujet testé un variant homozygote perte de fonction dans un gène exprimé spécifiquement dans les cellules germinales testiculaires, *C1orf185* (c.250C>T ; p.Gln84Ter) et *CCT6B* (c.615-2A>G). Ces deux variants sont rares dans la population générale (fréquence allélique < 0.005% selon gnomAD) et absents de notre cohorte locale de sujets contrôles (n=445). Pour vérifier l'implication de ces gènes candidats dans l'ANO, nous avons employé la technique CRISPR/Cas9 pour invalider les orthologues murins des gènes candidats identifiés chez nos patients et avons produit deux lignées de souris « knock-out » (KO). J'ai alors réalisé un phénotypage détaillé de ces lignées et j'ai ainsi montré que les mâles KO homozygotes étaient fertiles et présentaient des paramètres spermatiques et un volume testiculaire comparable aux souris contrôles ainsi qu'une spermatogenèse

fonctionnelle. Il est cependant possible qu'il existe une variabilité phénotypique entre l'homme et la souris. Ainsi, bien que ces résultats soient à prendre avec précaution, ils montrent que tous les gènes fortement et spécifiquement exprimés dans les testicules ne sont pas essentiels à la spermatogenèse et en particulier, *C1orf185* et *CCT6B*. Etant donné que nous avons pu établir une liste d'une vingtaine de gènes candidats pour l'ANO, à forte expression testiculaire et dont la fonction n'est pas connue, il serait intéressant de procéder à la validation fonctionnelle de ces gènes dans le but d'identifier un nouveau gène causal de l'ANO et ainsi d'affiner nos connaissances sur les causes génétiques de l'infertilité masculine.

Article

Combined Use of Whole Exome Sequencing and CRISPR/Cas9 to Study the Etiology of Non-Obstructive Azoospermia: Demonstration of the Dispensable Role of the Testis-Specific Genes *C1orf185* and *CCT6B*

Caroline Cazin ^{1,2}, Yasmine Neirijnck ³, Corinne Loeuillet ¹, Lydia Wehrli ³, Françoise Kühne ³, Isabelle Lordey ², Selima Fourati Ben Mustapha ⁴, Amin Bouker ⁴, Raoudha Zouari ⁴, Nicolas Thierry-Mieg ⁵, Serge Nef ³, Christophe Arnoult ¹, Pierre F. Ray ^{1,2} and Zine-Eddine Kherraf ^{1,2,*}

- ¹ Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, Institute for Advanced Biosciences, University Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, 38000 Grenoble, France; EXT-CCazin@chu-grenoble.fr (C.C.); corinne.loeuillet@univ-grenoble-alpes.fr (C.L.); christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr (C.A.); PRay@chu-grenoble.fr (P.F.R.)
- ² UM GI-DPI, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; ilordey@chu-grenoble.fr
- ³ Department of Genetic Medicine and Development, Faculty of Medicine, University of Geneva, CH-1211 Genève 4, Switzerland; Yasmine.NEIRIJNCK@univ-cotedazur.fr (Y.N.); Lydia.Wehrli@unige.ch (L.W.); Françoise.Kühne@unige.ch (F.K.); Serge.Nef@unige.ch (S.N.)
- ⁴ Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Polyclinique les Jasmins, Centre Urbain Nord, Tunis 1003, Tunisia; fourati_selima@yahoo.fr (S.F.B.M.); aminbouker@gmail.com (A.B.); raoudha.zouari@cliniquelesjasmins.com.tn (R.Z.)
- ⁵ TIMC-IMAG, CNRS and Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; Nicolas.Thierry-Mieg@univ-grenoble-alpes.fr
- * Correspondence: ZEKherraf@chu-grenoble.fr; Tel.: +33-(0)4-7676-8303



Citation: Cazin, C.; Neirijnck, Y.; Loeuillet, C.; Wehrli, L.; Kühne, F.; Lordey, I.; Mustapha, S.F.B.; Bouker, A.; Zouari, R.; Thierry-Mieg, N.; et al.

Combined Use of Whole Exome Sequencing and CRISPR/Cas9 to Study the Etiology of Non-Obstructive Azoospermia: Demonstration of the Dispensable Role of the Testis-Specific Genes *C1orf185* and *CCT6B*. *Cells* **2022**, *11*, 118. <https://doi.org/10.3390/cells11010118>

Academic Editor: Silvia Garagna

Received: 15 December 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 30 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The genetic landscape of male infertility is highly complex. It is estimated that at least 4000 genes are involved in human spermatogenesis, but only few have so far been extensively studied. In this study, we investigated by whole exome sequencing two cases of idiopathic non-obstructive azoospermia (NOA) due to severe hypospermatogenesis. After variant filtering and prioritizing, we retained for each patient a homozygous loss-of-function (LoF) variant in a testis-specific gene, *C1orf185* (c.250C>T; p.Gln84Ter) and *CCT6B* (c.615-2A>G), respectively. Both variants are rare according to the gnomAD database and absent from our local control cohort ($n = 445$). To verify the implication of these candidate genes in NOA, we used the CRISPR/Cas9 system to invalidate the mouse orthologs *4930522H14Rik* and *Cct6b* and produced two knockout (KO) mouse lines. Sperm and testis parameters of homozygous KO adult male mice were analyzed and compared with those of wild-type animals. We showed that homozygous KO males were fertile and displayed normal sperm parameters and a functional spermatogenesis. Overall, these results demonstrate that not all genes highly and specifically expressed in the testes are essential for spermatogenesis, and in particular, we conclude that bi-allelic variants of *C1orf185* and *CCT6B* are most likely not to be involved in NOA and male fertility.

Keywords: spermatogenesis; non-obstructive azoospermia; genetics of male infertility; whole exome sequencing; CRISPR/Cas9; *C1orf185*; *CCT6B*

1. Introduction

Infertility, or the inability to conceive, remains a prevalent and ongoing global health concern [1]. Infertility is currently estimated to affect 9% of reproductive-aged couples worldwide, with approximately half involving a male factor [2,3]. The male factor is related to a variety of causes ranging from genetic abnormalities to lifestyle choice [4]. The genetic landscape of male infertility is highly complex as semen and testis histological phenotypes

are extremely heterogeneous. It is estimated that at least 4000 genes are involved in human spermatogenesis, but only few have so far been extensively studied [5].

A comprehensive and in-depth understanding of genetic factors in spermatogenesis abnormalities will play important roles in the clinical diagnosis, treatment, and genetic counseling of male infertility. Currently, the discovery of novel genetic factors in idiopathic infertility is a major challenge in the fields of reproductive medicine and andrology. The highest frequency of known genetic factors contributing to male infertility (25%) is in azoospermia [6]. The diagnostic yield of genetic tests in azoospermia varies depending on the etiology of the disorder, with a diagnosis yield of approximately 90% for congenital bilateral absence of vas deferens (obstructive azoospermia) and only 30% due to a spermatogenic defect (NOA) [7]. This last condition is known as non-obstructive azoospermia (NOA) and is considered as the most severe form of male infertility. In addition, non-obstructive azoospermic men showed the worst health status impairment and should be strictly followed-up regardless of their fertility status [8].

The use of whole exome sequencing (WES) for the detection of disease-causing variants of genetic diseases is a major clinical application of next generation sequencing (NGS). WES allowed the discovery of an increasing number of monogenic defects of NOA with a current list of 38 candidate genes [7]. However, a major difficulty remains as to how to proceed with the many candidates with a possible but unconfirmed pathogenic effect (variants of unknown significance, VUS) that remains after filtering with all available methods. Functional analyses, especially for genes that are not yet well characterized, can be time-consuming and expensive [9].

The mouse model, due to its amenability and its genetic and physiological similarities with man, is extensively used to study human health and diseases. The creation of genetically modified mice as models of human disease has remarkably changed our ability to understand the molecular mechanisms and cellular pathways underlying disease states. Knockout (KO) mice have been pivotal in studying gene function in vivo. Historically, the study of KO animals is the “gold standard” to determine whether a gene’s function is essential in vivo. In the era of CRISPR/Cas9-based genome engineering, the generation of genetically modified mice becomes much more flexible, accurate, efficient, and cost-effective. The functions of testis-specific genes can be assessed in vivo by creating male mice carrying a null mutation in the genes of interest. Upon the production of KO mouse lines, the essentiality of the deleted genes can be readily determined by examining the fertility of homozygous male offspring.

In the present study, we investigated by WES two unrelated infertile patients born from consanguineous parents and displaying idiopathic non-obstructive azoospermia associated with severe hypospermatogenesis. After variants filtering and prioritizing, we retained for each individual a homozygous truncating variant in a testis-specific gene (*C1orf185* or *CCT6B*). To study the impact of loss-of-function (LoF) bi-allelic variants of these genes in sperm production and male fertility, we generated two KO mouse lines by introducing homozygous frameshift mutations in the corresponding orthologs *493052H14Rik* and *Cct6b*. Homozygous KO males were fertile and showed normal sperm production, thus excluding an essential role of these genes for spermatogenesis and male fertility.

Overall, these results demonstrate the primordial role of in vivo testing of the impact of candidate testis-specific genes on spermatogenesis and male fertility through the production of KO mouse lines after WES investigation of infertile patients and the identification of candidate LoF variants. The current and future efforts to examine the molecular and genetic factors responsible for spermatogenesis and fertilization should give a better understanding of the etiologies of male infertility and enable improves in patient care [4].

2. Material and Methods

2.1. Patients and Biological Samples

Two unrelated infertile men were included in the present study displaying non-syndromic infertility due to idiopathic non-obstructive azoospermia. Subjects were recruited at the Clinique des Jasmins in Tunis (Tunisia).

Informed consent was obtained from all individuals participating in the study according to local protocols and the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by local ethics committees, and samples were then stored at the Fertithèque collection declared to the French Ministry of Health (DC-2015–2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016–392).

2.2. WES and Variant Filtering

Genomic DNA was isolated from blood samples or saliva using the Oragen DNA Extraction Kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Canada). Genetic data were obtained from Novogene (Hong Kong, China, HiSeqX). Coding regions and intron/exon boundaries were sequenced after enrichment using SureSelect Human All Exon V6 from Agilent.

An alignment-ready GRCh38 reference genome (including alternative sequences (ALT), decoy, and human leukocyte antigens (HLA)) was produced using “run-gen-ref hs38DH” from Heng Li’s bwakit package [10]. The exomes were analyzed using a bioinformatics pipeline developed in-house. The pipeline consists of two modules, both distributed under the GNU General Public License v3.0 and available on github.

The first module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Primary>, accessed on 5 November 2018) takes FASTQ files as input and produces a single merged GVCF file, as follows. Adaptors are trimmed and low-quality reads are filtered with fastp 0.20.0 [11], reads are aligned with BWA-MEM 0.7.17 [12], duplicates are marked using sambalster 0.1.24 [13], and BAM files are sorted and indexed with samtools 1.9 [14]. SNVs (single nucleotide variants) and short indels are called from each BAM file using strelka 2.9.10 to produce individual GVCF files [15]. These are finally merged with GVCfs.pl to obtain a single multi-sample GVCF, which combines all exomes available in our laboratory.

The second module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Secondary>, accessed on 20 November 2018) takes this merged GVCF as input and produces annotated analysis ready TSV files. This is achieved by performing up to 15 streamlined tasks including the following: low-quality variant calls (read depth (DP) < 10, genotype quality for variant filtration (GQX) < 20, or less than 15% of reads supporting the ALT allele) are discarded; Variant Effect Predictor v92 [16] is used to annotate the variants and predict their impact, allowing us to filter low-impact variants and/or prioritize high-impact ones (e.g., stop-gain or frameshift variants) [16]; gene expression data from the Genotype-Tissue Expression project (GTEx v7) are added; variants with a minor allele frequency greater than 1% in gnomAD v2.0, 3% in 1000 Genomes Project phase 3, or 5% in NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) ESP6500 are filtered. Variants are also compared to those obtained from 485 exomes of healthy control individuals or of patients presenting a clearly different phenotype. Because all variants result from the same bioinformatics pipeline, this allows us to filter artifacts due to the pipeline itself as well as genuine variants that may be missing from public databases, but are actually not so rare in our cohorts. Finally, the resulting TSV files can be opened with spreadsheet software such as LibreOffice Calc or Microsoft Excel for further filtering and sorting, in order to identify candidate causal variants.

2.3. Sanger Verification of the Variant

Variants identified by WES were subjected to Sanger verification using an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analyses were performed using SeqScape software 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer sequences and their expected product sizes are summarized in Supplementary Table S3.

2.4. CRISPR/Cas9—Mediated Mice Genome Edition

Crispr/Cas9 gene editing was used to knockout *4930522H14Rik* and *Cct6b*, respectively, as described in Supplementary Figure S1A. To produce a large frameshift deletion, we designed a dual-gRNA targeting a single coding exon at the beginning of the gene of interest (Supplementary Table S4). Guide RNA, TracrRNA, ssDNA, and Cas9 were purchased from Integrated DNA Technologies. Oocyte injection and embryo transfer were performed by the Transgenic Core Facility of the Faculty of Medicine, University of Geneva. Briefly, gRNA and TracrRNA were annealed at equimolar concentration prior to complex formation with the Cas9 nuclease. Ribonucleoprotein complexes were co-injected into B6D2F1 oocytes. Microinjected oocytes were introduced into pseudopregnant host females and carried to term. Edited founders were identified by PCR and Sanger sequencing from digit biopsies. Mice carrying the desired modification events (frameshift mutation) were crossed with B6D2F1 to ensure germline transmission and eliminate any possible mosaicism. Heterozygous animals with the same modification were then mated to generate homozygous offspring (Supplementary Figure S1B).

2.5. Mice Genotyping Strategy

DNA for genotyping was isolated from tail biopsies. Tail biopsies (2 mm in length) were digested in 200 μ L of Direct PCR Lysis Reagent (Tail) (Viagen Biotech Inc, Los Angeles, CA, USA) and 0.2 mg of proteinase K for 12–15 h at 55 °C followed by 1 h at 85 °C for proteinase K in activation. The DNA was directly used for PCRs. PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis. Genotypes were determined according to the migration pattern. Primers are described in Supplementary Table S5. Sequence analyses were carried out on ABI3500XL (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using seqscape software (Applied Biosystems).

2.6. Phenotypic Analysis of Mutant Mice

All procedures were conducted in Geneva until the birth of the modified litters (F0 generation). Animals of interest were then transferred to the University Grenoble Alpes (UGA). All animal work was conducted according to the ethical guidelines of the French local Ethical Committee (ComEth Grenoble No. 318, Ministry Agreement Number #7128 UHTA-U1209-CA) and the Direction Générale de la Santé (DGS) for the State of Geneva.

Mice were housed with unlimited access to food and water and were sacrificed by cervical dislocation after they were eight weeks old, which means that they were pubescent and that their reproductive organs were fully established.

To test fertility, pubescent homozygous KO and WT males (8 week-old) were mated with WT females for at least two months. The females were checked for the presence of vaginal plugs and pregnancy. The number of mice achieving a pregnancy and the litter size of each mating set or pregnancy were recorded. We tested in this study (due to the COVID-19 pandemic) a single KO animal and at least two WT animals for each mouse line. Because the main aim of this study was to validate or invalidate the implication of the identified candidate genes in NOA, we focused our phenotypic analysis on quantitative spermatogenic defects in KO mice, leading to oligozoospermia or azoospermia. The qualitative defects such as morphological and functional defects of sperm cells produced by KO animals were not fully investigated in this study, and therefore related data are not reported in the present paper.

To determine sperm concentration, adult males were euthanized and sperm samples were collected from the cauda epididymis and vas deferens. Spermatozoa were released in 1 mL of PBS solution by making a series of incisions in these ducts. Sperm number was determined using a hemocytometer under a light microscope, after 2 min of fixation by paraformaldehyde 4% to immobilize motile cells. Sperm motility and morphology were examined under a light microscope to rule out any obvious abnormalities compared to WT animals.

To analyze testicular integrity, testes from adult wild-type (WT) and KO mice were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) for 14 h, embedded in paraffin, and sectioned (7 μ m). For histological analysis, after being deparaffinized, slides were stained with hematoxylin and eosin. The colored sections were digitized at $\times 20$ magnification through an axioscan slide scanner (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage.

2.7. Statistical Analyses

n represents the number of biological replicates. For sperm analyses, for each replicate, more than 100 sperm were assessed per condition. Statistical analyses were performed with GraphPAD prism software 6 (San Diego, CA, USA). *t*-Tests were used to compare the WT and KO samples. Data represent mean \pm SEM or SD, as indicated. Statistical tests with a two-tailed *p*-value ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Medical Assessment of Two Infertile Men Displaying Idiopathic Non-Obstructive Azoospermia

Two unrelated men, P0280 and P0365, with an age of 44 and 43 years, respectively, sought medical care at the Clinique des Jasmins in Tunis (Tunisia) for primary infertility. Both patients were of North African origin and were born from related parents (Figure 1A). Analyses of their ejaculates evidenced a total absence of sperm cells (Table 1). P0280 presented very small testes (<5 mL) with elevated follicular stimulating hormone (FSH) level (37 UI/L normal range: 1.5–12.4) whereas P0365 had a normal FSH level (5.73 UI/L) and a testis volume ranging between 10–15 mL (normal > 15 mL). Patients did not present any symptom related to hypogonadism. Plasmatic testosterone level in these subjects was normal, ranging from 3.45 to 7.3 ng/mL. Karyotypes were normal (46,XY) and Y chromosome microdeletion within the AZF (azoospermia factor) region was excluded.

Table 1. Clinical and biological characteristics of the studied subjects.

	P0365	P0280
Age (years)	43	44
Geographical origin	Tunisia	Tunisia
Consanguinity	Yes (1st degree)	Yes (1st degree)
Testosterone (ng/mL) (N: 2.5–10.6)	5.52	3.45
FSH (UI/L) (N: 1.5–12.4)	5.73	37
Karyotype	46,XY	46,XY
AZF microdeletions	Negative	Negative
Testicular volume (left/right, mL) (N: >15)	10–15/10–15	<5/<5
Testicular histology	Severe hypospermatogenesis	Severe hypospermatogenesis associated with seminiferous tubules hyalinization
Sperm retrieval	Positive (rare spermatozoa)	Negative

N = normal range.

Men displaying NOA may have sperm cells in their testes that could be retrieved through a surgical procedure such as microdissection testicular sperm extraction (mTESE) [17]. mTESE was performed in both patients for assisted reproduction. Histological analysis of the testicular fragments evidenced a severe quantitative defect of spermatogenesis (Figure 1B). P0365, a sub-testicular phenotype of hypospermatogenesis characterized by the rarefaction of germ cells within the seminiferous tubules, leads to an extremely low production of elongated spermatids. The mTESE procedure was positive in this case

and allowed us to retrieve few sperm cells with bad quality. For P0280, the testicular sub-phenotype was more severe compared to P0365 and evidenced severe hypospermatogenesis associated with seminiferous tubules hyalinization. As expected for this case, mTESE failed to retrieve spermatozoa.

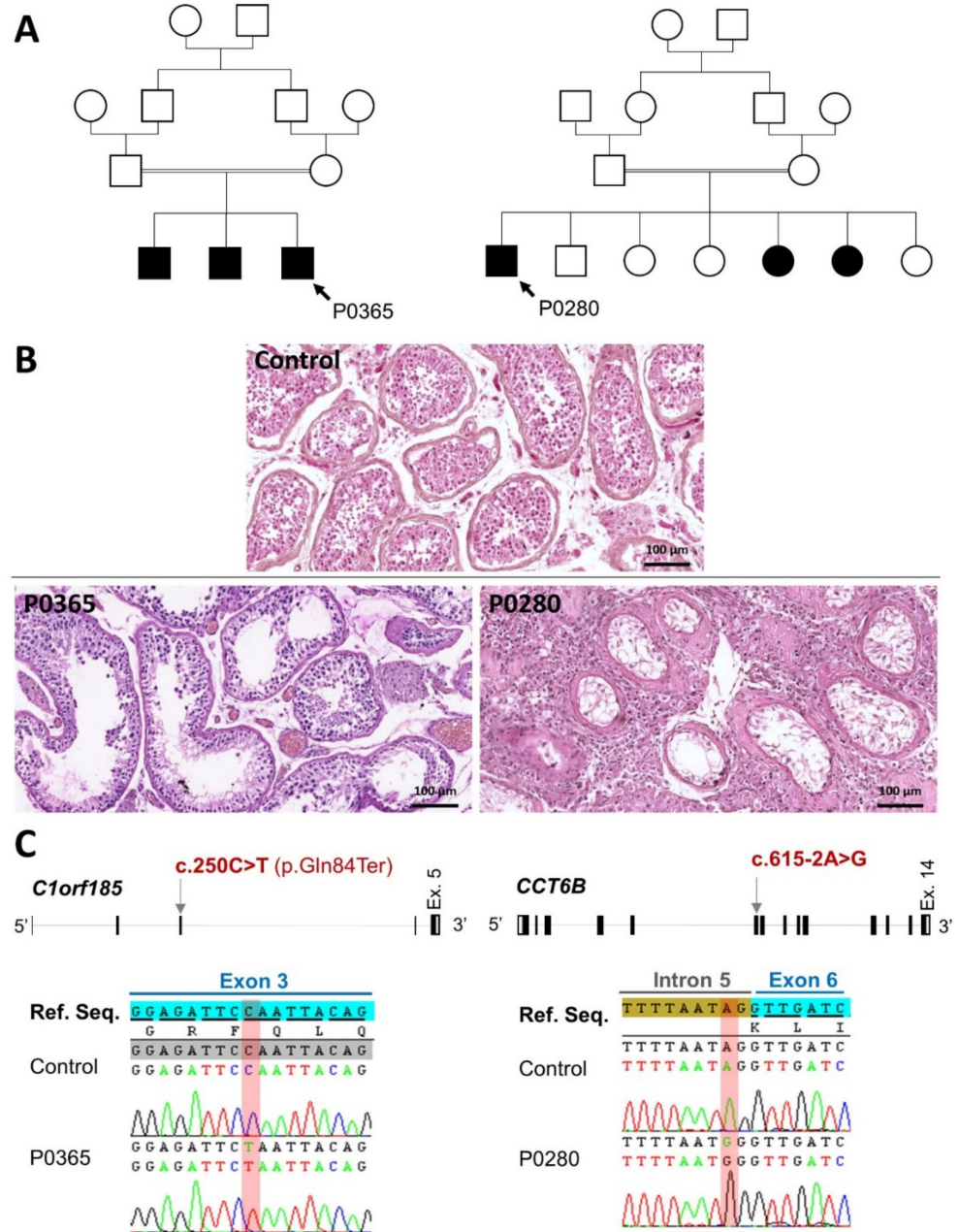


Figure 1. Genetic investigation of two idiopathic cases of non-obstructive azoospermia (NOA) and functional assessment of variant pathogenesis. (A) Pedigrees of the two studied subjects P0365 and P0280. Black color indicates individuals with primary infertility. (B) Histology of testicular seminiferous tubules obtained from the studied subjects after multifocal testicular biopsies showing a severe hypospermatogenesis in subject P0365 and a testicular degeneration in subject P0280 compared to the control (upper panel). Scale bars = 100 μ m. (C) Location of the identified variants in the candidate genes and the corresponding electropherograms obtained by Sanger sequencing. P0365 has a homozygous stop-gained variant in *C1orf185* (c.250C>T; p.Gln84Ter) whereas P0280 carries a homozygous variant affecting a splice acceptor consensus sequence in *CCT6B* (c.615-2A>G).

3.2. WES and Variant Filtering

We used a WES-based strategy to investigate two patients in order to identify the potential genetic origin responsible for their infertility. Given the familial history of consanguinity, we postulated that these genetic factors had a likely autosomal recessive inheritance. Therefore, we focused our analyses on homozygous variants with an allelic frequency (AF) <1%. After variant filtering and prioritizing, we selected and retained for each patient a homozygous truncating variant in *C1orf185* or *CCT6B*. All the identified variants were rare (AF = 5.02×10^{-3} and 3.53×10^{-3} , respectively) according to the gnomAD database and were absent from our local control cohort ($n = 445$). These candidate genes were predicted, according to in silico databases, to be highly and specifically expressed in testes contrasting with an unknown biological function. We also looked for other genes with another tissue expression pattern and did not find any relevant candidate variants. We paid particular attention to genes with high expression in both male and female gonads when analyzing the exome data from P0280. The familial history of this subject showed that he has two infertile sisters. This information could orientate us toward a common genetic cause that explains the infertility of these siblings, particularly if the women display primary ovarian insufficiency, a comparable phenotype with NOA in men. However, these cases have not been documented and in addition, we were unable to obtain their DNA samples to perform genetic segregation analyses.

C1orf185 (chromosome 1 open reading frame 185) is located on chromosome 1 (1p32.3). The canonical transcript (ENST00000371759.7; NM_001136508.2) contains five exons coding for a protein of 199 residues. We identified a nonsense variant (c.250C>T; p.Gln84Ter) located in exon 3 and was suspected to either produce a truncated protein or to induce the degradation of the mRNA by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD). *CCT6B* (chaperonin containing TCP1 subunit 6B) is located on chromosome 17 (17q12). The canonical transcript (ENST00000314144.10; NM_006584.4) contains 14 exons coding for a protein of 530 residues. We identified in this gene a splicing variant (c.615-2A>G) affecting the second nucleotide of the splice acceptor consensus sequence located in intron 5 (Figure 1C). The homozygous state of these variants was confirmed by Sanger sequencing (Figure 1C). In conclusion, we identified two homozygous loss-of-function variants in two testis-specific genes with an unknown function that appear to be good candidates to explain the infertility and the spermatic phenotype observed in our patients.

3.3. Generation of KO Mice by CRISPR/Cas9 System

To study the impact of the identified candidate variants in *C1orf185* and *CCT6B*, we targeted the corresponding mouse orthologs *4930522H14Rik* and *Cct6b*, respectively, using the CRISPR/Cas9 system. Before starting this procedure, we compared and aligned the DNA and protein sequences from each ortholog to confirm their homology (Supplementary Tables S1 and S2). We also performed a phylogenetic analysis on protein sequences to understand the evolution of these genes among species and compared the tissue expression profile between the orthologs in human and mice (Supplementary Figures S2–S5). We showed that mouse genes, similar to their human orthologs, are specifically expressed in the testes (Figures S3 and S5). We did not identify a paralogue for *C1orf185*. However, we found a paralog of *CCT6B* named *CCT6A* that has a distinct ortholog in mice, *Cct6a*.

We then designed for each gene two guide RNAs (gRNAs) targeting two coding sequences located in a single exon to produce a large intra-exonic frameshift deletion. The Cas9 protein and the dual-gRNAs were injected during ICSI procedure in mature oocytes. We then transferred embryos in pseudopregnant females and obtained 21 and 34 pups (F0 generation) after targeting *4930522H14Rik* and *Cct6b*, respectively. The allelic mutational events were counted to estimate the efficiency of our strategy. We obtained a mutational rate of 100% by targeting *4930522H14Rik* and *Cct6b*. We then selected a frameshift large intragenic deletion and backcrossed mutated females (suspected fertile) from F0 generation with WT males to obtain heterozygous mice (F1 generation). F1 heterozygous males were

then mated with heterozygous females carrying the same mutation to obtain homozygous mutated mice (F2 generation).

3.4. Phenotypic Analysis of Adult KO Male Mice

Phenotypic analyses were carried out for the homozygous KO male mice in parallel with the same-aged WT controls from the F2 generation to investigate spermatic and testicular phenotypes. In addition, we tested the fertility of homozygous KO animals. No abnormal somatic development or behavior was observed in any of the KO mouse lines generated in this study.

The *4930522H14Rik* (Ortholog of *C1orf185*) KO line was generated using two gRNAs designed to target two coding sequences located in exon 2 (Figure 2A). Genotyping was performed using PCR followed by gel electrophoresis and Sanger sequencing of the PCR products (Figure 2B). We selected a 77 bp frameshift deletion (c.41-117del) to generate the KO line (Figure 2B). Homozygous KO males sired pups of comparable litter size as WT (p -value = 0.195) (Figure 2C). We performed morphological and histological analysis of the testes and showed no significant differences in appearance and testis to body weight ratio (p -value = 0.221) (Figure 2D). We collected and analyzed the content of the cauda epididymis and showed that homozygous adult KO males displayed a normal sperm count (Figure 2E) (data not shown) without a significant difference compared to the control animals (p -value = 0.615). Histological analysis of testicular section from KO and WT animals showed normal architecture of the testicular parenchyma (Figure 2F). We analyzed numerous sections of seminiferous tubules and observed a functional spermatogenesis in KO compared to WT (Figure 2F).

To obtain the *Cct6b* KO mouse line, we generated two gRNAs targeted two coding sequences within exon 4 (Figure 3A). We performed PCR followed by gel electrophoresis and Sanger sequencing of the PCR products in order to genotype mice (Figure 3B). A 155 bp frameshift deletion (c.354_505del) was chosen to create the KO line (Figure 3B). Litter size from homozygous KO males was comparable to the control (Figure 3C). Statistical analyses could not be performed for this test because we obtained a single litter from KO males before euthanizing the mouse line due to the restrictions on the use of animal facilities during the first wave of the COVID pandemic. Otherwise, we can conclude that *Cct6b* KO males were not sterile. Then, morphological and histological analysis of testes showed no significant differences in appearance and testis to body weight ratio (p -value = 0.457) (Figure 3D). After extraction and analysis of sperm from the cauda epididymis, we showed that homozygous adult KO males had a normal sperm count (Figure 3E) and (data not shown) without significant difference from WT males (p -value = 0.862). Histological analysis of testicular sections from KO and WT animals showed that they presented similar parameters with normal parenchyma architecture and functional spermatogenesis (Figure 3F).

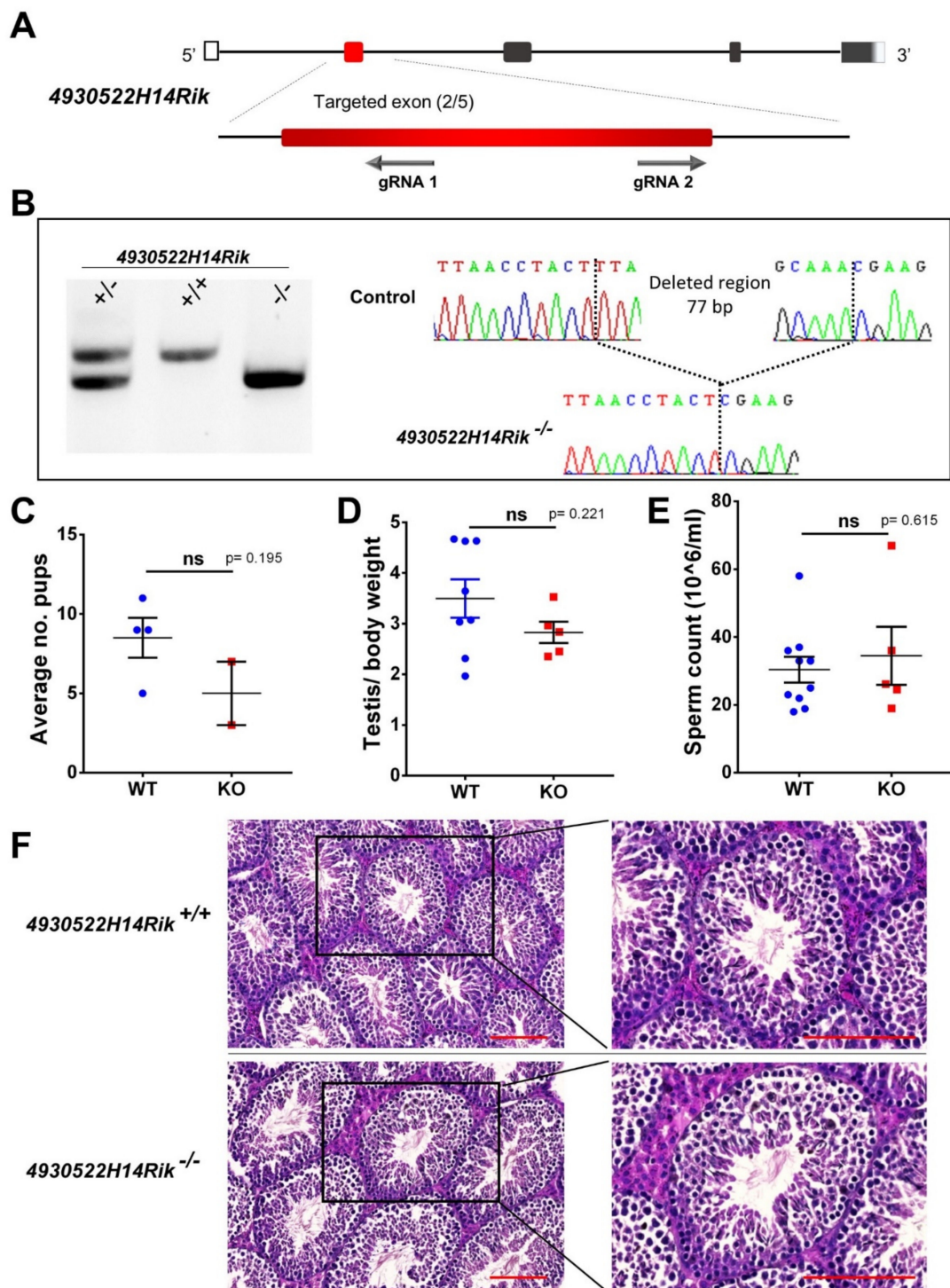


Figure 2. 4930522H14Rik editing, genotyping strategy, and phenotypic analyses of mutated animals. (A) Schematic presentation of 4930522H14Rik highlighting the targeted exon in red (exon 2/5) and showing the approximate location of the sequences targeted by the dual gRNAs. (B) Gel electrophoresis of the PCR products using a primer set that amplifies the region containing the intra-exonic deletion. DNA fragments migrate according to their molecular size (WT allele: 457 bp and KO allele: 380 bp). Genotyping strategy was completed by Sanger sequencing of PCR products for F0–F1 generations. (C) Average litter size of WT and KO male mice. (D) Comparison of testis to body weight ratios between WT ($n = 8$) and KO ($n = 5$) animals. (E) Comparison of sperm count between WT ($n = 10$) and KO ($n = 5$) animals. (F) Histological analyses of WT and KO testicular sections after hematoxylin and eosin staining. Scale bar = 100 μm .

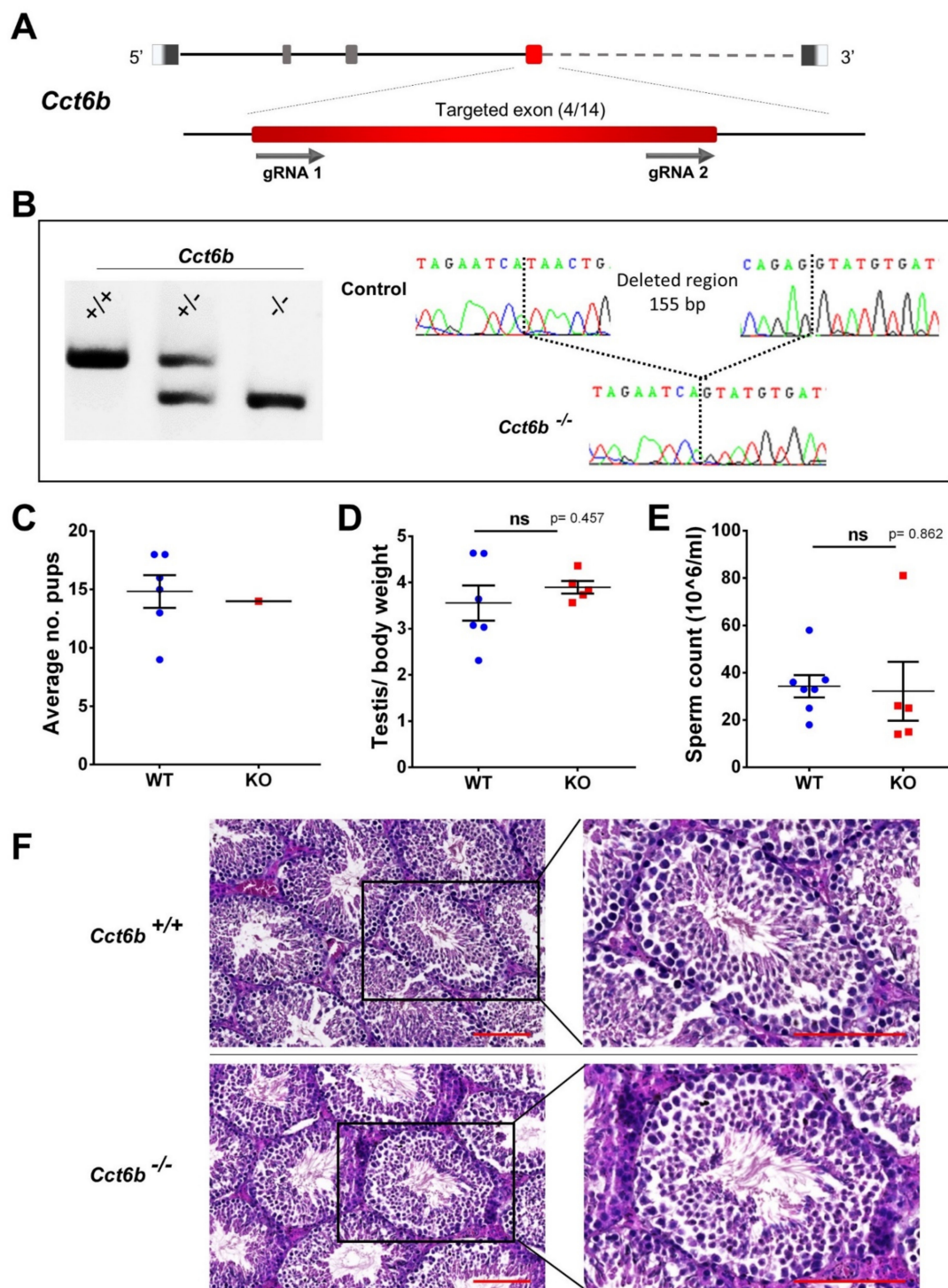


Figure 3. *Cct6b* editing, genotyping strategy, and phenotypic analyses of mutated animals. (A) Schematic presentation of *Cct6b* highlighting the targeted exon in red (exon 4/14) and showing the approximate location of the sequences targeted by the dual gRNAs. (B) Gel electrophoreses of the PCR products using a primer set that amplifies the region containing the intra-exonic deletion. DNA fragments migrate according to their molecular size (WT allele: 535 bp and KO allele: 380 bp). Genotyping strategy was completed by Sanger sequencing of PCR products for F0–F1 generations. (C) Litter size of WT and KO males (a single litter was recorded due to a short mating period). (D) Comparison of testis to body weight ratios between WT ($n = 6$) and KO ($n = 5$) animals. (E) Comparison of sperm count between WT ($n = 7$) and KO ($n = 5$) animals. (F) Histological analyses of WT and KO testicular sections after hematoxylin and eosin staining. Scale bars = 100 μm .

4. Discussion

Currently, the discovery of new candidate genes and causal variants in idiopathic male infertility is a major challenge in the fields of andrology and reproductive medicine. The recent development of high throughput sequencing (HTS) techniques and the availability of WES for research and clinical practice allowed for the discovery of several novel candidate genes responsible for spermatogenic defects and male infertility [18–20]. Non-obstructive azoospermia (NOA) is a frequent and very severe cause of male infertility characterized by a strong genetic basis. Taking into account the high number of genes predominantly or specifically expressed during spermatogenesis and involved in biological processes such as mitosis, meiosis, cell differentiation, genome stability, and retro-element neutralization, NOA is expected to be highly heterogeneous and could be mainly caused by monogenic mutations [21]. In 2018, Fakhro et al. investigated by WES a cohort of 75 unrelated subjects displaying idiopathic NOA and identified monogenic causes in 10 cases (13%) [22]. In 2020, Chen et al. investigated by WES a large cohort of 314 infertile subjects presenting NOA or severe oligospermia and identified 20 novel candidate genes affecting 25 patients [23]. During the same year, Krausz et al. published a paper reporting the identification of five novel NOA candidate genes by testing 147 selected patients displaying a spermatogenic arrest [24].

Despite the robustness of WES to study the genetic component of idiopathic NOA, many deleterious variants in genes with uncharacterized biological function are classified as variants of unknown clinical significance (VUS) [25]. Although gene-expression analysis reveals the presence of thousands of testis-enriched genes, the biological function of most of these genes remain unknown [26,27]. In this study, we reported the identification of homozygous LoF variants in two testis-enriched and specific genes of unknown function *C1orf185* (c.250C>T; p.Gln84Ter) and *CCT6B* (c.615-2A>G). To assess the implication of these candidate genes in NOA and male fertility, we invalidated their mouse orthologs using the CRSIPR/Cas9 system and generated two KO lines. The same strategy has previously allowed us to gain a better understanding of the genetic etiology of several spermatogenic defects such as NOA and monomorphic teratozoospermia [28–30].

Using CRSIPR/Cas9 technology, gene edition in mice is now relatively easy and fast, allowing for the generation of several knockout and/or knockin lines in only a few months [31]. The method used in this study consisted of using two gRNAs with a distance of approximately 100 bp from each other and targeting a single exon in the gene of interest. The dual-gRNAs and the Cas9 protein were injected into mature oocytes during the ICSI procedure. Experimenting with this new strategy, we significantly increased the efficiency of this system and generated sufficiently large frameshift deletions in pups of generation F0, allowing us to establish KO lines by performing a single cycle of oocyte injection. In addition, the introduction of large intra-exonic deletions of approximately 100 bp allows for fast genotyping. Indeed, the use of a single set of primers in PCR allows for the amplification in the same reaction of the mutated and the WT alleles, which can be easily differentiated after a simple gel electrophoresis. Using this strategy, we performed PCR and Sanger sequencing to genotype pups from F0 and F1 generations and only PCR for further genotyping, thus facilitating the management of mouse colonies.

In this study, we focused our phenotypic analyses to study the reproductive system and demonstrate whether adult male mice exhibited an altered spermatogenesis. We performed a fertility test by mating homozygous KO males with WT females and observing the litter size following at least two months. We observed that *4930522H14Rik*^{-/-} and *Cct6b*^{-/-} males displayed normal fertility compared to WT males born from the same parents. We also showed that KO males from both lines presented normal sperm parameters and spermatogenesis compared to control littermates.

In June 2021 and during the preparation of our manuscript, Yang et al. published an interesting paper reporting the reproductive phenotype of *Cct6b*^{-/-} mice generated by the CRISPR/Cas9 system by targeting the same exon (4/14). Concordant with what we describe here, they found that males exhibited no differences in development, fertility, testis

weight, sperm counts, total motility, and spermatogenesis relative to control littermates, thus confirming our results [32].

During the past five years, many teams searching for target proteins for non-hormonal male contraceptive drugs published their studies reporting the dispensable role of numerous testis-enriched genes in spermatogenesis and male fertility through a massive production of KO mice using the CRISPR/Cas9 system [26,33–36]. Reporting genetic variants and genes non-associated with male infertility individually is important and necessary to avoid the further creation of these KO mouse lines and the duplication of efforts and to avoid loss of time and significant expenses.

5. Conclusions

Whole exome sequencing (WES) is a robust and one of the most comprehensive genetic tests to identify rare disease causing variants and new candidate genes in a wide variety of spermatogenic defects associated with male infertility. Functional interpretation performed in candidate genes is now a critical step to validate their involvement in the studied phenotype. Among the available approaches nowadays, generation of transgenic animal models presents a powerful tool to study the function of candidate genes and their physiopathological implication. The recent development of the CRISPR/Cas9 system has made this process easier and faster, thus combining the use of WES to identify candidate genes and CRISPR/Cas9 to generate knockout mice is a very promising strategy to improve the genetic diagnosis yield and refine the interpretation of variants found in new candidate genes in male infertility.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11010118/s1>. Table S1: Comparison between orthologous genes in human and mouse (gene structure, Transcript and protein products; Table S2: Alignment of orthologs DNA and protein sequences; Table S3: Set of primers used for Sanger verification of the variant identified by WES in NOA subjects; Table S4: Characteristics of gRNAs used for CRISPR/Cas9 mouse gene edition; Table S5: Set of primers used for mouse line genotyping; Figure S1: Gene editing using CRISPR/Cas9 system to generate knockout (KO) mouse lines; Figure S2: Tissue expression pattern of C1orf185 and its mouse ortholog 493022H14Rik; Figure S3: phylogenetic tree of C1orf185 showing their orthologs and paralogs (if present); Figure S4: Tissue expression pattern of CCT6B and its mouse ortholog Cct6b; Figure S5: phylogenetic tree of CCT6b showing their orthologs and paralogs (if present).

Author Contributions: Z.-E.K., P.F.R., C.A. and S.N. designed the study and supervised all laboratory work. They have full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and its accuracy. All authors read, corrected, and made a significant contribution to the manuscript. R.Z. and S.F.B.M. recruited patients. A.B. performed micro-TESE procedure. C.C., N.T.-M., I.L., P.F.R. and Z.-E.K. produced and analyzed the genetic data. Y.N., L.W., F.K. and S.N. generated knockout mice. Z.-E.K., C.C. and C.L. performed genotyping and phenotypic analysis of mouse lines. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Inserm–Bettencourt Foundation (R20007CS U1209-2018-2021) and the FLAGEL-OME project (ANR-19-CE17-0014).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by local ethics committees. Samples were then stored in the Centre de Ressources Biologiques Germethèque (certification under ISO-9001 and NF-S 96–900) according to a standardized procedure, or were part of the Fertithèque collection declared to the French Ministry of Health (DC-2015–2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016–392).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank all the individuals for their cooperation as well as all the referring physicians. We very much appreciate the collaboration with the PIC-GIN platform and we particularly thank Yasmina Saoudi for her kind help.

Conflicts of Interest: The authors have declare no conflicts of interest.

References

- Inhorn, M.C.; Patrizio, P. Infertility around the Globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st Century. *Hum. Reprod. Update* **2015**, *21*, 411–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boivin, J.; Bunting, L.; Collins, J.A.; Nygren, K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2007**, *22*, 1506–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pathak, U.I.; Gabrielsen, J.S.; Lipshultz, L.I. Cutting-edge evaluation of male infertility. *Urol. Clin. North Am.* **2020**, *47*, 129–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fainberg, J.; Kashanian, J.A. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research* **2019**, *8*, F1000 Faculty Rev-670. [[CrossRef](#)]
- Jan, S.Z.; Vormer, T.L.; Jongejan, A.; Röling, M.; Silber, S.J.; de Rooij, D.G.; Hamer, G.; Repping, S.; van Pelt, A.M.M. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **2017**, *144*, 3659–3673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krausz, C.; Riera-Escamilla, A. Genetics of male infertility. *Nat. Rev. Urol.* **2018**, *15*, 369–384. [[CrossRef](#)]
- Cioppi, F.; Rosta, V.; Krausz, C. Genetics of azoospermia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3264. [[CrossRef](#)]
- Boeri, L.; Ventimiglia, E.; Cazzaniga, W.; Pederzoli, F.; Fallara, G.; Pozzi, E.; Belladelli, F.; Baudo, A.; Frego, N.; Capogrosso, P.; et al. Risk of health status worsening in primary infertile men: A prospective 10-year follow-up study. *Andrology* **2021**. [[CrossRef](#)]
- Petersen, B.-S.; Fredrich, B.; Hoepfner, M.P.; Ellinghaus, D.; Franke, A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. [[CrossRef](#)]
- Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv* **2013**, arXiv:1303.3997.
- Faust, G.G.; Hall, I.M. SAMBLASTER: Fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2503–2505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, S.; Scheffler, K.; Halpern, A.L.; Bekritsky, M.A.; Noh, E.; Källberg, M.; Chen, X.; Kim, Y.; Beyter, D.; Krusche, P.; et al. Strelka2: Fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 591–594. [[CrossRef](#)]
- McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The Ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bouker, A.; Halouani, L.; Kharouf, M.; Latrous, H.; Makni, M.; Marrakchi, O.; Zouari, R.; Fourati, S. Step-by-step loupes-MTESE in non-obstructive azoospermic men, a retrospective study. *Basic Clin. Androl.* **2019**, *29*, 11. [[CrossRef](#)]
- Beurois, J.; Cazin, C.; Kherraf, Z.-E.; Martinez, G.; Celse, T.; Touré, A.; Arnoult, C.; Ray, P.F.; Coutton, C. Genetics of teratozoospermia: Back to the head. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *34*, 101473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mitchell, M.J.; Metzler-Guillemain, C.; Toure, A.; Coutton, C.; Arnoult, C.; Ray, P.F. Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin. Genet.* **2017**, *91*, 208–216. [[CrossRef](#)]
- Touré, A.; Martinez, G.; Kherraf, Z.-E.; Cazin, C.; Beurois, J.; Arnoult, C.; Ray, P.F.; Coutton, C. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum. Genet.* **2021**, *140*, 21–42. [[CrossRef](#)]
- Cerván-Martín, M.; Castilla, J.A.; Palomino-Morales, R.J.; Carmona, F.D. Genetic landscape of nonobstructive azoospermia and new perspectives for the clinic. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 300. [[CrossRef](#)]
- Fakhro, K.A.; Elbardisi, H.; Arafa, M.; Robay, A.; Rodriguez-Flores, J.L.; Al-Shakaki, A.; Syed, N.; Mezey, J.G.; Abi Khalil, C.; Malek, J.A.; et al. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2018**, *20*, 1365–1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, S.; Wang, G.; Zheng, X.; Ge, S.; Dai, Y.; Ping, P.; Chen, X.; Liu, G.; Zhang, J.; Yang, Y.; et al. Whole-exome sequencing of a large chinese azoospermia and severe oligospermia cohort identifies novel infertility causative variants and genes. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 2451–2459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krausz, C.; Riera-Escamilla, A.; Moreno-Mendoza, D.; Holleman, K.; Cioppi, F.; Algaba, F.; Pybus, M.; Friedrich, C.; Wyrwoll, M.J.; Casamonti, E.; et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: Clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2020**, *22*, 1956–1966. [[CrossRef](#)]
- Oud, M.S.; Volozonoka, L.; Smits, R.M.; Vissers, L.E.L.M.; Ramos, L.; Veltman, J.A. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2019**, *34*, 932–941. [[CrossRef](#)]
- Lu, Y.; Oura, S.; Matsumura, T.; Oji, A.; Sakurai, N.; Fujihara, Y.; Shimada, K.; Miyata, H.; Tobita, T.; Noda, T.; et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice. *Biol. Reprod.* **2019**, *101*, 501–511. [[CrossRef](#)]
- Schultz, N.; Hamra, F.K.; Garbers, D.L. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12201–12206. [[CrossRef](#)]
- Coutton, C.; Vargas, A.S.; Amir-Yekta, A.; Kherraf, Z.-E.; Mustapha, S.F.; Tanno, P.; Wambergue-Legrand, C.; Karaouzène, T.; Martinez, G.; Crouzy, S.; et al. Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in trypanosoma and human. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 686. [[CrossRef](#)]

29. Kherraf, Z.-E.; Christou-Kent, M.; Karaouzene, T.; Amiri-Yekta, A.; Martinez, G.; Vargas, A.S.; Lambert, E.; Borel, C.; Dorphin, B.; Akin-Seifer, I.; et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1132–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Pierre, V.; Martinez, G.; Coutton, C.; Delaroche, J.; Yassine, S.; Novella, C.; Pernet-Gallay, K.; Hennebicq, S.; Ray, P.F.; Arnoult, C. Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Dev. Camb. Engl.* **2012**, *139*, 2955–2965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kherraf, Z.-E.; Conne, B.; Amiri-Yekta, A.; Kent, M.C.; Coutton, C.; Escoffier, J.; Nef, S.; Arnoult, C.; Ray, P.F. Creation of knock out and knock in mice by CRISPR/Cas9 to validate candidate genes for human male infertility, interest, difficulties and feasibility. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *468*, 70–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yang, P.; Tang, W.; Li, H.; Hua, R.; Yuan, Y.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Cui, Y.; Sha, J. T-Complex protein 1 subunit zeta-2 (CCT6B) deficiency induces murine teratospermia. *PeerJ* **2021**, *9*, e11545. [[CrossRef](#)]
33. Miyata, H.; Castaneda, J.M.; Fujihara, Y.; Yu, Z.; Archambeault, D.R.; Isotani, A.; Kiyozumi, D.; Kriseman, M.L.; Mashiko, D.; Matsumura, T.; et al. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 7704–7710. [[CrossRef](#)]
34. Oyama, Y.; Miyata, H.; Shimada, K.; Fujihara, Y.; Tokuhiro, K.; Garcia, T.X.; Matzuk, M.M.; Ikawa, M. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice. *Asian J. Androl.* **2021**. [[CrossRef](#)]
35. Park, S.; Shimada, K.; Fujihara, Y.; Xu, Z.; Shimada, K.; Larasati, T.; Pratiwi, P.; Matzuk, R.M.; Devlin, D.J.; Yu, Z.; et al. CRISPR/Cas9-mediated genome-edited mice reveal 10 testis-enriched genes are dispensable for male fecundity. *Biol. Reprod.* **2020**, *103*, 195–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sun, J.; Lu, Y.; Nozawa, K.; Xu, Z.; Morohoshi, A.; Castaneda, J.M.; Noda, T.; Miyata, H.; Abbasi, F.; Shawki, H.H.; et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice uncovers 13 testis- or epididymis-enriched genes individually dispensable for male reproduction. *Biol. Reprod.* **2020**, *103*, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

SUPPLEMENTARY MATERIALS

SUPPLEMENTARY Tables

Supplementary Table S1. Comparison between orthologous genes in human and mouse (gene structure, Transcript and protein products).

Gene	Exons	Coding exons	Transcript length (bp)	Translation length (a. a.)
<i>C1orf185</i>	5	5	921	199
<i>4930522H14Rik</i>	5	5	854	230
CCT6B	14	14	1847	530
<i>Cct6b</i>	14	14	1787	531

Supplementary Table S2. Alignment of orthologs DNA and protein sequences.

Human/mouse genes	Coding sequence alignment		Protein sequence alignment	
	Query cover	Percent identity	Query cover	Percent identity
<i>C1orf185/ 4930522H14Rik</i>	82 %	73,44	86 %	55,94
<i>CCT6B/Cct6b</i>	98 %	84,79	98 %	84,12

Supplementary Table S3. Set of primers used for Sanger verification of the variant identified by WES in NOA subjects.

Primer name	Primer sequence	Primer Tm (°C)	Product size (bp)
<i>C1orf185_F</i>	AAAGCAATTGATGAGAGATGCAGG	59.90	350
<i>C1orf185_R</i>	CAATCCCAATATGTGGAATGCAGG	60.26	
<i>CCT6B_F</i>	ACAATGTGTGTCCTGGAAGTATTG	59.24	356
<i>CCT6B_R</i>	AAACCAGCTAGTAAAGGCAGGAG	60.31	

Supplementary Table S4. Characteristics of gRNAs used for CRISPR/Cas9 mouse gene edition.

Target gene	Target DNA strand	Target sequence	PAM sequence	On-target score	Off-target score
<i>4930522H14Rik</i>	-	AGCTCCAGCAGCCATAAAGT	AGG	57,5	40,8
	+	GGTTCCTGATTTGCAAACGA	AGG	66,0	43,6
<i>Cct6b</i>	+	CACCCTAGAATCATAACTGA	AGG	61,4	40,3
	+	ACTGGCCGACATACTAACAG	AGG	77,6	44,1

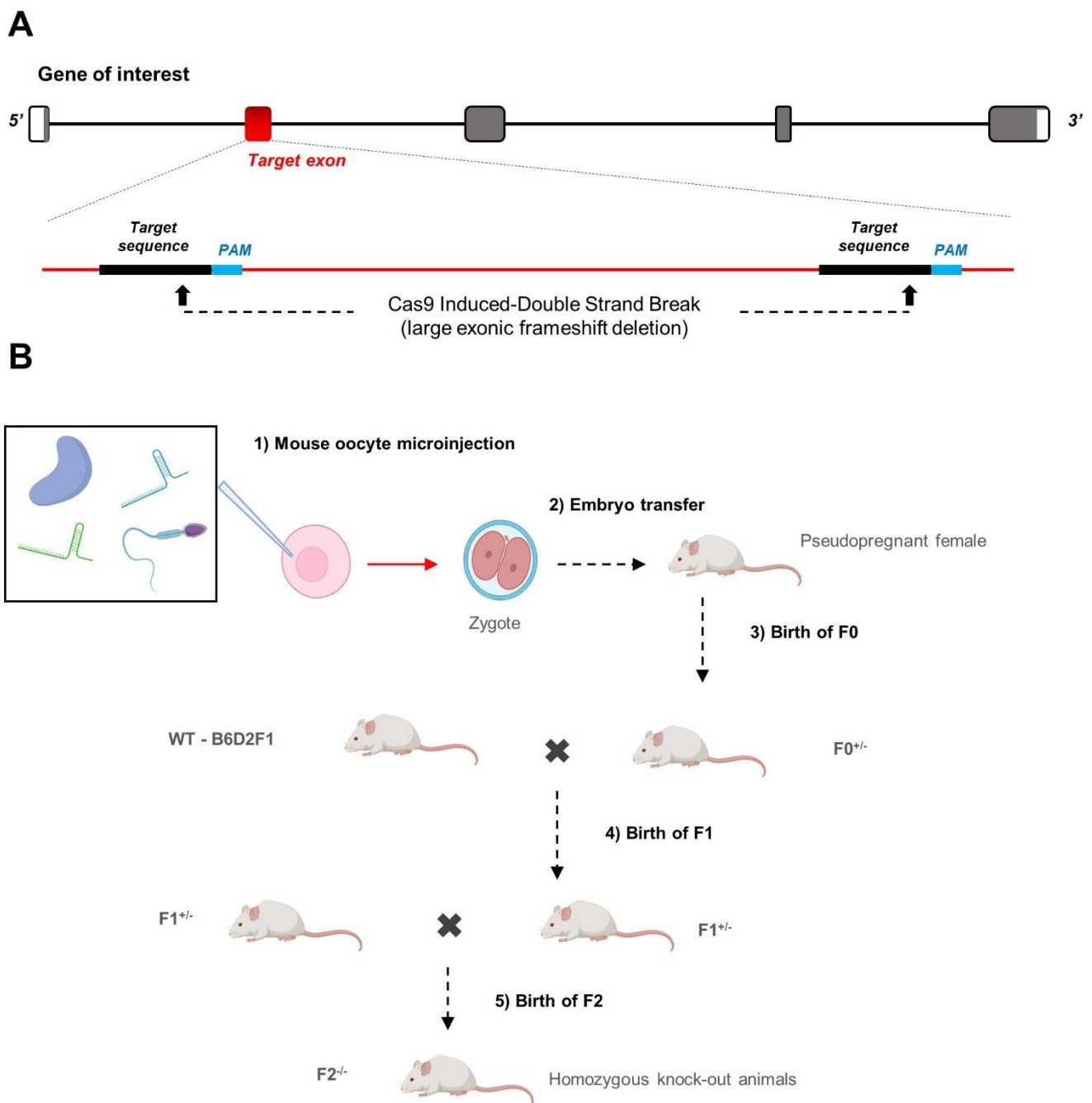
SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Table S5. Set of primers used for mouse line genotyping.

Primer name	Primer sequence	Primer Tm (°C)	Product size (bp)
4930522H14Rik-F	TGTGTCCTGTGTTGCTCTC C	59.89	457
4930522H14Rik-R	GTGGATTGCTTCCTCTCCC C	60.11	
Cct6b-F	ATGTTAGTGCCGTTGCTGT G	59.13	535
Cct6b-R	AGGTGGCATTGGATCCCT TG	60.03	

SUPPLEMENTARY MATERIALS

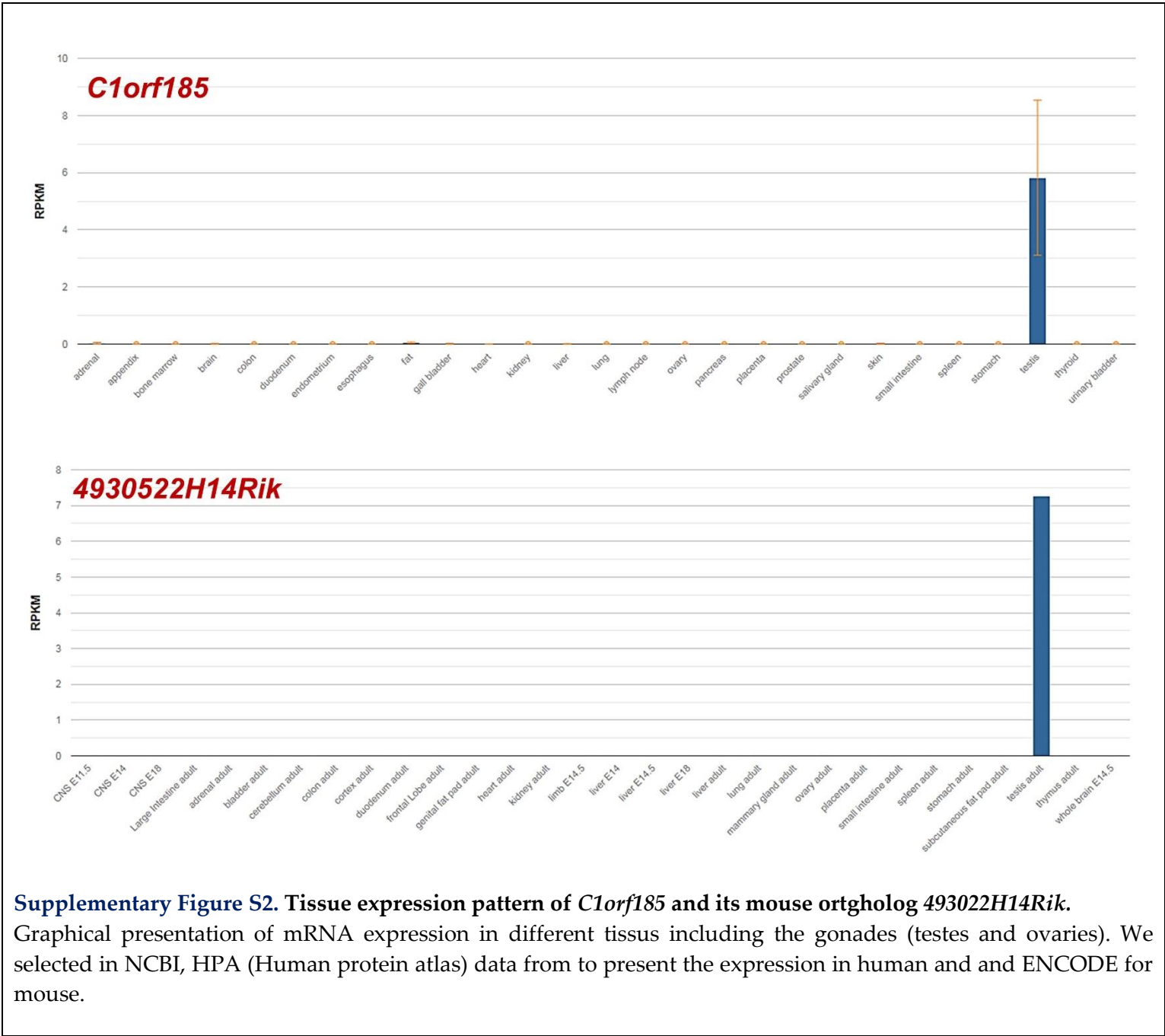
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure S1. Gene editing using CRISPR/Cas9 system to generate knockout (KO) mouse lines.

A) Schematic presentation of a candidate gene for CRISPR/Cas9 editing. The exon in red was targeted with two gRNAs located in each exonic extremity. The Cas9 induces a double strand break (DSB) in each targeted region resulting in a large intra-exonic deletion. PAM: protospacer adjacent motif. **B)** To knock-out a candidate gene, the Cas9 and dual gRNAs were injected with a spermatozoa into the cytoplasm of a mature oocyte (ICSI). The obtained embryos were then transferred into a pseudopregnant female. The obtained pups (F0 generation) were genotyped and mated at adult age with B6D2F1 wild-type mice to produce F1 generation of pups. Heterozygous males and females carrying the same frameshift mutation were selected and mated to produce homozygous KO animals.

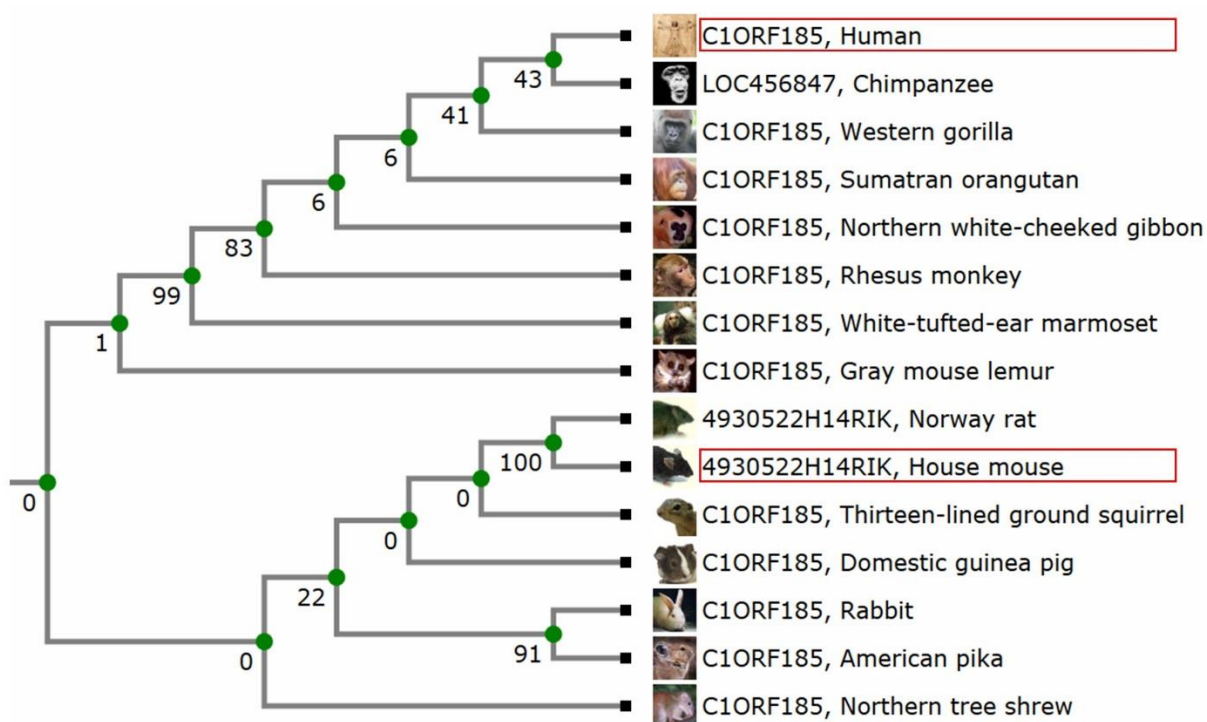
SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure S2. Tissue expression pattern of *C1orf185* and its mouse ortholog *493022H14Rik*.

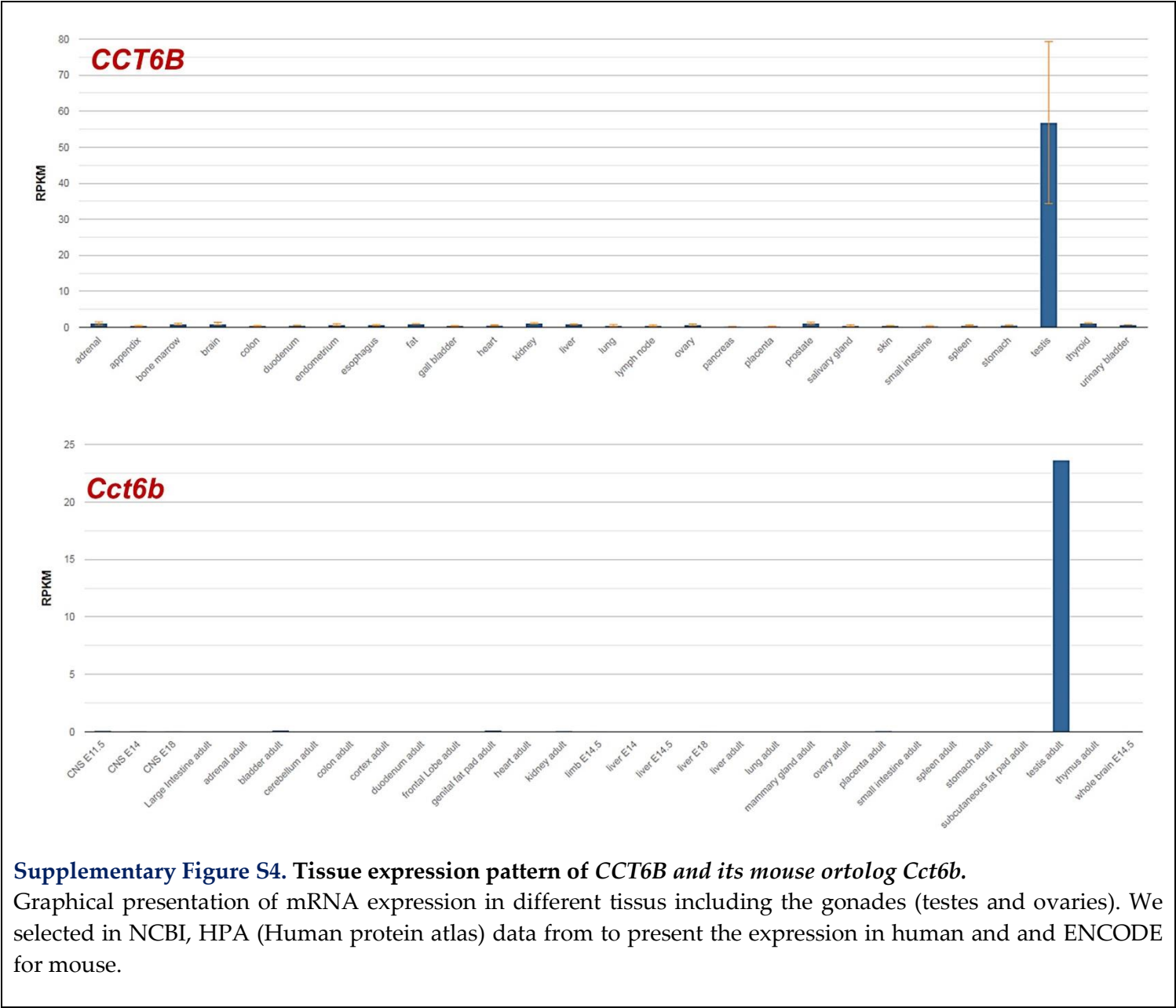
Graphical presentation of mRNA expression in different tissue including the gonades (testes and ovaries). We selected in NCBI, HPA (Human protein atlas) data from to present the expression in human and and ENCODE for mouse.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

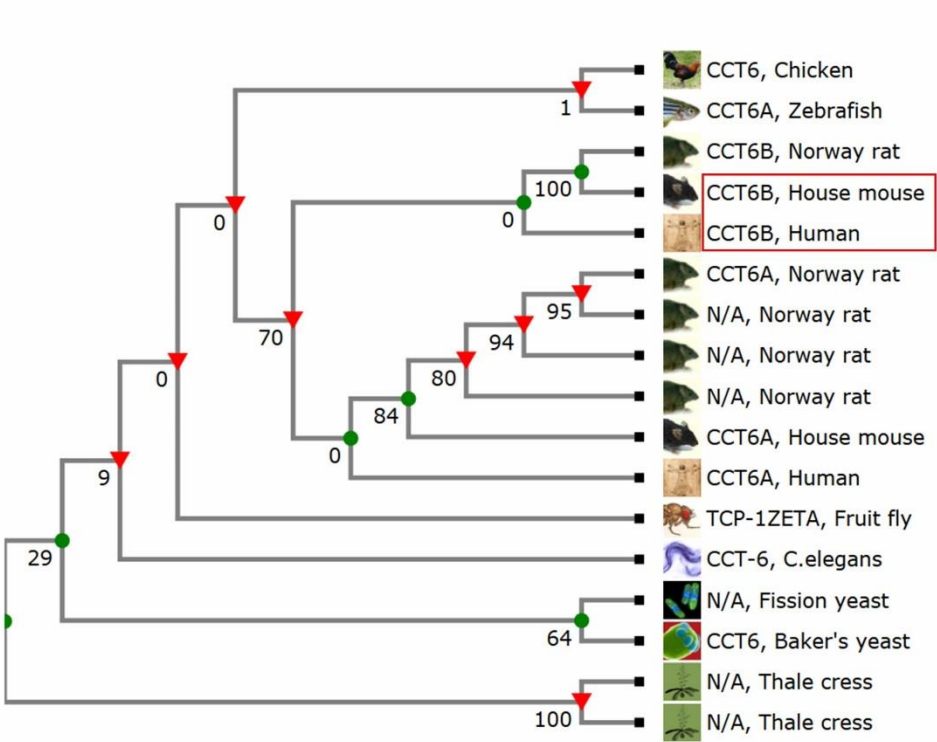


Supplementary Figure S3. phylogenetic tree of *C1orf185* showing their orthologs and paralogs (if present). Graphical presentation generated from: <http://www.treefam.org>

SUPPLEMENTARY MATERIALS



SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure S5. phylogenetic tree of CCT6b showing their orthologs and paralogs (if present). Graphical presentation generated from: <http://www.treefam.org>

Chapitre III. Les tératozoospermies monomorphes

I. Article 3

« Identification and Characterization of the Most Common Genetic Variant Responsible for Acephalic Spermatozoa Syndrome in Men Originating from North Africa. »

Caroline Cazin, Yasmine Boumerdassi, Guillaume Martinez, Selima Fourati Ben Mustapha, Marjorie Whitfield, Charles Coutton, Nicolas Thierry-Mieg, Pierre Di Pizio, Nathalie Rives, Christophe Arnoult, Aminata Touré, Pierre F Ray, Raoudha Zouari, Christophe Sifer, Zine-Eddine Kherraf.

International Journal of Molecular Sciences. 2021 Feb 22;22(4):2187. doi: 10.3390/ijms22042187. PMID: 33671757; PMCID: PMC7927044.

Contexte

Dans cette étude, nous avons étudié neuf sujets infertiles non apparentés présentant un syndrome typique de spermatozoïdes acéphales. Des études précédentes ont identifié *SUN5* comme le principal gène causal de ce phénotype chez l'homme et ont permis d'identifier des mutations de *SUN5* chez la moitié des sujets affectés. La protéine *SUN5* est connue pour être spécifiquement exprimée dans le testicule et pour se localiser à la base de la tête du sperme. Elle a été décrite comme étant nécessaire pour ancrer la tête du spermatozoïde à la pièce médiane, expliquant ainsi le phénotype observé chez les sujets mutés. Des mutations rares dans les gènes *PMFBP1*, *TSGA10*, *SPATC1L*, *ACTRT1*, *HOOK1* et *SPATA20* (détaillés en introduction) ont également été décrites comme provoquant la production de spermatozoïdes acéphales chez l'homme et la souris et un phénotype similaire a été décrit chez des animaux KO uniquement, pour *Oaz3*, *Hook1*, *Cntrob*, *Odf1* et *Spata6*.

Le séquençage de l'exome entier a été effectué sur neuf patients. J'ai ainsi pu identifier un même variant d'épissage homozygote de *SUN5* (c.211+1_211+2dupGT) chez sept individus (77,8%). Le fait que ces 7 individus, originaires de Tunisie, partagent le même haplotype montrant un effet fondateur. J'ai confirmé la présence de ce variant par séquençage Sanger chez les sept patients. J'ai également montré la pathogénicité du variant en réalisant une analyse par immunofluorescence des spermatozoïdes des patients et en montrant l'absence de la protéine chez les patients mutés. L'analyse FISH réalisée sur les spermatozoïdes d'un individu muté n'a pas mis en évidence un taux significatif d'aneuploïdie par rapport au contrôle, confirmant que la FIV-ICSI pouvait être proposée pour ces patients. Aucun variant délétère n'a été identifié chez les deux patients non mutés de *SUN5*. Ces résultats confirment

que *SUN5* est le principal gène responsable du syndrome des spermatozoïdes acéphales et que le séquençage de l'exome est efficace pour identifier les anomalies génétiques uniques dans un contexte d'infertilité masculine sévère.



Article

Identification and Characterization of the Most Common Genetic Variant Responsible for Acephalic Spermatozoa Syndrome in Men Originating from North Africa

Caroline Cazin ^{1,2,†}, Yasmine Boumerdassi ^{3,†} , Guillaume Martinez ^{1,4}, Selima Fourati Ben Mustapha ⁵, Marjorie Whitfield ¹, Charles Coutton ^{1,3}, Nicolas Thierry-Mieg ⁶, Pierre Di Pizio ^{7,8}, Nathalie Rives ^{7,8}, Christophe Arnoult ¹, Aminata Touré ¹ , Pierre F. Ray ^{1,2} , Raoudha Zouari ⁵, Christophe Sifer ³ and Zine-Eddine Kherraf ^{1,2,*}



Citation: Cazin, C.; Boumerdassi, Y.; Martinez, G.; Fourati Ben Mustapha, S.; Whitfield, M.; Coutton, C.; Thierry-Mieg, N.; Di Pizio, P.; Rives, N.; Arnoult, C.; et al. Identification and Characterization of the Most Common Genetic Variant Responsible for Acephalic Spermatozoa Syndrome in Men Originating from North Africa. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2187. <https://doi.org/10.3390/ijms22042187>

Academic Editor: Youngsok Choi

Received: 29 January 2021

Accepted: 18 February 2021

Published: 22 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Institute for Advanced Biosciences, INSERM, CNRS, Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France; EXT-CCazin@chu-grenoble.fr (C.C.); gmartinez@chu-grenoble.fr (G.M.); marjorie.whitfield@inserm.fr (M.W.); CCoutton@chu-grenoble.fr (C.C.); christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr (C.A.); aminata.toure@inserm.fr (A.T.); PRay@chu-grenoble.fr (P.F.R.)
 - ² UM GI-DPI, CHU Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France
 - ³ Department of Reproductive Biology, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, F-75004 Paris, France; yasmine.boumerdassi@hotmail.fr (Y.B.); christophe.sifer@jvr.aphp.fr (C.S.)
 - ⁴ UM de Génétique Chromosomique, CHU Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France
 - ⁵ Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Polyclinique les Jasmin, Centre Urbain Nord, Tunis 1003, Tunisia; fourati_selima@yahoo.fr (S.F.B.M.); raouzou@gmail.com (R.Z.)
 - ⁶ TIMC-IMAG, CNRS, Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France; Nicolas.Thierry-Mieg@imag.fr
 - ⁷ EA 4308 'Gametogenesis and Gamete Quality, Normandie University, UNIROUEN, F-76000 Rouen, France; pierre.di-pizio@chu-rouen.fr (P.D.P.); nathalie.rives@chu-rouen.fr (N.R.)
 - ⁸ Reproductive Biology Laboratory-CECOS, Assisted Reproductive Center, Rouen Normandy University Hospital, F-76000 Rouen, France
- * Correspondence: zekherraf@chu-grenoble.fr
† Equally contributed.

Abstract: Acephalic spermatozoa syndrome (ASS) is a rare but extremely severe type of teratozoospermia, defined by the presence of a majority of headless flagella and a minority of tail-less sperm heads in the ejaculate. Like the other severe monomorphic teratozoospermias, ASS has a strong genetic basis and is most often caused by bi-allelic variants in *SUN5* (Sad1 and UNC84 domain-containing 5). Using whole exome sequencing (WES), we investigated a cohort of nine infertile subjects displaying ASS. These subjects were recruited in three centers located in France and Tunisia, but all originated from North Africa. Sperm from subjects carrying candidate genetic variants were subjected to immunofluorescence analysis and transmission electron microscopy. Moreover, fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed on sperm nuclei to assess their chromosomal content. Variant filtering permitted us to identify the same *SUN5* homozygous frameshift variant (c.211+1_211+2dup) in 7/9 individuals (78%). *SUN5* encodes a protein localized on the posterior part of the nuclear envelope that is necessary for the attachment of the tail to the sperm head. Immunofluorescence assays performed on sperm cells from three mutated subjects revealed a total absence of *SUN5*, thus demonstrating the deleterious impact of the identified variant on protein expression. Transmission electron microscopy showed a conserved flagellar structure and a slightly decondensed chromatin. FISH did not highlight a higher rate of chromosome aneuploidy in spermatozoa from *SUN5* patients compared to controls, indicating that intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) can be proposed for patients carrying the c.211+1_211+2dup variant. These results suggest that the identified *SUN5* variant is the main cause of ASS in the North African population. Consequently, a simple and inexpensive genotyping of the 211+1_211+2dup variant could be beneficial for affected men of North African origin before resorting to more exhaustive genetic analyses.

Keywords: acephalic spermatozoa syndrome; genetics of male infertility; teratozoospermia; *SUN5*; whole exome sequencing

1. Introduction

Infertility is a major public health concern affecting approximately 15% of couples worldwide [1](Mascarenhas et al., 2012). A male factor is implicated in nearly half of all cases and we estimate that over 20 million men in the world are affected by reproductive disorders [2]. Spermatogenic defects resulting in the insufficient production of functional spermatozoa represent a major cause of male infertility. Among these defects, monomorphic or homogeneous teratozoospermia are most likely to be caused by monogenic disorders [3,4].

Acephalic spermatozoa syndrome (ASS; OMIM—Online Mendelian Inheritance in Man: 617187) is a rare but extremely severe type of monomorphic teratozoospermia characterized by the presence of a majority of headless flagella and a minority of tail-less sperm heads in the ejaculate [5]. In addition to familial cases, many knock-out mouse models recapitulate the human phenotype of ASS, demonstrating a monogenic inheritance [6]. In the last few years, the development and availability of high throughput sequencing (HTS) techniques such as whole exome sequencing (WES) has allowed the identification of pathogenic or likely pathogenic variants in several genes: *SUN5*, *BRDT*, *PMFBP1*, *TSGA10* and *HOOK1* [6].

SUN5 was the first gene reported in ASS, and with over 10 previously reported biallelic variants, remains by far the main cause of ASS (Table S1) [7–12].

SUN5 (Sad1 and UNC84 domain-containing 5), also known as *SPAG4L/TSARG4* (HGNC: 16252; MIM: 613942), is located on chromosome 20q11.21 and its expression is mostly testis-specific [13,14]. The encoded protein is expressed during spermiogenesis and remains present in mature sperm. *SUN5* is a transmembrane protein localized to the junction between the sperm nucleus and the head–tail coupling apparatus (HTCA) [15]. As a result, *SUN5* deficiency leads to disruption of the sperm head–tail junction and the detachment of the head from the flagellum during spermiogenesis [11,16]. Because most separated sperm heads are retained in the seminiferous epithelium and phagocytized by Sertoli cells, they are rarely observed in the ejaculate.

In the present study, we analysed nine unrelated men originating from North Africa and displaying ASS associated with primary infertility. We identified a very rare but ASS-frequent homozygous frameshift variant of *SUN5* in seven subjects (78%). Following the identification of this variant (c.211+1_+2dupGT (p.Ser71Cysfs11*)), we performed additional experiments to demonstrate its pathogenicity and study its impact on sperm morphology, ultrastructure, and ploidy status.

2. Results

2.1. Identification of a Rare Homozygous *SUN5* Variant in Seven ASS Subjects

We recruited nine unrelated infertile men originating from North Africa with an ASS characterized by the presence of a high proportion of headless tails and isolated heads (Figure 1A). Sperm parameters of the nine studied subjects are summarized in Table 1.

Table 1. Detailed semen parameters of subjects carrying the *SUN5* homozygous variant (c.211+1_211+2dupGT) and statistical comparison of the mean of the semen parameters between these subjects and those with unknown cause.

Subject Parameters	Lower Reference Limits (WHO, 2010)	P0166	P0168	P0177	P0386	P0504	PS1	PS2	All <i>SUN5</i> Mutated Subjects (n = 7)	All Non-Mutated Subjects (n = 2)	p Value
Age	-	37	52	37	42	31	49	38	40.86 ± 7.38 (n' = 7)	39 ± 2.82 (n' = 2)	0.61
Sperm volume (mL)	1.5	1.4	3	7	2.7	3.6	2	2.2	3.12 ± 1.85 (n' = 7)	5.23 ± 2.09 (n' = 2)	0.36
Sperm concentration (million/mL)	15	24	27	13.2	25.6	12.2	6.2	18	17.85 ± 8.16 (n' = 7)	9.76 ± 13.07 (n' = 2)	0.54
Total motility 1 h (%)	40	10	30	30	40	29	40	50	34.86 ± 12.65 (n' = 7)	15 ± 14.14 (n' = 2)	0.26

Table 1. Cont.

Subject Parameters	Lower Reference Limits (WHO, 2010)	P0166	P0168	P0177	P0386	P0504	PS1	PS2	All SUN5 Mutated Subjects (n = 7)	All Non-Mutated Subjects (n = 2)	p Value
Vitality (%)	58	83	70	80	65	47	60	80	69.26 ± 13.09 (n' = 7)	51.25 ± 1.77 (n' = 2)	0.29
Typical forms (%)	4	0	0	1	0	0	0	0	0.14 ± 0.38 (n' = 7)	11.25 ± 15.91 (n' = 2)	0.50
Abnormal head (%)	-	84	90	70	84	54	72	74	75.39 ± 12.05 (n' = 7)	51 ± 43.84 (n' = 2)	0.57
Absent flagella (%)	-	48	30	33	52	33	52	46	42.04 ± 9.60 (n' = 7)	21.75 ± 28.64 (n' = 2)	0.50
Bent flagella (%)	-	34	62	52	22	25	40	48	40.35 ± 14.67 (n' = 7)	31.5 ± 4.95 (n' = 2)	0.23
Multiple anomalies index	-	2.8	3.5	2.2	2.7	2.4	2.1	-	2.62 ± 0.51 (n' = 6)	2 ± 2.1 (n' = 2)	0.29

WHO = World Health Organization; SD = standard deviation; n = total number of patients in each group; n' = number of patients used to calculate the average based on available data. A significant difference at $p < 0.05$.

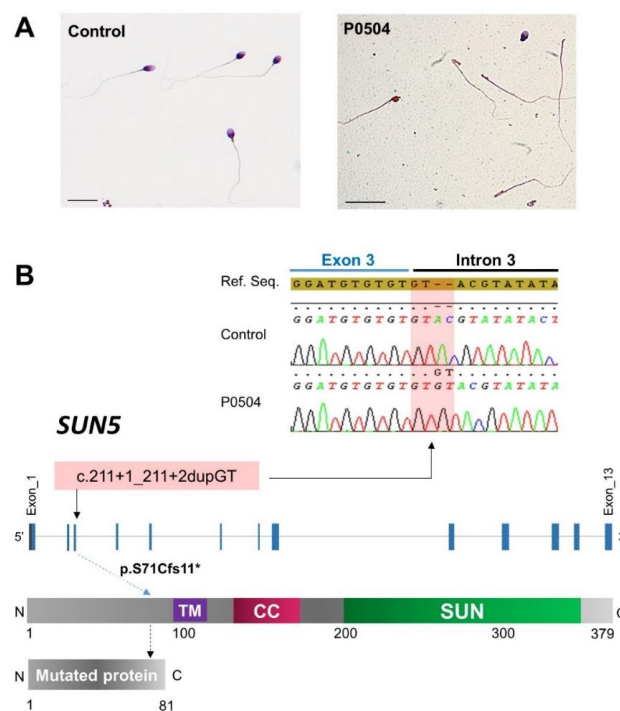


Figure 1. Sperm morphology and a description of the identified *SUN5* variant. (A) Light microscopy analysis of spermatozoa from a fertile control individual and a subject carrying the identified *SUN5* variant (P0504). Mutated subjects have numerous isolated flagella and few isolated abnormal heads. Scale bars = 20 μm . (B) The identified homozygous variant, as shown in the electropherograms, is located within a GT repetitive sequence located at the junction of exon 3 and the downstream intron (intron 3). We observe that the end of the exon 3 sequence contains three repetitive GT doublets, followed by the consensus donor splice-site sequence (GT) in intron 3. The identified variant causes the extension of this repetitive sequence and is predicted to impact both splicing and translation, leading to the production of a short and non-functional *SUN5* protein. The purple box represents a transmembrane domain (106–122 aa). The pink box represents a coiled-coil domain (155–183 aa), and the green box represents the Sad1/UNC-like C-terminal domain (205–364 aa) according to the Ensembl database (protein domains for ENSP00000348496.3). The red box represents the predicted protein in silico.

Among the nine recruited patients, seven were subjected to WES analysis and Sanger sequencing for validation. Because the ASS phenotype is rare and deleterious variants are expected to be negatively selected, we excluded all variants with a frequency greater than 1% in the gnomAD database. We then considered all the truncating variants as potentially deleterious, all variants scored as deleterious or probably damaging by sorting intolerant from tolerant (SIFT) and/or polymorphism phenotyping (PolyPhen), respectively, and all exonic or intronic near exonic variants were predicted to have a significant impact on splicing (predicted to create or obliterate a donor or acceptor splice site and scored as probably affecting splicing or potentially altering splicing) by HSF (Human Splicing Finder).

Finally, we retained a rare homozygous truncating variant of *SUN5* (ENST00000356173.8; c.211+1_211+2dupGT) in five subjects (P0166, P0168, P0177, P0386, and P0504) which is predicted to shift the reading frame, leading to the production of a truncated and non-functional protein (Figure 1B).

This variant was absent in all subjects of our control cohort ($n = 485$). In addition, it has only been reported in the gnomAD database in the heterozygous state and with an allelic frequency (AF) of 0.0166%. In the two remaining patients, we did not identify any bi-allelic deleterious variant in potential candidate genes, which were defined as follows: (1) other genes involved in acephalic spermatozoa syndrome, particularly in *PMFBP1* and *TSGA10* [17–20]; (2) genes previously described in a context of male infertility; or (3) genes with a predominant testicular expression or restricted expression in the testes.

Because we identified this variant in five subjects (71%), we performed targeted sequencing on the last two subjects (PS1 and PS2). Both were homozygous for the c.211+1_211+2dupGT variant (Figure 1B). Thus, we identified this variant in seven out of nine patients, increasing the diagnosis yield to 78%.

2.2. Dating of the *SUN5* c.211+1_211+2dupGT Variant

To estimate the age of the c.211+1_211+2dupGT variant identified in ASS infertile men, we used the size of the shared ancestral haplotype surrounding the *SUN5* insertion locus. Allowing for a single artefactual variant call (chr20:32943766 G→A in one sample), we observed a shared stretch of homozygosity in all five affected individuals who were analyzed by WES and expressed this variant in the homozygous state. This stretch of homozygosity starts between coordinates 32826214 and 32836863 and finishes between coordinates 33008666 and 33015599. We therefore estimate the shared haplotype size at approximately 181 Kb, which corresponds to 0.24 cM assuming a recombination rate of 1.30 cM/Mb [21].

The probability of observing a single ancestral haplotype of size c (measured in morgans) or larger is equal to $(1-c)g$, where g is the age of the deletion, measured in generations [22]. Thus, the probability that the $2n$ haplotypes carried by n unrelated individuals is larger than c is $(1-c)2ng$, which can be approximated by $e-2ngc$. Therefore, the length of the shared ancestral haplotype can be approximated by an exponential distribution of rate $2ng$, leading to $g \approx 1/(2nc)$. Here, we have $n = 5$ individuals and $c = 0.0024$ M, which provides an estimate of $g = 42$ generations for the *SUN5* variant. Labuda et al. have shown that dating arising from genetic clock methods is biased downward because these methods do not account for population expansion [23]. To account for an exponential expansion of rate r per generation, the mathematical expression $(-1/r)\ln(c.er/(er - 1))$ should be added to the estimates provided by genetic clock methods. If we assume that an upper bound for the expansion rate is given by the expansion $r = 0.4$, as was calculated for the Ashkenazi Jewish population [24], the age of the mutation is in the range of 42–54 generations. Given 25 years for the generation time, the mutation would have then arisen 1050–1350 years ago.

2.3. Demonstration of the Pathogenicity of the c.211+1_211+2dupGT *SUN5* Variant

The *SUN5* protein was shown to localize to the inner nuclear membrane and to interact with protein containing Klarsicht, ANC-1, Syne Homology (KASH) domains to form linker

of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complexes between the outer and the inner nuclear membranes (Figure 2A). In order to assess the deleterious impact of the identified *SUN5* variant and its implication in ASS and male infertility, we used immunofluorescence staining to study the localization and the level of *SUN5* protein expression in sperm cells from three mutated subjects (P0386, P0166 and P0504) compared to controls. As expected, in controls, *SUN5* staining yielded a punctiform signal at the head–tail junction (Figure 2B,C). The co-staining of β -acetylated tubulin, specifically marking the flagella, confirms the localization. In contrast, in sperm from mutated subjects, we did not observe any *SUN5* signaling, confirming the deleterious effect of the mutation.

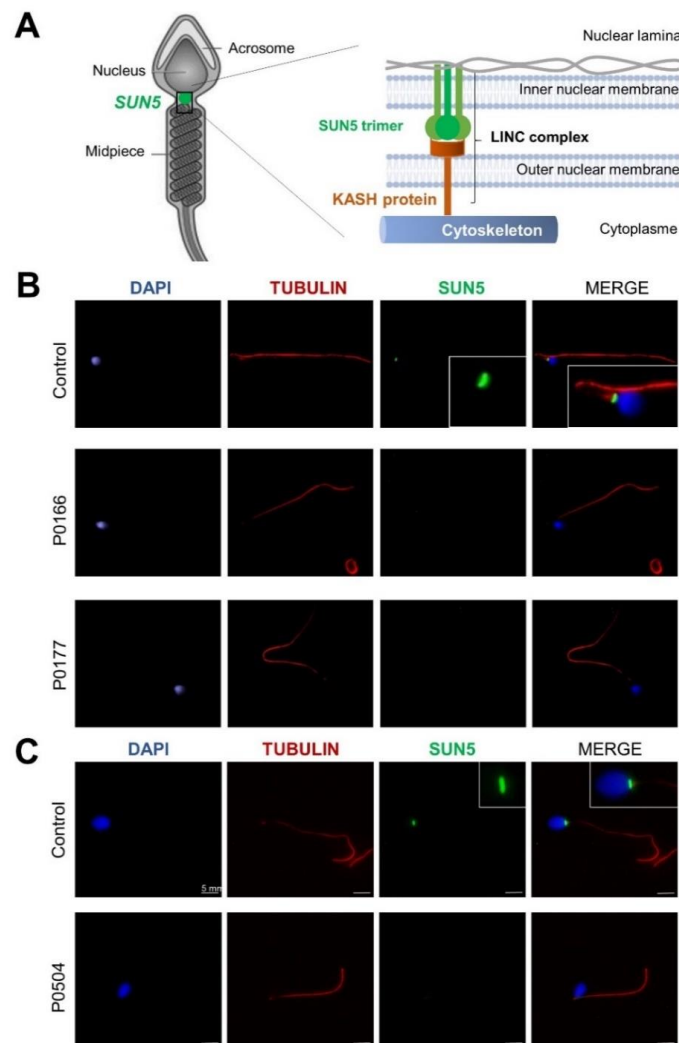


Figure 2. Localization of *SUN5* and immunostaining in human spermatozoa from control and mutated subjects. (A) Localization of the *SUN5* protein at the base of the sperm head, where it functions to anchor the sperm head to the flagellum. (B,C) Sperm cells from mutated subjects P0166 and P0177 (B) and P0504 (C) in addition to those from fertile controls were stained with anti-*SUN5* (1:200, green) and anti-acetylated tubulin (1:2000, red) antibodies. DNA was counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), showing sperm nuclear DNA (blue). The *SUN5* immunostaining (green) marked a punctiform signal at the head–tail junction. The co-staining with alpha-tubulin, specific for the flagella, confirm the localization. In contrast, the *SUN5* signal is absent from P0166, P0177, and P0504, confirming the deleterious effect of the mutation. KASH: Klarsicht, ANC-1, Syne Homology; LINC: linker of nucleoskeleton and cytoskeleton.

2.4. Ultrastructural Sperm Defects Associated with the Identified Homozygous *SUN5* Variant

To study the ultra-structure of sperm from *SUN5* mutated ASS individuals, we performed transmission electron microscopy (TEM) analysis on a fresh ejaculated semen sample from individual P0504. We first observed that despite head detachment, isolated sperm flagella from ASS individuals appeared globally normal and harbor distinctive midpiece and principal piece compartments, similar to that observed in sperm from control individuals. As observed with optic microscopy and previously described by others [5], a remnant of cytoplasm was sometimes present, and associated with an irregular mitochondrial sheath (Figure 3A). When looking more closely at the head–tail junction, the centriole and pericentriolar structures known as the striated columns could sometimes be distinguished; the basal plate was also visible (Figure 3A). The quantification of transversal sections of the axoneme indicated that 72% of sections had a normal microtubule conformation (9 + 2) as compared to an average of 84.5% for control individuals ($n = 4$; range: 76–92). Importantly, isolated heads had a normal acrosomal structure, but chromatin condensation appeared to be altered more often (Figure 3B). Quantification of the semen sample from individual P0504 indicated that 38% of sperm heads had normal chromatin condensation, as compared to an average of 65% for control sperm ($n = 4$; range: 46–82).

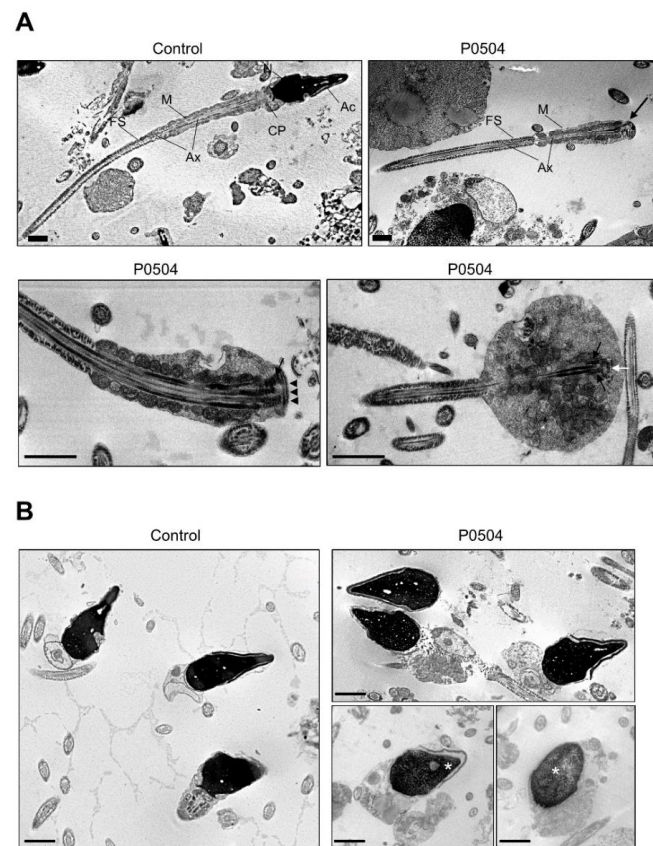


Figure 3. Sperm ultrastructure analysis by transmission electron microscopy (TEM). TEM analysis of semen samples from a control individual and from individual P0504. **(A)** Longitudinal sections of sperm flagella showing an overall regular organization of the midpiece and principal piece in the sample from individual P0504, although some flagella were identified with cytoplasmic remnants and an irregular mitochondrial sheath. The head–tail junction was also clearly distinguishable, as were the centriole (white arrow) and the striated columns (black arrow); the basal plate was also visible (black arrowheads). Ac: acrosome; N: nucleus; MS: mitochondrial sheath; Ax: axoneme; FS: fibrous sheath. Scale bars represent 1 μm. **(B)** Analysis of isolated heads in the semen sample from individual P0504 showing normal acrosomal structure but altered chromatin condensation (white asterisk). Scale bars represent 1 μm.

2.5. FISH Did Not Demonstrate a Higher Rate of Sperm Chromosomal Aneuploidies in ASS Men Carrying the Identified *SUN5* Variant

FISH analysis of ejaculated spermatozoa was carried out using three different probe sets for chromosomes X, Y, and 21 in various colors. X and Y chromosomes are respectively represented by blue and green spots; the red spots represent chromosome 21. Sperm chromatin was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and fluoresces in dark blue (Figure 4A). The analysis was carried out on a total of 24,866 spermatozoa obtained from five fertile controls and 6355 spermatozoa from three ASS subjects carrying the identified *SUN5* variant. At least 2000 cells were counted per sample, with a mean of 3831 cells. As hybridization defects cannot be differentiated from nullosomic cells, only disomic or diploid cells were considered. Each sperm cell was identified as normal (21,X or 21,Y), disomic for sex chromosomes (21,X,Y or 21,X,X or 21,Y,Y), disomic for chromosome 21 (21,21,X or 21,21,Y) or diploid (21,21,X,Y or 21,21,X,X or 21,21,Y,Y) (Table S3). Data analysis did not demonstrate a significant statistical difference between the two groups regarding the aneuploidy rate, thus indicating that chromosomal content, here assessed by chromosomes X, Y, and 21, is not affected in sperm cells produced by men displaying ASS due to *SUN5* deficiency.

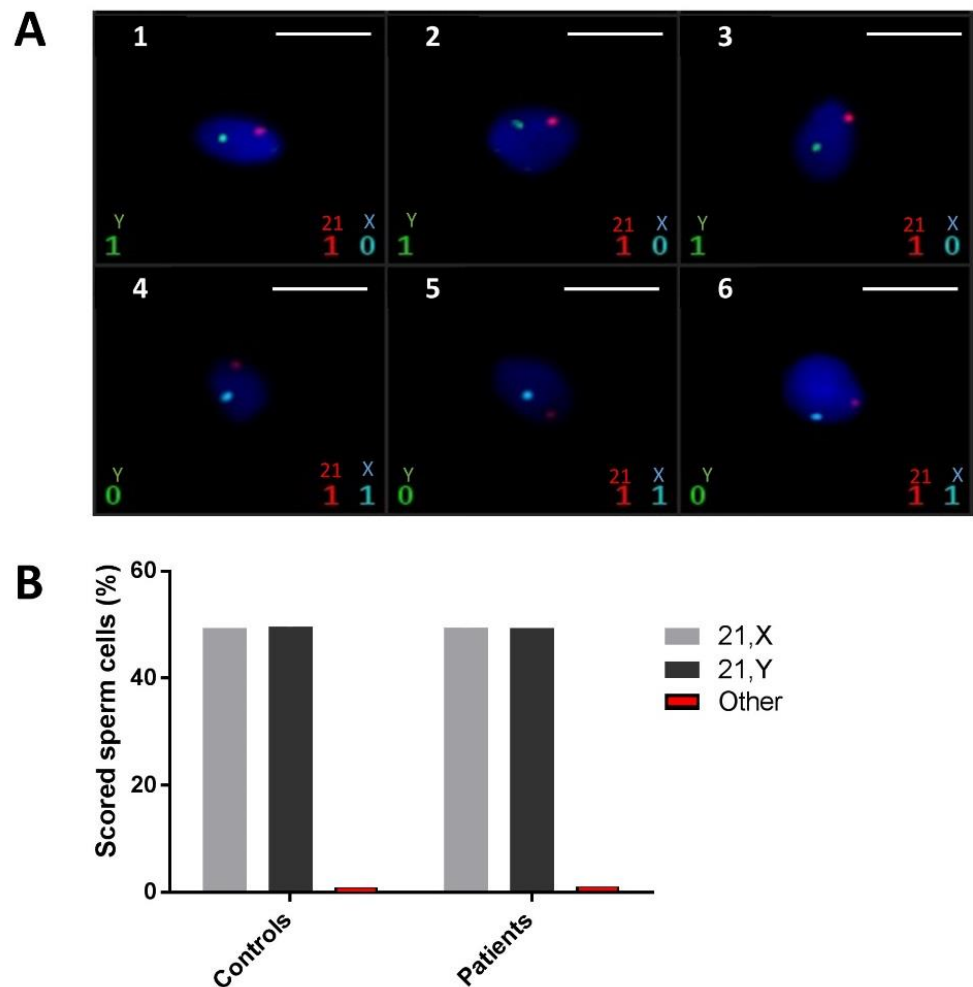


Figure 4. Sperm fluorescent in situ hybridization (FISH). (A) Images 1–6 show normal X, Y (blue and green spots, respectively) bearing sperm with no aneuploidy. Chromosome 21 is present every time (in red). Scale bars represent 5 μ m. (B) Percentages of normal cells (21,X or 21,Y) and percentages of other types of ploidy (disomic for sex chromosomes, chromosome 21, or diploid cells).

3. Discussion

In the present study, we investigated a cohort of nine infertile men, all originating from North Africa and displaying ASS, by WES and targeted sequencing. This strategy allowed us to identify a frequent homozygous loss-of-function variant of *SUN5* in seven out of nine (78%) analyzed subjects. This result strongly confirms that *SUN5* is the main genetic actor of ASS and that the identified causative variant is responsible for the majority of ASS cases in the North African population. By searching the literature, we found that the same variant was previously identified in a single Chinese case of ASS [8]. However, the deleterious impact of this variant was not validated by functional assays and was just reported with other *SUN5* candidate variants in this previously published study.

In sperm from control subjects, immunofluorescence staining showed a punctiform signal, thus confirming the localization of *SUN5* at the head–tail junction. As expected, the signal was absent in sperm from ASS individuals carrying the *SUN5* variant. This absence of signal confirms the deleterious impact of the identified variant. Two hypotheses can explain the observed effect: (1) the duplication of the donor splice site introduces two additional nucleotides in the mRNA sequence, leading to a frameshift and the production of a truncated protein (p.S71Cfs11*). The truncated protein would therefore be lacking its SUN domain (from 205–364 aa) and could not localize to the nuclear membrane; or (2) the variant leads to the production of unstable mRNA that is degraded by nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Unfortunately, as the studied patients had only a few sperm heads, we could not extract enough mRNA to perform a successful RT-PCR and determine which of these hypotheses is correct. Finally, to demonstrate the deleterious impact of this homozygous variant, we performed a series of immunofluorescence (IF) assays using a highly sensitive and specific antibody raised against *SUN5* (17495–1-AP; Proteintech) that has been previously validated and successfully used in several published studies [8,12,14–17,20]. *SUN5* is a member of the SUN domain-containing protein family, which comprises five members (*SUN1–5*). These proteins are transmembrane proteins that localize at the inner nuclear membrane and directly interact with KASH domain proteins to form LINC complexes between the outer and inner nuclear membranes in order to connect the nucleus to the cell cytoskeleton [25]. *SUN5* is highly and specifically expressed in the testes and shows an increased transcriptional expression level during the last step of germ cell development, concomitant with the round spermatid stage [13,15]. The encoded protein localizes specifically at the posterior nuclear region toward the head–tail junction, a structure termed the head–tail coupling apparatus (HTCA) [15]. The HTCA originates from the centrosome and connects the nuclear envelope to the intermediate piece of the flagellum [26]. *SUN5* deficiency is associated with a normal assembly of the HTCA during the early stages of spermiogenesis, but it dissociates from the nuclear envelope in elongated spermatids, causing the detachment of the tail from the head [27]. The ultrastructural analysis of ejaculated spermatozoa from subject P0504 carrying the identified variant also showed that the HTCA was normally assembled but completely detached from the sperm nuclear envelope. Based on the ultrastructure of acephalic spermatozoa observed in several ASS cases, this phenotype could be classified into three sub-types: sub-type 1) acephalic spermatozoa with decapitated heads that contain only the proximal centriole; sub-type 2) acephalic spermatozoa with decapitated tails that contain the proximal and distal centriole; and sub-type 3) acephalic spermatozoa with decapitated heads that contain the proximal and distal centrioles (Figure 5).

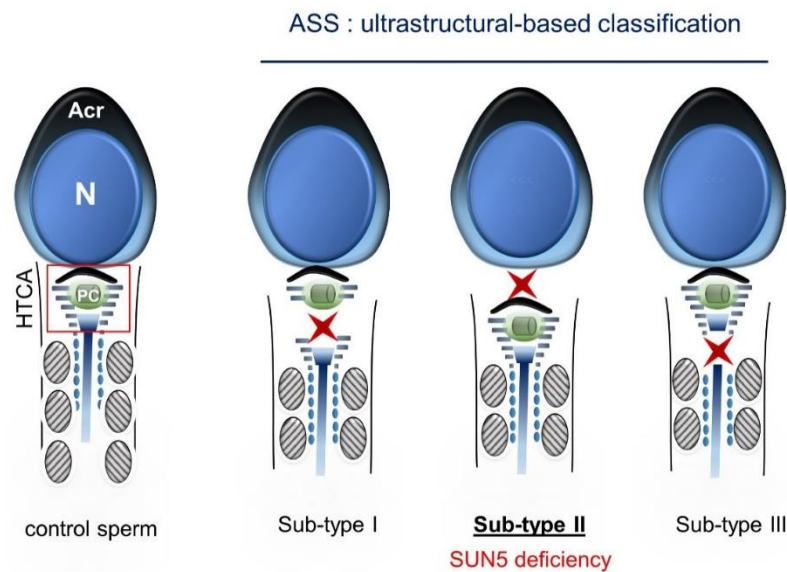


Figure 5. Ultrastructural-based classification of acephalic spermatozoa syndrome (ASS). Red star markers indicate the breakage level of the head–tail coupling apparatus (HTCA), defining three ASS sub-types. SUN5 deficiency leads to sub-type II, marked by the disruption of the junction between the nuclear envelope and the proximal centriole (PC). Acr: acrosome; N: nucleus.

The ultrastructure of acephalic spermatozoa from individual P0504 observed by TEM clearly demonstrates ASS sub-type II, which is concordant with SUN5 deficiency. In this case, isolated sperm heads observed in the ejaculate are lacking the centrioles. The importance of these structures in human reproduction is still debated, but it seems important for successful fertilization and embryonic development [28]. Some reports indicate successful In vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection (IVF-ICSI) for ASS patients performed with isolated heads, while others indicate the use of a fully assembled spermatozoa or the addition of both an isolated head and an isolated flagellum, as performed for patient P0504 (Figure 6). Indeed, for this patient, two ICSI cycles retrieving 17 oocytes in all and 14 metaphase two-stage oocytes led to 100% fertilization and cleavage rates associated with the delivery of three healthy babies. Further quantitative analyses would have to be performed to determine if the co-injection of the head and the flagellum is necessary during ICSI for ASS subjects.

To complete our phenotypic characterization of sperm produced by subjects carrying the identified *SUN5* variant, we analyzed the chromatin content of ejaculated spermatozoa from three mutated subjects (P0166, P0386 and PS1) by fluorescent in situ hybridization (FISH). Results showed that sperm from these subjects had a low rate of aneuploidy, which is comparable with that observed in the sperm of fertile controls ($n = 5$). This result is also in favor of good IVF-ICSI outcomes for ASS subjects.

In conclusion, our results confirm that *SUN5* is the main causal gene of ASS and that WES is efficient to identify single gene defects in a context of severe male infertility. Moreover, we report here a frequent *SUN5* variant that could be responsible for nearly 80% of ASS cases in the North African population. The effect of this variant cannot be questioned as: (1) it was identified in seven unrelated individuals; (2) it affects a consensus splice donor site and is predicted to introduce a frameshift in the mRNA sequence; (3) the protein was shown to be absent in mature sperm from mutated subjects; and (4) it was previously identified through an independent study in an infertile man displaying ASS and originating from a distant geographical region (China), thus definitively confirming its causative role in ASS and primary male infertility.

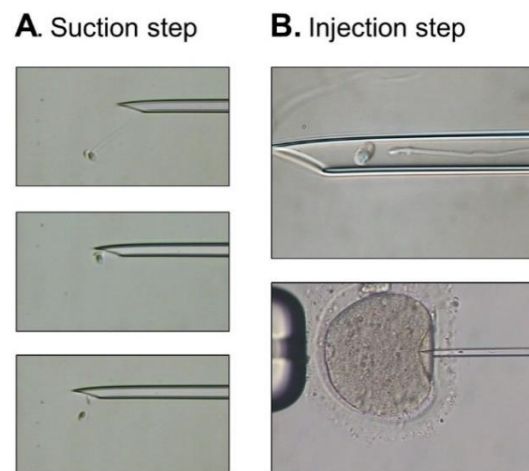


Figure 6. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure using selected sperm from subject P0504. (A) A complete spermatozoon showing progressive motility was selected. Gentle immobilization was performed, and suction to aspirate the spermatozoon into the injection needle was first applied to the tail. As the sperm head sheared from the tail during suction, the next step consisted of suctioning the head to place it with the tail in the injection needle. (B) Both the head and the tail were injected within the same needle into a mature oocyte.

4. Material and Methods

4.1. Subject Selection and Recruitment

Nine unrelated infertile men were included in the present study, all originating from North Africa and displaying non-syndromic infertility due to acephalic spermatozoa syndrome (ASS). Subjects were recruited from three reproductive biology centers: seven individuals sought consultation for primary infertility at the Clinique des Jasmins in Tunis (Tunisia), one individual was recruited at the Jean Verdier Hospital in Paris (France), and one individual was recruited at the Rouen University Hospital (France).

Informed consent was obtained from all individuals participating in the study according to local protocols and the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by local ethics committees, and samples were then stored in the Centre de Ressources Biologiques Germethèque (certification under ISO-9001 and NF-S 96–900) according to a standardized procedure, or were part of the Fertithèque collection declared to the French Ministry of Health (DC-2015–2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016–392).

4.2. Semen Parameters and Sperm Morphology

Semen samples were obtained by masturbation after two to seven days of sexual abstinence. Semen samples were incubated for 30 min at 37 °C for liquefaction; ejaculate volume and pH, together with sperm concentration, vitality, morphology, and motility, were evaluated according to World Health Organization (WHO) guidelines [29]. Sperm vitality was assessed by eosin staining, and sperm morphology was analyzed on Schorr stained semen smears according to David’s modified classification [30].

4.3. Whole Exome Sequencing and Variant Filtering

Genomic DNA was isolated from blood samples or saliva using the Oragen DNA Extraction Kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Canada). Genetic data were obtained from various sequencing centers, in particular Novogene and Integragen. Coding regions and intron/exon boundaries were sequenced after enrichment using SureSelect Human All Exon V6 from Agilent.

An alignment-ready GRCh38 reference genome (including alternative sequences (ALT), decoy, and human leukocyte antigens (HLA)) was produced using “run-gen-ref

hs38DH" from Heng Li's bwakit package [31]. The exomes were analyzed using a bioinformatics pipeline developed in-house. The pipeline consists of two modules, both distributed under the GNU General Public License v3.0 and available on github.

The first module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Primary> (accessed on 15 January 2021)) takes FASTQ files as input and produces a single merged GVCF file, as follows. Adaptors are trimmed and low-quality reads are filtered with fastp 0.20.0 [32], reads are aligned with BWA-MEM 0.7.17 [33], duplicates are marked using sambalster 0.1.24 [34], and BAM files are sorted and indexed with samtools 1.9 [35]. SNVs (single nucleotide variants) and short indels are called from each BAM file using strelka 2.9.10 to produce individual GVCF files [36]. These are finally merged with mergeGVCFs.pl to obtain a single multi-sample GVCF, which combines all exomes available in our laboratory.

The second module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Secondary> (accessed on 15 January 2021)) takes this merged GVCF as input and produces annotated analysis ready TSV files. This is achieved by performing up to 15 streamlined tasks, including the following: low-quality variant calls (read depth (DP) < 10, genotype quality for variant filtration (GQX) < 20, or less than 15% of reads supporting the ALT allele) are discarded; Variant Effect Predictor v92 (McLaren et al., 2016) is used to annotate the variants and predict their impact, allowing us to filter low-impact variants and/or prioritize high-impact ones (e.g., stop-gain or frameshift variants) [37]; gene expression data from the Genotype-Tissue Expression project (GTEx v7) are added; variants with a minor allele frequency greater than 1% in gnomAD v2.0, 3% in 1000 Genomes Project phase 3, or 5% in NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, USA) ESP6500 are filtered (variants are also compared to those obtained from 485 exomes of healthy control individuals or of patients presenting a clearly different phenotype. Because all variants result from the same bioinformatics pipeline, this allows us to filter artifacts due to the pipeline itself, as well as genuine variants that may be missing from public databases but are actually not so rare in our cohorts); finally, the resulting TSV files can be opened with spreadsheet software such as LibreOffice Calc or Microsoft Excel for further filtering and sorting, in order to identify candidate causal variants.

4.4. Sanger Verification of the Variant

Variants identified by WES were subjected to Sanger verification using an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analyses were performed using SeqScape software 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer sequences and their expected product sizes are summarized in Table S2.

4.5. Immunofluorescence Analysis of Sperm Cells

Immunostaining was carried out on samples from individuals P0386, P0166, and P0504. Sperm cells were fixed in phosphate buffered saline (PBS) and 4% paraformaldehyde (PFA) for 7 min. After washes in PBS, the sperm suspension was spotted onto slides pre-coated with 0.1% poly-l-lysine (Thermo Fisher Scientific). Heat antigen retrieval was performed by boiling slides immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, 0.05% Tween 20, pH 6.0 for 20 min. Slides were then blocked in 5% normal goat serum (NGS; GIBCO, Thermo Fisher Scientific) + DPBS for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C in 0.1% (*v/v*) Triton X-100 + DPBS (Triton X-100, MilliporeSigma, Ontario, Canada) with 2% NGS. Polyclonal rabbit anti-SUN5 antibody was purchased from Proteintech, Manchester, UK, (17495-1-AP) and diluted at 1:200. Monoclonal mouse anti-acetylated α -tubulin antibody was purchased from Sigma-Aldrich (Irvine, UK) and diluted at 1:2000. The slides were then washed and incubated with secondary antibody diluted at 1:800 (Dylight-549-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) and Dylight-488-conjugated goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch (Cambridgeshire, United Kingdom) and Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature, rinsed, and mounted with Dako Fluorescence Mounting Medium (Thermo

Fisher Scientific). Images were acquired on a Nikon Eclipse 8 microscope and processed with ISIS software.

4.6. Transmission Electron Microscopy

To better characterize the impact of the reported candidate variant on sperm ultrastructure, sperm from P0504 (an individual carrying this variant) were subjected to transmission electron microscopy. Sperm were collected from fresh ejaculate and washed with M2 medium (Sigma-Aldrich Co. Ltd., Irvine, UK) by centrifugation at 300 g for 10 min. Sperm cells were fixed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7, containing 3% glutaraldehyde (Grade I; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (room temperature, 90 min). After two washes in PBS + 1% sucrose, samples were resuspended in 0.2 M sodium cacodylate buffer. Secondary fixation was performed with 1% osmium tetra-oxide (Agar Scientific Ltd., Essex, UK) and was followed by dehydration in graded alcohol and embedding in Epon resin (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). After staining with toluidine blue-Azur II, semi-thin sections were examined on a Zeiss Axioscope photomicroscope (Carl Zeiss, GmbH, Jena, Germany). The use of a Reichert OmU2 ultramicrotome (Reichert-Jung AG, Wien, Austria) allowed us to obtain ultra-thin sections (90 nm), which were then stained with uranyl acetate and lead citrate. These sections were examined with a JEOL JEM 100CX II electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan). All images were acquired with Digital Micrograph software coupled to a Gatan Erlangshen CCD (charge-coupled device) camera.

4.7. Sperm Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

FISH was performed on ejaculated spermatozoa from patients P0166, P0386, and PS1, in addition to fertile controls ($n = 5$). Semen samples were prepared for a triple-color FISH using centromeric probes for chromosomes 21, X, and Y (XA TriScore Aneusomy Probe-MetaSystems[®] Probes, Heidelberg, Germany). Sperm samples were washed in phosphate buffered saline solution and fixed in methanol/acetic acid solution (3:1). Sperm head decondensation was performed using a solution of NaOH (1 M) and then washed twice in saline sodium citrate (SSC) solution. Denaturation was performed on sperm nuclei and probes for 2 min at 75 °C. After overnight incubation at 37 °C, the slides were washed in 0.4× SSC/0.3% NP40, then twice in SSC/0.1% NP40. The slides were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and analyzed with a Leica DM 5000B epifluorescence microscope equipped with a Metafer Slide Scanning System and MetaCyte software (Metasystems[®], Altlussheim, Germany). Chromosomal aneuploidies were analyzed simultaneously for chromosomes 21, X, and Y with Aqua, FITC, and Spectrum Orange filters. All the combinations of spots counted in the cells during the automatic procedure were manually verified by a trained technician in the galleries of images provided by the machine. Statistical analyses were calculated using Student's t test on GraphPAD prism software 6 (San Diego, CA USA).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/2187/s1>.

Author Contributions: Z.-E.K., C.S., C.C. (Caroline Cazin), C.A., A.T. and P.F.R. analyzed the data and wrote the manuscript; Z.-E.K., C.C. (Caroline Cazin), G.M., C.C. (Charles Coutton) and N.T.-M. performed and analyzed the genetic data; A.T. performed TEM analysis and analyzed the morphological and structural data; Z.-E.K., C.C. (Caroline Cazin), Y.B. and M.W. performed the immunofluorescence assays and analyzed the data. Z.-E.K., C.C. (Caroline Cazin), G.M. and C.C. (Charles Coutton) performed and analyzed fluorescence in situ hybridization (FISH) data; R.Z., S.F.B.M., P.D.P., N.R. and C.S. provided clinical samples and data; Z.-E.K., C.S., A.T., C.A., and P.F.R. designed the study, supervised all molecular laboratory work, had full access to all data in the study, and took responsibility for the integrity of the data and its accuracy. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Inserm–Bettencourt Foundation, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Paris Descartes, the University Grenoble Alpes, and the French National Research Agency (grant FLAGELOME ANR-19-CE17-0014 to PR, AT and NT-M; grant DIVERCIL ANR-17-CE13-0023 to AT).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by local ethics committees and samples were then stored in the Centre de Ressources Biologiques Germéthèque (certification under ISO-9001 and NF-S 96–900) according to a standardized procedure, or were part of the Fertithèque collection declared to the French Ministry of Health (DC-2015–2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016–392).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank all the individuals and their families for their cooperation, as well as all the referring physicians. We thank the Cellular Imaging Facility for electron microscopy procedures.

Conflicts of Interest: The authors have declared that no conflict of interest exist.

References

- Mascarenhas, M.N.; Flaxman, S.R.; Boerma, T.; Vanderpoel, S.; Stevens, G.A. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* **2012**, *9*, e1001356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agarwal, A.; Mulgund, A.; Hamada, A.; Chyatte, M.R. A Unique View on Male Infertility around the Globe. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **2015**, *13*. [[CrossRef](#)]
- Ray, P.F.; Toure, A.; Metzler-Guillemain, C.; Mitchell, M.J.; Arnoult, C.; Coutton, C. Genetic Abnormalities Leading to Qualitative Defects of Sperm Morphology or Function. *Clin. Genet.* **2017**, *91*, 217–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Touré, A.; Martinez, G.; Kherraf, Z.-E.; Cazin, C.; Beurois, J.; Arnoult, C.; Ray, P.F.; Coutton, C. The Genetic Architecture of Morphological Abnormalities of the Sperm Tail. *Hum. Genet.* **2021**, *140*, 21–42. [[CrossRef](#)]
- Chemes, H.E.; Puigdomenech, E.T.; Carizza, C.; Olmedo, S.B.; Zanchetti, F.; Hermes, R. Acephalic Spermatozoa and Abnormal Development of the Head–neck Attachment: A Human Syndrome of Genetic Origin. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 1811–1818. [[CrossRef](#)]
- Beurois, J.; Cazin, C.; Kherraf, Z.-E.; Martinez, G.; Celse, T.; Touré, A.; Arnoult, C.; Ray, P.F.; Coutton, C. Genetics of Teratozoospermia: Back to the Head. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, 101473. [[CrossRef](#)]
- Elkhatib, R.A.; Paci, M.; Longepied, G.; Saias-Magnan, J.; Courbière, B.; Guichaoua, M.-R.; Lévy, N.; Metzler-Guillemain, C.; Mitchell, M.J. Homozygous Deletion of SUN5 in Three Men with Decapitated Spermatozoa. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 3167–3171. [[CrossRef](#)]
- Fang, J.; Zhang, J.; Zhu, F.; Yang, X.; Cui, Y.; Liu, J. Patients with Acephalic Spermatozoa Syndrome Linked to SUN5 Mutations Have a Favorable Pregnancy Outcome from ICSI. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2018**, *33*, 372–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, G.; Wang, N.; Zhang, H.; Yin, S.; Dai, H.; Lin, G.; Li, W. Novel Mutations in PMFBP1, TSGA10 and SUN5: Expanding the Spectrum of Mutations That May Cause Acephalic Spermatozoa. *Clin. Genet.* **2020**, *97*, 938–939. [[CrossRef](#)]
- Sha, Y.-W.; Xu, X.; Ji, Z.-Y.; Lin, S.-B.; Wang, X.; Qiu, P.-P.; Zhou, Y.; Mei, L.-B.; Su, Z.-Y.; Li, L.; et al. Genetic Contribution of SUN5 Mutations to Acephalic Spermatozoa in Fujian China. *Gene* **2018**, *647*, 221–225. [[CrossRef](#)]
- Shang, Y.; Yan, J.; Tang, W.; Liu, C.; Xiao, S.; Guo, Y.; Yuan, L.; Chen, L.; Jiang, H.; Guo, X.; et al. Mechanistic Insights into Acephalic Spermatozoa Syndrome-Associated Mutations in the Human SUN5 Gene. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2395–2407. [[CrossRef](#)]
- Zhu, F.; Wang, F.; Yang, X.; Zhang, J.; Wu, H.; Zhang, Z.; Zhang, Z.; He, X.; Zhou, P.; Wei, Z.; et al. Biallelic SUN5 Mutations Cause Autosomal-Recessive Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *99*, 1405. [[CrossRef](#)]
- Frohnert, C.; Schweizer, S.; Hoyer-Fender, S. SPAG4L/SPAG4L-2 Are Testis-Specific SUN Domain Proteins Restricted to the Apical Nuclear Envelope of Round Spermatids Facing the Acrosome. *Mol. Hum. Reprod.* **2011**, *17*, 207–218. [[CrossRef](#)]
- Jiang, X.-Z.; Yang, M.-G.; Huang, L.-H.; Li, C.-Q.; Xing, X.-W. SPAG4L, a Novel Nuclear Envelope Protein Involved in the Meiotic Stage of Spermatogenesis. *DNA Cell Biol.* **2011**, *30*, 875–882. [[CrossRef](#)]
- Yassine, S.; Escoffier, J.; Abi Nahed, R.; Nahed, R.A.; Pierre, V.; Karaouzene, T.; Ray, P.F.; Arnoult, C. Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and Dpy19l2 Knock-out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118698. [[CrossRef](#)]
- Shang, Y.; Zhu, F.; Wang, L.; Ouyang, Y.-C.; Dong, M.-Z.; Liu, C.; Zhao, H.; Cui, X.; Ma, D.; Zhang, Z.; et al. Essential Role for SUN5 in Anchoring Sperm Head to the Tail. *eLife* **2017**, *6*, e28199. [[CrossRef](#)]
- Sha, Y.-W.; Wang, X.; Xu, X.; Ding, L.; Liu, W.-S.; Li, P.; Su, Z.-Y.; Chen, J.; Mei, L.-B.; Zheng, L.-K.; et al. Biallelic Mutations in PMFBP1 Cause Acephalic Spermatozoa. *Clin. Genet.* **2019**, *95*, 277–286. [[CrossRef](#)]
- Sha, Y.-W.; Sha, Y.-K.; Ji, Z.-Y.; Mei, L.-B.; Ding, L.; Zhang, Q.; Qiu, P.-P.; Lin, S.-B.; Wang, X.; Li, P.; et al. TSGA10 Is a Novel Candidate Gene Associated with Acephalic Spermatozoa. *Clin. Genet.* **2018**, *93*, 776–783. [[CrossRef](#)]

19. Ye, Y.; Wei, X.; Sha, Y.; Li, N.; Yan, X.; Cheng, L.; Qiao, D.; Zhou, W.; Wu, R.; Liu, Q.; et al. Loss-of-Function Mutation in TSGA10 Causes Acephalic Spermatozoa Phenotype in Human. *Mol. Genet. Genomic Med.* **2020**, *8*, e1284. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, F.; Liu, C.; Wang, F.; Yang, X.; Zhang, J.; Wu, H.; Zhang, Z.; He, X.; Zhang, Z.; Zhou, P.; et al. Mutations in PMFBP1 Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2018**, *103*, 188–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jensen-Seaman, M.I.; Furey, T.S.; Payseur, B.A.; Lu, Y.; Roskin, K.M.; Chen, C.-F.; Thomas, M.A.; Haussler, D.; Jacob, H.J. Comparative Recombination Rates in the Rat, Mouse, and Human Genomes. *Genome Res.* **2004**, *14*, 528–538. [[CrossRef](#)]
22. Slatkin, M.; Rannala, B. Estimating Allele Age. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2000**, *1*, 225–249. [[CrossRef](#)]
23. Labuda, M.; Labuda, D.; Korab-Laskowska, M.; Cole, D.E.; Zietkiewicz, E.; Weissenbach, J.; Popowska, E.; Pronicka, E.; Root, A.W.; Glorieux, F.H. Linkage Disequilibrium Analysis in Young Populations: Pseudo-Vitamin D-Deficiency Rickets and the Founder Effect in French Canadians. *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *59*, 633–643.
24. Risch, N.; de Leon, D.; Ozelius, L.; Kramer, P.; Almasry, L.; Singer, B.; Fahh, S.; Breakefield, X.; Bressman, S. Genetic Analysis of Idiopathic Torsion Dystonia in Ashkenazi Jews and Their Recent Descent from a Small Founder Population. *Nat. Genet.* **1995**, *9*, 152–159. [[CrossRef](#)]
25. Cain, N.E.; Jahed, Z.; Schoenhofen, A.; Valdez, V.A.; Elkin, B.; Hao, H.; Harris, N.J.; Herrera, L.A.; Woolums, B.M.; Mofrad, M.R.K.; et al. Conserved SUN-KASH Interfaces Mediate LINC Complex-Dependent Nuclear Movement and Positioning. *Curr. Biol. CB* **2018**, *28*, 3086–3097.e4. [[CrossRef](#)]
26. Yang, K.; Adham, I.M.; Meinhardt, A.; Hoyer-Fender, S. Ultra-Structure of the Sperm Head-to-Tail Linkage Complex in the Absence of the Spermatid-Specific LINC Component SPAG4. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *150*, 49–59. [[CrossRef](#)]
27. Nie, H.; Tang, Y.; Qin, W. Beyond Acephalic Spermatozoa: The Complexity of Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*. [[CrossRef](#)]
28. Avidor-Reiss, T.; Mazur, M.; Fishman, E.L.; Sindhvani, P. The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction—The Known and the Unknown. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 188. [[CrossRef](#)]
29. Cooper, T.G.; Noonan, E.; von Eckardstein, S.; Auger, J.; Baker, H.W.G.; Behre, H.M.; Haugen, T.B.; Kruger, T.; Wang, C.; Mbizvo, M.T.; et al. World Health Organization Reference Values for Human Semen Characteristics. *Hum. Reprod. Update* **2010**, *16*, 231–245. [[CrossRef](#)]
30. Auger, J.; Jouannet, P.; Eustache, F. Another Look at Human Sperm Morphology. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2016**, *31*, 10–23. [[CrossRef](#)]
31. Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Long-Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2010**, *26*, 589–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2018**, *34*, i884–i890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, H. Aligning Sequence Reads, Clone Sequences and Assembly Contigs with BWA-MEM. *arXiv* **2013**, arXiv:1303.3997.
34. Faust, G.G.; Hall, I.M. SAMBLASTER: Fast Duplicate Marking and Structural Variant Read Extraction. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2014**, *30*, 2503–2505. [[CrossRef](#)]
35. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
36. Kim, S.; Scheffler, K.; Halpern, A.L.; Bekritsky, M.A.; Noh, E.; Källberg, M.; Chen, X.; Kim, Y.; Beyter, D.; Krusche, P.; et al. Strelka2: Fast and Accurate Calling of Germline and Somatic Variants. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 591–594. [[CrossRef](#)]
37. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122. [[CrossRef](#)]

SUPPLEMENTARY TABLES

Table 1. List of mutations previously identified in SUN5 implicated in Acephalic Spermatozoa syndrome.

Gene Name	Chromosome Position	Coding Sequence Variant	Protein Variant	Cohort Description	Mutated Subjects	Reference
		c.824C>T	p.Thr275Met		1	
		c.851C>G	p.Ser284*		1	
		c.340G>A	p.Gly114Arg		1	
		c.1066C>T/ c.485T>A	p.Arg356Cys and p.Met162Lys		1	
		c.381delA/ c.824C>T	p.Val128Serfs* 7 and p.Thr275Met	17 unrelated men	1	(Zhu et al., 2016)
		c.381delA/ c.781G>A	p.Val128Serfs* 7 and p.Val261Met		1	
		c.216G>A/ c.1043A>T	p.Trp72* and p.Asn348Ile		1	
SUN5	20:3157158 0-31592240	c.425+1G>A/c.1043 A>T	p.Asn348Ile		1	
		GRCh38 - chr20:32995761_32 990672delinstGGT	p.Leu143Serfs* 30	3 related men	3	(Elkhatib et al., 2017)
		c.829C>T	p.Gln277*		1	
		c.1067G>A	p.Arg356His	3 unrelated men	1	(Fang et al., 2018)
		c.211+1_211+ dupGT	p.Ser71Cysfs11 *	15 unrelated men	1	
		c.381delA	p.Val128Serfs* 7	5 unrelated men	5	(Sha et al., 2018a)
		c.781G>A/ c.1043A>T	p.Val261Met and p.Asn348Ile	3 unrelated men	1	(Shang et al., 2018)

c.425+1G>A/c.475C >T	p.Arg159*	1
		11
c.772C>T	p.Arg258Cys	unrelated
		1 (Liu et al., 2020)
		men

Table S2. Sequences of primers used and expected product sizes

Primer sequences used for Sanger sequencing verification of *SUN5* mutations and respective melting temperatures.

Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	T _m (°C)	Product Size (bp)
SUN5_EX3-Forward	GTCCGCACACAATGACCAAGC	60	406
SUN5_EX3-Reverse	AAGAGGGATGACTGGGTGGA	60	

Table S3. Sperm-FISH analysis.

Data were recorded from 24866 sperm cells from fertile controls (*n* = 5) and 6355 from *SUN5* mutated subjects affected by

Chrom.	CTRL	CTRL	CTRL	CTRL	CTRL	SUN5	SUN5	SUN5	Mean CTRL ± SD	Mean SUN5 ± SD
	1	2	3	4	5	P0166	P0386	PS1		
% Haploid Sperm	21,X ^{48,7}	49,80	49,26	49,07	50,12	48,57	51,46	48,38	49,41±0,55	49,47±1,73
	21,Y ^{50,2}	49,42	49,69	50,00	49,01	50,30	47,56	50,46	49,68±0,49	49,44±1,63
% Disomic Sperm	21,X,Y	0,46	0,42	0,59	0,60	0,69	0,67	0,63	0,55±0,11	0,66±0,03
	21,XX	0,08	0,06	0,08	0,10	0,02	0,00	0,10	0,07±0,03	0,07±0,06
	21,YY	0,12	0,08	0,10	0,10	0,02	0,04	0,10	0,08±0,04	0,08±0,03
% Diploid Sperm	21,21,X	0,04	0,06	0,04	0,04	0,02	0,05	0,04	0,04±0,01	0,05±0,00
	21,21,Y	0,08	0,06	0,06	0,04	0,04	0,09	0,05	0,06±0,02	0,06±0,02
	21,21,X,Y	0,06	0,04	0,08	0,00	0,06	0,09	0,14	0,05±0,03	0,11±0,03
% Diploid Sperm	21,21,XX	0,08	0,04	0,04	0,02	0,02	0,00	0,05	0,04±0,02	0,03±0,03
	21,21,YY	0,04	0,02	0,06	0,02	0,00	0,04	0,05	0,03±0,02	0,03±0,03

II. Autres articles

Au-delà de ces articles présentés précédemment qui ont constitué le cœur de ma thèse, j'ai également contribué à d'autres projets sur les phénotypes d'anomalies morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes permettant de publier 23 articles, dont deux revues de la littérature (Beurois et al., 2020; Touré et al., 2020). Les résumés de ces articles sont en **Annexe 2**.

Concernant le phénotype d'anomalies morphologiques multiples du flagelle spermatique (AMMF) j'ai pu contribuer à 11 articles et deux revues de la littérature. Ainsi, pour ces études, j'ai participé à l'analyse du résultat du séquençage exomique de notre cohorte de 167 patients présentant des AMMF, validé les variants identifiés par séquençage Sanger et produit les figures décrivant les anomalies génétiques identifiées et figurant dans la plupart des publications.

En 2019, nous avons ainsi identifié deux patients non apparentés de la cohorte porteurs d'un variant homozygote délétère dans le gène **CFAP70** (Beurois et al., 2019) : c.1723-1G>T et p.Phe60Ile. *CFAP70* code pour une protéine régulatrice des bras de dynéine externe (ODA) fortement exprimée dans le testicule. L'analyse par immunofluorescence des spermatozoïdes des patients a montré l'absence de marqueurs pour les ODA et de la paire centrale de l'axonème. Cette étude est la première montrant que la perte de fonction de *CFAP70* entraîne un phénotype d'AMMF et que les protéines liées aux ODA peuvent être cruciales pour l'assemblage et/ou la stabilité de l'axonème du flagelle en plus de sa motilité.

Nous avons également identifié un variant homozygote perte de fonction dans le gène **QRICH2** chez deux autres patients de la cohorte (1%), non apparentés, originaires d'Algérie et d'Iran : c.3501C>G [p.Tyr1167Ter] et c.4614C>G [p.Tyr1538Ter] (Kherraf et al., 2019). Des variants dans *QRICH2* ayant déjà été identifiés précédemment et la souris KO étant infertile et présentant un phénotype d'AMMF (Shen et al., 2019b, p. 2), ces résultats confirment que les mutations dans *QRICH2* sont une cause récurrente mais rare du phénotype d'AMMF.

Chez 5 autres patients de la cohorte, nous avons identifié des variants homozygotes tronquant dans le gène **TTC29** exprimé majoritairement dans le testicule (Lorès et al., 2019, p. 29). Parmi ces variants, un provoquait l'apparition d'un codon-stop, un provoquait un décalage du cadre

de lecture et trois identiques affectaient un site donneur consensus d'épissage. Deux modèles permettant d'étudier la perte de fonction de *TTC29* ont été produits : *Trypanosoma brucei*, protiste flagellé utilisé pour étudier le battement flagellaire et *Mus musculus*. Ces modèles ont permis de confirmer l'importance de *TTC29* dans le battement flagellaire et ont permis de montrer que *TTC29* est une protéine axonémale requise pour la structure et le battement flagellaire. Cette étude a ainsi permis de montrer que les variants de *TTC29* étaient causaux du phénotype AMMF.

Nous avons identifié deux variants homozygotes dans le gène ***CFAP65*** chez deux patients de la cohorte : c.3047T>G (p.Leu1016Arg) et c.645G>A. Nous avons alors collaboré avec une équipe Chinoise qui avait identifié des variants homozygotes de *CFAP65* chez des individus de quatre familles consanguines ainsi que des mutations hétérozygotes composites chez deux individus non apparentés parmi une cohorte de 88 patients atteints d'AMMF (W. Li et al., 2020). Cette équipe a également produit une souris KO pour ce gène présentant le même phénotype que les patients. Ceci confirme que les mutations bialléliques dans le gène *CFAP65* induisent un phénotype d'AMMF.

En 2020, nous avons identifié un variant homozygote *frameshift* dans le gène ***DNAH8*** chez un patient de la cohorte. Nous nous sommes associés à une équipe Chinoise qui avait également identifié des variants bialléliques de ce gène chez deux patients parmi une cohorte de 90 patients (C. Liu et al., 2020b). L'analyse par microscopie électronique à transmission a permis de montrer une ultrastructure flagellaire aberrante. Les souris KO présentaient un phénotype d'AMMF et étaient infertiles. Cette étude a permis de mettre en évidence que *DNAH8* était essentielle à la formation du flagelle et que les variants bialléliques de *DNAH8* étaient causales des AMMF.

Chez 6 patients non apparentés de la cohorte, nous avons identifié un variant délétère homozygote dans le gène ***MAATS1*** codant pour la protéine CFAP91 (Martinez et al., 2020). Des analyses par microscopie électronique à transmission et d'immunomarquage ont permis de confirmer que CFAP91 était un partenaire de CFAP251. L'utilisation du modèle *Trypanosoma brucei* a permis de mettre en évidence que la perte de fonction de CFAP91 affectait le battement flagellaire de la même façon que chez l'homme. De cette façon cette étude a permis de mettre en évidence que les variants bialléliques dans ce gène étaient

responsable du phénotype d'AMMF et que CFAP91 était une protéine essentielle pour la structure et la fonction du flagelle spermatique.

En 2021, chez deux patients non apparentés de la cohorte, nous avons identifié un variant homozygote faux-sens adjacent au site donneur consensus d'épissage dans le gène **IFT74** (Lorès et al., 2021). Le variant identifié affecte l'épissage et induit la production de deux protéines anormales. *IFT74* code pour un composant essentiel de la machinerie du transport intra-flagellaire permettant la formation et le maintien des cils et des flagelles. Cette étude montre que les mutations dans ce gène peuvent induire une infertilité masculine due à une formation du flagelle anormale et confirme l'importance de la machinerie du transport intra-flagellaire pour l'assemblage et l'élongation du flagelle spermatique.

Chez un patient de la cohorte, nous avons identifié un individu porteur d'un variant homozygote *frameshift* dans le gène **CFAP206** (Shen et al., 2021). Les souris KO pour l'orthologue murin de ce gène présentaient une infertilité due à des défauts fonctionnels, structuraux et ultrastructuraux du flagelle spermatique. Cette étude a permis de mettre en évidence que *CFAP206* est indispensable pour la structure et la fonction du flagelle et que les mutations bialléliques dans ce gène provoquent une infertilité masculine.

Chez un patient de la cohorte, nous avons identifié un variant homozygote d'épissage dans le gène **CFAP61** (S. Liu et al., 2021). CFAP61 est composant du CSC (*calmodulin and radial spoke associated complex*) des cils et flagelles. Les souris KO pour ce gène, produites et phénotypées par une équipe Chinoise, présentaient le même phénotype que le patient et des défauts ultrastructuraux du flagelle. Cette étude a permis de montrer l'importance de *CFAP61* dans la stabilisation de l'axonème et son implication dans l'infertilité masculine.

Chez un patient de la cohorte, nous avons identifié un variant homozygote *frameshift* dans le gène **CCDC34** (Cong et al., 2021). Nous nous sommes associés à une équipe Chinoise qui avait également identifié un variant homozygote *frameshift* dans ce gène chez un patient parmi une cohorte de 100 individus. L'analyse de l'ultrastructure des flagelles spermatiques a montré une désorganisation de l'axonème. Les souris KO pour ce gène étaient infertiles et présentaient le même phénotype que les patients. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que *CCDC34* était nécessaire à la formation du flagelle spermatique et que les

mutations bialléliques délétères de ce gène causait une infertilité masculine associée à une OAT.

En 2023, chez 3 patients non apparentés de la cohorte, nous avons identifié un variant homozygote délétère **DNHD1** (Martinez et al., 2023, p. 1). L'analyse de l'ultrastructure du flagelle des spermatozoïdes d'un patient a montré une désorganisation complète avec une absence de la paire centrale et des défauts dans la pièce intermédiaire et un manchon mitochondrial anormal. Cette étude confirme l'importance de **DNHD1** dans la fonction et l'intégrité de la structure flagellaire et met en évidence son implication dans le phénotype des AMMF.

Au total notre cohorte AMMF s'élève désormais à 192 patients, et pour le moment une cause génétique a été identifiée et validée chez 92 patients de la cohorte soit un rendement diagnostique de 47,9%.

Au-delà de mon implication dans l'analyse génétique de la cohorte, j'ai participé à l'obtention de souris hétérozygotes pour quatre gènes différents (*Cfap43*, *Cfap44*, *Ccdc146* et *Armc2*) afin d'étudier l'hypothèse de transmission oligogénique des anomalies spermatiques chez la souris (Martinez et al., 2022a) (détaillé dans la discussion générale, partie 3).

J'ai également participé à deux études sur le phénotype AMMF dans des lignées de souris KO en association avec des équipes chinoises. Dans ces deux études j'ai analysé l'ultrastructure des spermatozoïdes des souris par microscopie électronique à transmission. La première est une étude permettant de déterminer la fonction du gène **IFT81** (Qu et al., 2020). Les souris mâles KO homozygotes étaient infertiles et présentaient une oligoasthénotérazoospermie (OAT). L'axonème et les structures para-axonémales des flagelles spermatiques de ces souris étaient complètement désorganisés. Cette étude a permis de montrer qu'IFT81 était un composant important de la machinerie du transport intraflagellaire dans la spermatogenèse permettant l'assemblage et l'élongation du flagelle. Son absence est ainsi associée à une formation anormale du flagelle et à une infertilité. La seconde étude concerne la caractérisation du rôle de **Lztfl1** dans la fertilité masculine chez la souris (Huang et al., 2021, p. 1). LZTFL1 est une protéine associée à une protéine du transport intraflagellaire exprimée majoritairement dans le testicule durant la spermiogenèse. LZTFL1 est présente dans le flagelle en développement. Les souris KO pour ce gène étaient subfertiles avec une baisse de

la motilité spermatique et un fort taux d'asthéo-tératozoospermie. Une baisse significative de l'expression de la protéine IFT27 a été observée chez ces souris. Ces résultats suggèrent un rôle important de LZTFL1 dans la spermatogenèse et la fertilité masculine chez la souris.

J'ai également travaillé sur le phénotype de macrozoospermie avec l'analyse du séquençage de l'exome d'une cohorte de 29 patients macrozoospermes sans variant d'*AURKC* identifié. C'est ainsi que nous avons identifié une cause génétique chez deux patients porteurs de variants homozygotes délétères dans les gènes **ZMYND15** (Kherraf et al., 2022b) et **NUP210L** (Arafah et al., 2021). Ces études sont détaillées en introduction dans la section macrozoospermie (Chapitre II ; IV ; 3 ; e.). De plus, nous avons également identifié une cause génétique chez trois autres patients de la cohorte porteurs de variants homozygotes délétères dans les gènes **MEIKIN**, **ADAD2** et **MDC1** (Coudert et al., 2023). A notre connaissance, c'est la première fois que *MEIKIN* était rapporté comme causal de ce phénotype chez l'homme, tandis qu'*ADAD2* a été rapporté chez un patient azoosperme (Krausz et al., 2020) et *MDC1* (Oud et al., 2021) chez un patient infertile avec des défauts de la motilité spermatique. Dans cette étude, j'ai également encadré le travail de Alicia Coudert, alors interne dans le service, sur l'établissement d'une corrélation génotype-phénotype afin d'établir un algorithme pour optimiser le diagnostic génétique des patients macrozoospermes (Coudert et al., 2023).

Par ailleurs, j'ai été impliquée dans l'analyse du séquençage exomique d'une cohorte de 69 patients infertiles présentant une globozoospermie. Nous avons ainsi pu identifier un variant homozygote d'épissage dans le gène **SPATA20** (Martinez et al., 2022b) chez un patient non consanguin de la cohorte. Cette étude est décrite en introduction dans le Chapitre II ; 3 ; b. Dans ce contexte de globozoospermie, j'ai aussi encadré le travail de Tristan Celse, alors interne dans le service, dans le cadre d'une étude sur l'implication de *DPY19L2* et d'autres gènes candidats au sein d'une cohorte de 73 patients globozoospermes. Nous avons ainsi étudié la corrélation génotype-phénotype dans le but de proposer une amélioration de la stratégie diagnostique de routine afin d'améliorer la prise en charge des patients (Celse et al., 2020).

Enfin, mon implication dans l'analyse du séquençage de l'exome des différentes cohortes de patients que nous avons établi m'a permis d'être associée à une étude sur les défauts de maturation ovocytaire grâce à l'identification d'un variant homozygote délétère dans le gène

ZP1 (Loeuillet et al., 2022). J'ai également été associée à une étude sur l'implication de **KHDC3L** dans les fausses couches à répétition et les moles hydatiformes en réalisant l'analyse histologique du conceptus (Fatemi et al., 2021).

Partie 3 : Discussion Générale

Problématique de l'identification de nouveaux gènes candidats

Grâce aux avancées récentes en matière de séquençage à haut débit et en particulier au séquençage exomique, un nombre exponentiel de nouveaux variants et de gènes candidats impliqués dans un large panel de maladies rares héréditaires et de susceptibilité au cancer ont été identifiés (Lightbody et al., 2019). Le domaine de l'infertilité masculine a également bénéficié de ces avancées, et ces dernières années ont vu l'identification et la caractérisation de nombreux gènes impliqués dans l'infertilité et en particulier dans les troubles sévères de la spermatogénèse (Capalbo et al., 2021). En effet, la spermatogénèse est un processus complexe de réorganisation cellulaire qui conduit à la production de la cellule la plus différenciée chez l'homme, à savoir le spermatozoïde. Contrairement aux gènes communs utilisés par toutes les cellules, la spermatogénèse requiert l'expression de plus de 2400 gènes, ce qui représente plus de 10 % de tous les gènes humains. Cela signifie que la spermatogénèse est particulièrement vulnérable aux mutations génétiques, qui sont une cause importante d'infertilité masculine.

Aujourd'hui, le séquençage de l'exome entier est l'approche de première intention la plus utilisée pour l'identification de nouveaux gènes du fait de son coût et du temps d'analyse réduit. En effet, cette technique permet de limiter le séquençage aux régions codantes qui représentent 1,5% du génome humain mais qui contiennent 85% des variations pathogéniques. De plus, ce séquençage permet aussi la capture des régions non codantes adjacentes telles que les régions d'épissage (+/- 1-50 pb à distance des exons) qui contiennent entre autres les sites consensus donneurs et accepteurs d'épissage et les régions UTR (« *Untranslated Regions* ») qui permettent la régulation de l'expression des ARNm dans la cellule.

Ces dernières années, des études familiales ou de cohortes ont montré la pertinence de l'utilisation du séquençage exomique pour l'identification de gènes causaux d'infertilité masculine. Dans le cas des ANO par exemple, la découverte de nouvelles formes monogéniques est régulièrement rapportée dans la littérature et le nombre de gènes candidats est en constante augmentation (Kherraf et al., 2018b; Krausz et al., 2020; Riera-Escamilla et al., 2019). Au cours de ma thèse, des mutations pathogéniques dans 6 nouveaux gènes ont été identifiés par WES chez des sujets de notre cohorte. Ainsi, une cause génétique

a été identifiée chez 22 patients parmi 96, représentant un rendement diagnostique de 23% (Kherraf et al., 2022a). D'autres études ont également analysé de grandes cohortes de patients présentant une ANO et identifié des gènes candidats, telle que l'étude de Krausz *et al*, en 2020 qui a identifié 5 nouveaux gènes candidats et des variations probablement pathogénique. Ils ont ainsi pu identifier une cause génétique chez 23 patients sur 147, soit un rendement diagnostique de 16% (Krausz et al., 2020). En 2022 également, une étude a identifié un défaut génétique chez 7 patients consanguins et chez 3 patients non consanguins parmi un groupe de 19 patients présentant un arrêt méiotique de la spermatogenèse. Cette étude a également permis d'identifier des variants dans 4 nouveaux gènes dont l'implication n'était pas connue avant chez l'homme (Ghieh et al., 2022).

Ces résultats montrent l'importance de l'utilisation du séquençage à haut débit dans l'identification de variants et de nouveaux gènes candidats causaux de l'infertilité masculine. La réalisation du WES dans le cadre d'un diagnostic de routine améliorera considérablement le rendement diagnostique et le bilan clinique des couples infertiles et pourrait être utilisée comme analyse génétique de première intention pour l'infertilité masculine dans un avenir proche (Ghieh et al., 2022). Pour les hommes présentant une ANO il faut également prévoir des lignes directrices claires concernant le traitement proposé suite au résultat du diagnostic moléculaire (Kherraf et al., 2022a). Cela afin de faire du WES un outil indispensable pour établir un diagnostic précis et optimiser l'orientation des patients présentant une ANO dans le parcours d'AMP.

Difficulté de l'interprétation clinique des nouveaux variants génétiques

Une augmentation des problématiques de l'interprétation des variants a pu être observée avec la mise en place du HTS à visée diagnostique. En effet, la difficulté repose sur le nombre de variants identifiés par patient et sur le tri de ces variants afin de sélectionner le variant causal. Pour homogénéiser et standardiser l'interprétation des variants l'ACMG (« *American College of Medical Genetics and Genomics* ») et l'ESHG (« *European Society of Human Genetics* ») ont mis au point des recommandations pour l'interprétation des variants identifiés en pratique clinique. Celles-ci ont été adaptées par l'ACGS (« *Association for Clinical Genomic*

Science ») pour devenir le standard pour l'interprétation des données du HTS. Les variants sont alors classés en 5 classes : classe 1 : bénin, classe 2 : probablement bénin, classe 3 : signification incertaine, classe 4 : probablement pathogène, classe 5 : pathogène. Cette classification est détaillée en **annexe 1 (Table supplémentaire 1)**.

L'interprétation prend en compte les données épidémiologiques, les critères cliniques, les données de ségrégation familiale, les données bio-informatiques et les données fonctionnelles. Le recours à des bases de données est alors indispensable. L'analyse de la littérature *via* les bases de données PubMed et OMIM par exemple permettent d'aider à l'interprétation d'un variant. Par ailleurs, l'utilisation de bases de données de population telle que gnomAD (« *Genome Aggregation Database* ») afin de déterminer la fréquence allélique du variant dans la population est nécessaire. En effet, pour les maladies à transmission autosomique récessive par exemple, la fréquence allélique doit être inférieure à 1% pour pouvoir considérer le variant comme pathogénique (sauf exceptions). En effet, dans le cas des variants liés au chromosome X, c'est-à-dire hémizygote, seuls les variants très rares avec une fréquence allélique mineure < 0.01% pourraient être retenus (Riera-Escamilla et al., 2022). Selon la loi de Hardy-Weinberg, un calcul peut être utilisé pour adapter le seuil en fonction du gène et des données de fréquences alléliques disponibles. En plus de la fréquence dans la population générale, il est aussi important d'évaluer la fréquence allélique dans les sous populations. En effet, si un variant a une fréquence élevée dans une sous population alors qu'il a une fréquence allélique très basse dans les autres sous populations, ce variant peut être considéré comme bénin suivant le cas. Il est également important de rapporter la présence du variant étudié à l'état homozygote dans la population générale. De plus, des bases de données de patients telles que ClinVar, Decipher, Varsome ou encore HGMD sont disponibles et nécessaires pour l'interprétation d'un variant afin de s'appuyer sur la description du variant d'intérêt chez d'autres patients. D'autres données sont indispensables à l'interprétation d'un variant, en particulier les données prédictives et computationnelles de l'impact d'un variant. Pour les variants « faux-sens », des logiciels de prédiction de pathogénicité sont utilisés pour estimer l'impact du variant sur la fonction protéique tels que SIFT, Polyphen et CADD par exemple. Il existe également des logiciels de prédiction de l'effet sur l'épissage tels que Human Splicing Finder et SpliceAI.

Le tri et l'interprétation de nouveaux variants est indispensable pour l'identification de variants causaux et gènes candidats de l'infertilité masculine afin d'augmenter le rendement diagnostique et améliorer la prise en charge des patients. Cependant, il n'existe pas de consensus sur l'interprétation des variants, c'est pourquoi une coordination internationale serait nécessaire afin de disposer de directives uniformes pour le diagnostic moléculaire et l'interprétation des variants identifiés.

Quid des données incidentes ?

Par ailleurs, les filtres bioinformatiques mis en place ne garantissent pas l'absence de données non sollicitées. Des précautions doivent être prises pour minimiser le risque de découverte de ces données dites incidentes. Ces données concernent l'identification fortuite de variants impliqués dans un phénotype différent de celui pour lequel le patient consulte. Aujourd'hui la question de savoir s'il faut informer ou non le patient de ces données fait débat. L'ACMG a publié des lignes directrices afin de reporter les variants pathogéniques et probablement pathogéniques dit actionnables, c'est-à-dire sur lesquels il est possible d'agir pour atténuer l'apparition ou la gravité de la pathologie liée (Miller et al., 2022). Ils recommandent de signaler les variants dans une liste de gènes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/>) et d'alerter les patients sur la possibilité de la découverte de ces données incidentes. De fait, il est nécessaire que les patients soient informés de la possibilité de l'identification de ces variants préalablement à l'analyse. Depuis 2018, cette information figure dans nos formulaires de consentement (**Annexe 3**). Cependant, en l'absence de lignes directrices internationales, détaillées et adaptées à chaque cas, la déclaration des données incidentes est fortement débattue. En effet, il existe des différences importantes dans l'identification et la déclaration des données incidentes. Ceci indique qu'il est nécessaire d'élaborer des directives plus étendues, spécifiques à une maladie ou à un groupe ethnique (Elfatih et al., 2021).

Validation fonctionnelle des nouveaux variants et gènes candidats

Bien que le séquençage de l'exome soit considéré comme un outil robuste pour étudier la composante génétique de l'infertilité masculine, de nombreux variants délétères dans des gènes dont la fonction biologique n'est pas encore connue sont catégorisés comme des

variants de signification incertaine (VUS : « *Variant of Unknown Significance* »). La validation fonctionnelle est donc indispensable pour confirmer l'implication d'un gène dans le phénotype étudié mais aussi pour évaluer l'impact des variants identifiés dans ce gène. Les études fonctionnelles sont donc un outil important pour valider la pathogénicité des variants identifiés. Toutefois, elles ne sont pas toutes suffisantes pour prédire l'impact d'un variant sur la fonction d'un gène. Pour évaluer la pertinence d'un test fonctionnel, il faut déterminer dans quelle mesure le test fonctionnel est représentatif de l'environnement biologique. Par exemple, les tests qui évaluent l'impact des variants au niveau de l'ARNm ou de l'ADNc tels que les analyses par RT-PCR et les analyses par minigène peuvent être particulièrement intéressantes pour évaluer l'effet des variants d'épissage et dans les UTR. Afin d'étudier la fonction d'un gène, il est également possible d'avoir recours à des systèmes d'expression hétérologue en transfectant un plasmide exprimant un gène d'intérêt dans des cellules en culture HEK-293 ou HeLa par exemple. Des tests évaluant l'impact d'un variant sur la protéine sont également possibles, tels que les analyses par immunofluorescences ou encore la technique de « Western-Blot ». Cependant, les anticorps commerciaux ne sont pas toujours spécifiques ou disponibles et il est difficile de produire un nouvel anticorps sensible et spécifique pour chaque nouveau gène. Une difficulté supplémentaire réside dans la disponibilité du matériel biologique nécessaire pour les analyses par RT-PCR ou par immunofluorescence par exemple. En effet, il est parfois difficile d'avoir accès aux échantillons de sperme des patients pour mener ces analyses.

Enfin, la validation fonctionnelle *via* l'utilisation de modèles cellulaires ou animaux est indispensable afin de pouvoir confirmer la relation entre génotype et phénotype et étudier la physiopathologie associée.

L'utilisation des modèles murins

Parmi les modèles animaux, les modèles murins sont les plus utilisés en raison de l'homologie génétique entre l'homme et la souris et de la similarité des processus physiologiques et moléculaires et également du fait de sa reproduction rapide et facile. Les premières souris génétiquement modifiées étaient créées en introduisant des mutations par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ESC : « *Embryonic Stem Cells* ») et par injection de ces cellules souches modifiées dans des blastocystes. Cependant, il faut à peu près

un an pour obtenir des animaux mutés à l'endroit choisi du génome puisque la fréquence d'évènements voulu est très rare (< 0,01%). Après cela, l'utilisation des nucléases spécifiques comme les ZFN (« *Zinc Finger Nuclease* ») et ensuite les TALEN (« *transcriptional activator-like effector nucleases* ») ont permis l'édition du génome sans utilisation des ESC. Cependant l'ingénierie des nucléases est coûteuse et difficile et la fréquence de recombinaison reste variable. C'est ainsi que la technique CRISPR/ Cas9 (« *clustered regularly interspersed short palindromic repeats* » / « *CRISPR-associated protein 9* ») s'est développée et son utilisation s'est rapidement généralisée.

Le système CRISPR/Cas9

Grâce à la technologie CRISPR/Cas9, l'édition de gènes chez la souris est simple, rapide et efficace et permet la génération de plusieurs lignées KO en quelques mois. L'étude de Kherraf *et al.*, en 2018 (Kherraf *et al.*, 2018b) a permis de montrer l'intérêt de la production de modèles murins par CRISPR/Cas9 dans un contexte de validation fonctionnelle de gènes candidats causaux du phénotype AMMF. En effet, dans cette étude, nous avons identifié par WES des mutations homozygotes dans des gènes candidats chez 63% d'une cohorte de 78 patients avec un phénotype AMMF sévère. Ainsi nous avons décidé de produire des lignées de souris « *knock-out* » (KO) et « *knock-in* » (KI). Les lignées KO sont des lignées où le gène candidat est délété ou désactivé. En effet, le système CRISPR/Cas9 permet de produire des insertions-délétions « *frameshift* » de petites ou grandes tailles pour introduire un codon stop prématuré. Les lignées KI sont des lignées avec une insertion d'une mutation précise dans le gène d'intérêt.

Au cours de nos récentes études, nous avons optimisé la stratégie et ainsi utilisé deux gRNAs distants d'environ 100pb et ciblant un seul exon dans le gène d'intérêt. Ces gRNAs sont injectés en même temps que la Cas9 au moment de l'ICSI. Seuls les individus de la génération F2 sont ensuite étudiés. Cette injection plus précoce et l'étude des individus homozygote de la génération F2 a permis de diminuer le taux de mosaïcisme. De plus, l'injection de 2 gRNAs a permis d'augmenter l'efficacité de la technique en induisant de grandes délétions « *frameshift* » dès la génération F0 permettant ainsi d'établir une lignée KO après un seul cycle d'injection (Cazin *et al.*, 2021b).

C'est ainsi que le développement du système CRISPR/Cas9 a rendu la génération de modèles animaux transgéniques plus facile et plus rapide et est un outil puissant pour l'étude de la fonction des gènes candidats et leur rôle dans l'organisme. L'utilisation combinée du WES pour identifier les gènes candidats et du système CRISPR/Cas9 pour générer des souris KO est une stratégie très prometteuse pour améliorer le rendement du diagnostic génétique et affiner l'interprétation des variants trouvés dans les nouveaux gènes candidats de l'infertilité masculine (Coutton et al., 2019, p. 2; Kherraf et al., 2017, p. 2). Les résultats de notre étude de 2021 (Cazin et al., 2021b) démontrent l'importance de la validation fonctionnelle de variants homozygotes perte de fonction identifiés par WES dans des gènes spécifiquement exprimés dans le testicule chez des patients infertiles. En effet, les souris KO pour les orthologues de ces gènes présentaient des paramètres spermatiques normaux et étaient fertiles. Bien que ces résultats soient à prendre avec précaution, le report de variants et gènes non associés à l'infertilité masculine est important et nécessaire pour éviter à d'autres équipes de dupliquer ces recherches.

Ainsi, l'utilisation du modèle murin, mais également d'autres modèles animaux, en recherche présente des limites. En effet, la création et l'entretien des modèles murins peuvent être coûteux et les résultats obtenus ne sont pas toujours directement applicables à l'homme. Les différences anatomiques, physiologiques et génétiques entre les souris et les humains peuvent limiter la validité et la pertinence des résultats de recherche chez les souris. En effet, même si les souris et les humains partagent une grande partie de leur génome, ils ont des régulations et expressions de gènes différentes ainsi que des fonctions spécifiques qui peuvent influencer la fonction et l'importance d'un gène donné. De plus, les modèles murins ne reproduisent pas toujours les caractéristiques de la maladie humaine explorée, ce qui peut limiter la généralisation des résultats obtenus chez les souris aux humains. En outre, certains gènes ne peuvent pas être étudiés avec ce modèle du fait d'une faible homologie de séquence avec l'humain par exemple. Par conséquent, il est important de tenir compte de ces différences lors de l'interprétation des résultats de recherche obtenus à partir de modèles murins. Enfin, l'utilisation de ce type de modèle peut également présenter des contraintes éthiques.

D'autres modèles existent et peuvent être particulièrement intéressants dans la recherche sur la génétique de l'infertilité masculine. Parmi ces modèles, on peut retrouver notamment

différents modèles ciliés pour l'exploration des térazoospermies monomorphes tels que *Chlamydomonas*, *Tetrahymena* (Auguste et al., 2018), *Trypanosoma* (Lorès et al., 2019, p. 29; Martinez et al., 2020). On retrouve également d'autres modèles de mammifères (primates non humains, rats, lapins...), des modèles d'insectes (*Drosophila*) et d'autres organismes plus complexes (*Danio rerio*, *Xenopus*...). L'utilisation d'autres modèles de mammifères, même s'ils peuvent s'avérer nécessaires et plus pertinents que le modèle murin, sont souvent plus coûteux et contraignants d'un point de vue de la réglementation éthique. Les avantages de l'utilisation des modèles cellulaires et des modèles moins complexes que les mammifères incluent leur simplicité, leur reproduction rapide et leur capacité à être cultivés facilement en laboratoire. Ils peuvent aussi être facilement manipulés génétiquement ce qui permet d'apporter des réponses spécifiques sur certains processus cellulaires. Cependant, il y a aussi des limites à l'utilisation de ces modèles. En effet, les processus de reproduction de ces organismes diffèrent de ceux des organismes plus complexes tels que les mammifères. Par conséquent, les résultats obtenus à partir de ces modèles ne peuvent pas directement être applicables à l'homme.

Perspectives : optimisation du rendement du diagnostic génétique

Malgré l'identification de nouveaux gènes candidats par séquençage haut débit et leur validation fonctionnelle, de nombreux patients restent sans diagnostic génétique. Afin de d'identifier de nouveaux gènes et variants responsables d'infertilité masculine et améliorer le rendement diagnostique, des techniques de séquençage plus puissantes que le WES peuvent être envisagées tel que le séquençage du génome entier. Par ailleurs, l'absence de diagnostic chez certains patients pourrait aussi s'expliquer par une hypothèse de transmission monogénique mendélienne inexacte.

Le séquençage du génome entier

Chez certains patients, l'absence de diagnostic génétique peut probablement s'expliquer par les limites analytiques de la technique de séquençage exomique. Bien que l'efficacité du WES a été démontrée pour détecter les variants rares dans les exons et les sites d'épissage, le séquençage du génome entier (*WGS, Whole Genome Sequencing*) pourrait fournir un diagnostic plus puissant et plus précis (Ghieh et al., 2021). En effet, le WES ne permet pas de

détecter tous les variants potentiellement pathogènes tels que les variants introniques profonds, les variations du nombre de copies ou les réarrangements de structures plus complexes. Le WGS permet une couverture étendue et équilibrée et présente une meilleure résolution pour détecter les variants simples tels que les SNV (« *Single Nucleotide Variant* ») et les petites insertions et délétions. De plus, cette technique permet également de détecter plus efficacement les réarrangements génomiques plus complexes de type CNV (« *Copy Number Variant* ») et SV (« *Structural Variant* »). Ceci permettrait d'améliorer le rendement du diagnostic génétique de l'infertilité masculine puisque de nombreux patients pourraient présenter des variants pathogéniques dans des régions non codantes, introniques profondes et intergéniques non explorées par WES (Malcher et al., 2022).

L'oligogénisme

Jusqu'à présent les causes génétiques de l'infertilité masculine impliquaient surtout des mutations autosomiques à transmission récessive (homozygote) ou des mutations liées aux chromosomes de déterminisme sexuel (hémizygote). Cependant cette hypothèse de transmission monogénique mendélienne peut être inexacte. En effet, il est possible que plusieurs gènes fonctionnellement reliés soient mutés à l'état hétérozygote simultanément entraînant ainsi une accumulation de la charge mutationnelle et des altérations de la spermatogenèse. C'est ainsi qu'en 2022, nous avons élaboré une lignée de souris hétérozygote pour 4 gènes différents connus pour être associés au phénotype MMAF en leur absence (*Cfap43*, *Cfap44*, *Armc2*, *Ccdc146*). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'accumulation de la charge mutationnelle entraîne un effet délétère significatif et la production de spermatozoïdes malformés et peu mobiles (Martinez et al., 2022a). Ces recherches montrent que l'infertilité peut être causée aussi bien par des mutations homozygotes monogéniques que par des mutations hétérozygotes oligogéniques. Ce constat pourrait améliorer le diagnostic de l'infertilité masculine et développer par la suite des thérapies novatrices afin de pallier au fait qu'aujourd'hui, un couple sur deux sort du parcours d'AMP sans enfant.

Vers une approche thérapeutique ciblée dans les infertilités masculines ?

Lorsque cela est possible, les patients infertiles peuvent avoir recours à une injection de leurs spermatozoïdes directement dans le cytoplasme de l'ovocyte de leur conjointe (ICSI). En cas d'ANO, une biopsie testiculaire peut être envisagée sous certaines conditions afin de prélever des spermatozoïdes en vue d'une ICSI. Dans certains cas, la prise en charge par ICSI n'est pas réalisable tels que dans les ANO causées par les arrêts de maturation (Corona et al., 2019) ou la macrozoospermie causée par des anomalies du gène *AURKC* par exemple (Beurois et al., 2020). Ces hommes ne peuvent donc pas parvenir à une conception intraconjugale. La compréhension de l'étiologie génétique de l'infertilité masculine pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour restaurer la spermatogenèse et rétablir une fertilité chez les patients.

I. La thérapie par correction génique *via* le système CRISPR/Cas9

La thérapie génique consiste à permettre une expression normale d'un gène muté. Dans le cadre de l'infertilité masculine il faut prendre en considération les implications éthiques et réglementaires que cela représente. En effet, la correction des mutations génomiques des cellules de la lignée germinale humaine pour des raisons thérapeutiques est actuellement interdite en France, particulièrement en raison des dérives que cela peut entraîner. Ces dernières années, la thérapie génique permettant de restaurer une spermatogenèse fonctionnelle et une fertilité spontanée, s'est développée dans le modèle murin (Roshandel et al., 2022). Cela a été possible grâce à la modification et l'autogreffe de cellules souches spermatogoniales. Cela consiste à extraire des spermatogonies, de les cultiver *in vitro* et de les modifier grâce à la technologie CRISPR/Cas9 pour ensuite les transférer en les injectant de façon rétrograde dans le *rete testis* ou le canal déférent (**Figure 40**). Les spermatogonies vont alors coloniser l'épithélium séminifère et permettre ainsi la production de spermatozoïdes fonctionnels aboutissant ainsi à une descendance. Cependant l'absence de contrôle de l'insertion de matériel génétique dans le génome présente un risque. En effet, cela peut provoquer un mosaïcisme embryonnaire et des effets « hors-cible » imprévisibles potentiellement dangereux. Bien que cela évolue depuis quelques années et que des

protéines Cas9 plus spécifiques limitant l'effet « hors-cible » ont été développées, des efforts sont encore nécessaires pour envisager une application chez l'homme.

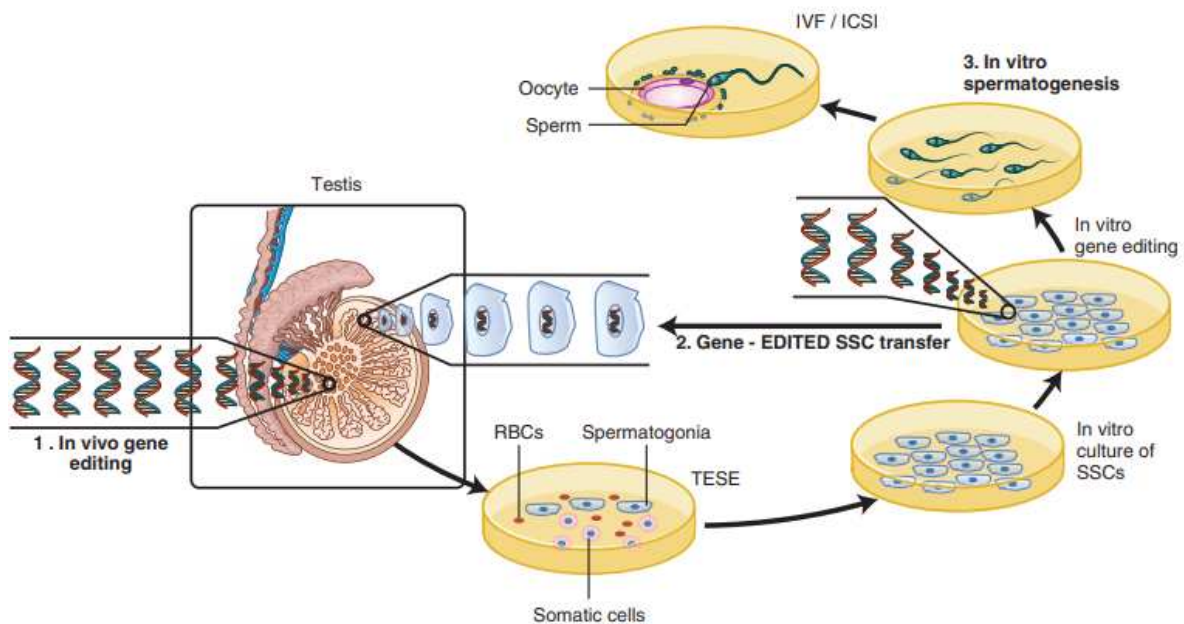


Figure 40. Les différentes voies d'édition du génome dans le cadre du traitement de l'infertilité masculine. (SSC: spermatogonial stem cells.) D'après (Carrell et al., 2020)

II. La thérapie de substitution

Il existe d'autres possibilités thérapeutiques ne modifiant pas le patrimoine génétique des cellules germinales telles que l'administration intracellulaire directe d'ARNm et de protéines recombinantes à l'aide de nanoparticules ou de vecteurs viraux ou non et ceci sans risque de provoquer des mutations génétiques. Pour s'appliquer à l'infertilité masculine humaine, il faut trouver des molécules capables de cibler spécifiquement le testicule et en particulier les cellules somatiques de Sertoli ou les cellules germinales afin que le système ne s'exprime que transitoirement dans les cellules germinales. Le système doit être capable de diffuser à travers la barrière hémato-testiculaire et avoir une concentration suffisante pour corriger le déficit avec la moindre toxicité. De plus le système doit être non intégratif, c'est-à-dire ne pas s'intégrer au génome. C'est pourquoi l'utilisation de liposomes, vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques contenant un compartiment aqueux, n'est pas recommandée dans les cellules germinales en raison du risque élevé d'intégration génomique (Miao and Zhang, 2011). De même, l'utilisation de nanoparticules métalliques considérées comme

biocompatibles est controversée compte tenu des possibles effets toxiques qu'elles présentent (Vassal et al., 2021). Par conséquent, les nanoparticules à base de polymères cationiques représentent une classe importante de vecteurs non viraux qui répondent à la plupart des exigences. En 2020, une équipe a rétabli la prolifération des cellules spermatogoniales et l'intégrité de la BHT et ainsi la fertilité chez des souris azoospermes KO pour le gène *Pin1*. Pour cela ils ont utilisé un complexe lipidique cationique encapsulé dans des nanoparticules de fibroïne pour délivrer la protéine PIN1 recombinante dans les cellules testiculaires des souris KO (Kim et al., 2020). Également, l'utilisation de vecteurs viraux non intégratifs semble être une option plus sûre tels que les virus adénoassociés (AAV) présentant une faible toxicité. Cette approche fait suite à l'utilisation de rétrovirus et lentivirus présentant des risques d'intégration dans le génome et aux adénovirus, non intégratifs mais toxiques pour les cellules souches spermatogoniales. Cependant, la limite de l'utilisation des AAV est liée à la petite taille de l'insert (~4,5 kb).

III. Utilisation des cellules souches pluripotentes induites (iPS)

En 2006, Takahashi et Yamanaka ont mis au point une méthode qui permet l'induction de cellules souches pluripotentes (iPS : « *induced Pluripotent Stem cells* ») à partir de cellules somatiques chez l'homme et la souris (Takahashi et al., 2007). Ces cellules peuvent se différencier en tous les types cellulaires et ont donc des applications prometteuses en médecine régénérative. Dans le cadre d'une absence de cellules germinales dans les testicules, dont les cellules souches, lié à un SCOS par exemple, cette technique pourrait être d'une grande utilité pour produire et transplanter des spermatogonies afin de rétablir une spermatogenèse fonctionnelle. Cependant il n'a pas encore été possible de reproduire les conditions permettant la réalisation d'une spermatogenèse humaine complète.

Conclusion

Dans l'ensemble, cette thèse permet de mettre en lumière la complexité de la composante génétique de l'infertilité masculine et souligne la difficulté d'émettre un diagnostic génétique pour tous les patients. Grâce à l'utilisation des techniques de séquençage haut débit, comme le séquençage de l'exome entier, l'identification de nouveaux gènes candidats est devenue plus rapide et accessible et j'ai contribué à l'identification et à la caractérisation de 30 gènes

associés à différents phénotypes d'infertilité. En outre, le taux de diagnostic pour certaines indications a connu une nette amélioration. Toutefois, la difficulté repose dans la quantité importante de variants identifiés chez chaque patient et la sélection d'un variant causal. Pour cela, la classification des variants doit se faire selon des recommandations claires et précises. Par conséquent, la validation des variants candidats et des gènes associés aux phénotypes explorés représente un défi majeur à relever. À terme, ces avancées scientifiques devraient permettre une meilleure prise en charge des patients infertiles. Ceux-ci pourraient éventuellement bénéficier de thérapies leur permettant de recouvrir une spermatogénèse fonctionnelle.

Annexes

Annexe 1 : Tables supplémentaires

Table supplémentaire 1. Les critères de classification des variants par l'ACMG (Richards et al., 2015)

Arguments en faveur de la pathogénicité	
Argument de pathogénicité	Catégorie
Très fort	<p>PVS1 Variant ayant un effet nul prédit (non-sens ; décalage du cadre de lecture ; site canonique d'épissage : -2, -1, +1, +2 ; codon d'initiation de la traduction ; délétion d'un ou plusieurs exons hors phase ; délétion d'un ou plusieurs exons en phase mais emportant un domaine fonctionnel) dans un gène où la perte de fonction est le mécanisme pathogène connu.</p>
Fort	<p>PS1 Variant à l'origine du même changement d'acide aminé qu'un variant pathogène connu.</p> <p>PS2 Variant de novo chez un patient sans antécédent familial, avec confirmation de la paternité ET de la maternité.</p> <p>PS3 Etudes fonctionnelles in vivo ou in vitro bien établies montrant un impact délétère du variant sur le gène ou son produit.</p> <p>PS4 Prévalence du variant chez les individus atteints significativement supérieure à celle des contrôles de la même origine ethnique que les patients.</p>
Moyen	<p>PM1 Variant non tronquant situé sur un hot spot mutationnel et/ou un domaine fonctionnel critique bien établi (ex : site actif d'une enzyme) exempt de variants bénins.</p> <p>PM2 Variant absent des bases de données de populations contrôles (ou très faible fréquence si récessif) : GnomAD, ExAC, 1000 génomes.</p> <p>PM3 Variant observé en trans avec un variant pathogène distinct, si la pathologie a une transmission récessive.</p> <p>PM4 Variant affectant la longueur de la protéine : insertions/délétions en phase dans une région non-répétée ou perte du codon stop.</p> <p>PM5 Variant à l'origine d'un changement d'acide aminé différent à la même position qu'un variant faux-sens pathogène connu.</p> <p>PM6 Variant de novo sans confirmation de la paternité et de la maternité.</p>
Faible	<p>PP1 Variant qui ségrège avec la pathologie chez de multiples apparentés atteints.</p> <p>PP2 Variant faux-sens dans un gène avec un faible taux de variants faux-sens bénins et dans lequel les variants faux-sens sont un mécanisme fréquemment responsable de la pathologie.</p> <p>PP3 Effet d'un variant faux-sens prédit délétère par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés (conservation, effet sur épissage...).</p> <p>PP4 Phénotype ou histoire familiale spécifique en faveur de la pathogénicité associée au gène comprenant le variant.</p> <p>PP5 Source documentée classant ce variant comme pathogène, dans la situation où les arguments permettant de définir la pathogénicité ne sont pas disponibles pour une réévaluation indépendante.</p>

Arguments en faveur de la neutralité	
Argument de bénignité	Catégorie
Suffisant	BA1 Fréquence allélique >5% dans les bases de données de populations contrôles
Fort	<p>BS1 Fréquence allélique trop importante par rapport à la fréquence de la pathologie.</p> <p>BS2 Présence chez un individu sain d'un variant homozygote pour une maladie récessive, hétérozygote pour une maladie dominante ou hémizygote pour une maladie liée à X, si une pénétrance complète est attendue en bas âge.</p> <p>BS3 Etudes fonctionnelles bien établies montrant un impact non délétère du variant sur la fonction de la protéine ou sur l'épissage.</p> <p>BS4 Variant ne ségrégeant pas avec la pathologie chez des apparentés atteints</p>
Faible	<p>BP1 Variant faux-sens dans un gène où seuls les variants tronquants sont décrits comme associés à la pathologie</p> <p>BP2 Variant observé en trans avec un variant pathogène pour une maladie dominante à pénétrance complète, variant observé en cis avec un variant pathogène.</p> <p>BP3 Délétion/insertion en phase dans une région répétée sans fonction connue.</p> <p>BP4 Effet d'un variant faux-sens prédit bénin par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés (conservation, effet sur épissage...).</p> <p>BP5 Co-occurrence du variant avec un variant pathogène dans un autre gène impliqué dans la même pathologie</p> <p>BP6 Source documentée classant ce variant comme bénin, dans la situation où les arguments permettant de définir la pathogénicité ne sont pas disponibles pour une réévaluation indépendante. BP7 Variant synonyme sans impact prédit sur l'épissage ET pour lequel la séquence nucléotidique n'est pas très conservée.</p>
Interprétation	
<p>Classe 5 : variant pathogène</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 PVS ET \geq 1 PS OU <ul style="list-style-type: none"> \geq 2 PM OU 1 PM et 1 PP OU \geq 2 PP • \geq 2 PS • 1 PS ET \geq 3 PM OU <ul style="list-style-type: none"> 2 PM et \geq 2 PP OU 1 PM et \geq 4 PP 	<p>Classe 4 : variant probablement pathogène</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 PVS et 1 PM • 1 PS et 1-2 PM • 1 PS ET \geq 2 PP • \geq 3 PM • 2 PM et \geq 2 PP • 1 PM et \geq 4 PP
<p>Classe 3 : variant de signification incertaine Les arguments pondérés ne permettent pas de classer le variant dans une autre classe</p>	
<p>Classe 2 : variant probablement bénin</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 BS et 1 BP • \geq 2 BP 	<p>Classe 1 : variant bénin</p> <ul style="list-style-type: none"> • BA OU • \geq 2 BS

Table supplémentaire 2. Variants du gène DPY19L2 chez les patients globozoospermes

Gène	Population	Patients	Variants	Référence	
DPY19L2	15 patients non apparentés	4	Délétion homozygote	(Zhu et al., 2013)	
		1	Délétion hétérozygote		
		2	c.1532delA		
		1	c.[1679delT / 1681_1682delAC]		
		1	c.869G>A		
		1	c.989T>C		
	9 patients	5	5	Délétion homozygote	(Shang et al., 2019)
			4	c.2126+5G>A (hétérozygote)	
			4	c.1720C>T	
			4	c.1182-1184de-IATC / c.368A>T c.1182-1184de-IATCTT / c.1553-1554delAT	
	2 frères	2	Délétion du gène et c. 384dup	(Ren et al., 2020)	
	3 patients (globozoospermie totale) + 1 patient (globozoospermie partielle)	3	Délétion homozygote	(Paci et al., 2017)	
		1	Délétion hétérozygote		
	2	2	Délétion homozygote	(Morel et al., 2004) (Noveski et al., 2013)	
	24 (globozoospermie totale)	20	Délétion homozygote	(Modarres et al., 2016)	
		2	Délétion des exons 5 à 7		
	1 patient	1	Délétion homozygote	(Luo et al., 2020)	
	2 patients	2	Délétions des exons 5,6 et 15	(Liu et al., 2017)	
	149 patients infertiles (16 globozoospermes)	1	Délétion hétérozygote / c.1561del	(Yaqian Li et al., 2021)	
	1 patient (globozoospermie totale)	1	Délétion homozygote	(Y.-Z. Li et al., 2020)	
	32 (globozoospermie totale) + 2 (globozoospermie partielle)	29	?	(Kuentz et al., 2013)	
	4 frères	4	Délétion homozygote	(Koscinski et al., 2011)	
	20 (globozoospermie totale)	15	Délétion homozygote	(Harbuz et al., 2011)	
	54 patients	25	25	Délétion homozygote	(Elinati et al., 2012)
			1	Délétion hétérozygote / c.869G>A	
			1	Délétion hétérozygote / c.1033C>T	
			1	Délétion hétérozygote / c.1478C>G	
			1	Délétion hétérozygote / c.2038A>T	
			2	Délétion hétérozygote / c.1183delT	
1			Délétion hétérozygote / délétion exons 5 et 6		
1			c.892C>T		
1			c.1218+1G>A		
1			Délétions des exons 5 à 7		
3 (globozoospermie totale)	3	Délétion homozygote	(Guo et al., 2019)		
8 (globozoospermie totale)	6	Délétion homozygote	(Ghédir et al., 2019)		

14 (globozoospermie totale) + 4 (globozoospermie partielle)	11/14	Délétion homozygote	(Ghédir et al., 2016, p. 2)
	2/14	c.892C>T	
	1/14	c.1579_1580+4delAGGTAAinsTCAT	
	1/4	Délétion hétérozygote	
10 (globozoospermie totale) + 8 (globozoospermie partielle)	1	Délétion exon 11	(Faja et al., 2021, p. 19)
	1	Délétion exon 22	
	4	Délétion des exons 10,12 et 22	
34 patients	23	Délétion homozygote	(Coutton et al., 2012)
	1	Délétion hétérozygote / c.869G>A	
	1	Délétion hétérozygote / c.1024C>T	
9 patients	2	Délétion homozygote	(Chianese et al., 2015)
	1	Délétion hétérozygote / Délétion exon 7	
	1	c.494C>T (hétérozygote)	
3 patients	1	Mutation ponctuelle	(Cheung et al., 2021)
69 patients	25	Délétion homozygote	(Celse et al., 2020)
	1	Délétion hétérozygote / c.1183delT	
	1	Délétion hétérozygote / c.1840G>T	
	1	Délétion hétérozygote / c.1580+1G>A	
	2	Délétion hétérozygote / c.869G>A	
	1	Délétion hétérozygote / c.586G>C	
	1	Délétion hétérozygote / c.575A>G	
	1	Délétion hétérozygote / c.925C>A	
	1	c.153_189del	
	3	c.892C>T	
	1	c.893G>A	
1	c.1438G>A		
29 (globozoospermie totale) + 34 (globozoospermie partielle)	22/29	Délétion homozygote	(Alimohammadi et al., 2020)
	2/29	Délétion exon 7	
5 patients	3	Délétion homozygote	(Abdelhedi et al., 2019)
	2	Variants hétérozygotes composites	

Table supplémentaire 3. Gènes et variants causaux du phénotype MMAF chez l'homme et résultats d'ICSI

Gene	Nombre de patients totaux	Position variants cDNA	Position variant protéine	ICSI	Réf.
Complexes des bras de dynéine interne et externe (IDA, ODA)					
<i>DNAH1</i>	7 (/20)	c.11788-1G>A	p.Gly3930Alafs*120	2 patients, 1 grossesse clinique + 5 patients, 6 grossesses cliniques	PMID: 24360805
		c.3877G>A	p.Asp1293Asn		
		c.12796 T>C	p.4266Glnext*21		
		c.5094+1G>A	p.Leu1700Serfs72		
	4 (/9)	c.11726_11727delCT	p.Pro3909ArgfsTer33		PMID: 27573432
	5 (/12 patients)	c.8626-1G>A	-		PMID: 27798045
	1 (/38 patients Iraniens)	c.3860T>G	p.Val1287Gly		
	12 (/41)	c.4552C>T & c.11787+1G>A	p.Q1518X		PMID: 33929677
		c.11726_11727del & c.12089+1G>A	p.P3909fs*33		
		c.4552C>T & c.12287G>T	p.Q1518X & p.R4096L		
		c.7397G>A & c.12287G>A	p.R2466Q & p.R4096H		
		c.6004C>T & c.10982C>A	p.R2002C & p.S3661X		
		c.2602C>T & c.12748C>T	p.R868X & p.R4250X		
		c.5573T>C & c.11726_11727del	p.L1858P & p.P3909fs*33		
		c.11726_11727del	p.P3909fs*33		

		c.11726_11727del & c.12264_12265del	p.P3909fs*33 & p.W4089Gfs*51		
		c.4552C>T & c.9685C>T	p.Q1518X & p.R3229C		
		c.6526-1G>T & c.9850G>A	p.E3284K		
		c.5104C>T & c.11726_11727del	p.R1702X & p.P3909fs*33		
	1	c. 4670C>T & c. 8170.C>T	p. T1557M & p. R2724*		PMID: 3396865 4
	4 (/6)	c.7646_7647InsC	p.N2549Qfs*61		PMID: 3486780 8
		c.6212T>G	p.C1789Y		
	3	c.7435C>T & c.10757T>C	p.R2479X & p.F3586S		PMID: 36510862
		c.11726_11727delCT & c.12154delC	p.P3909fs & p.L4052fs		
		c.10627-3C>G & c.11726_11727delCT	p.P3909fs		
<i>DNAH2</i>	4	c.12720G > T	p.W4240C		PMID: 3396893 7
	3	c.A2116C & c.C11635T	p. K706Q & p. R3879W	2 patients, 2 grossesses cliniques	PMID: 33771466
		c.A5507G & c.G9291T	p. K1836R & p. E3097D		
		c.G4774A & c.G5771C	p. E1592K & p. R1924P		
	4 (/38)	c.9298C>T	p.R3100W	PMID: 30811583	
		c.5770C>T & c.11500C>T	p.R1924C & p.R3834X		
		c.6960C>A & c.11503T>C	p.S2320R & p.S3835P		
<i>DNAH8</i>	2 frères Pakistanais	c.6158_6159insT		1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 3630807 4
	2	c.2781+1G>T & c.10348delT			PMID: 33704367
		c.6178G>A & c.13748G>T			PMID: 32681648
	1	c.378_379del	p. K127Rfs*5		PMID: 32619401
3 (/257)	c.11771C>T & c.6689A>G	p.Thr3924Met & p.Lys2230Arg			

		c.9427C>T & c.12721G>A	p.Arg3143Cys & p.Ala4241Thr		
		c.6962_6968del	p.His2321Profs*4		
<i>DNAH10</i>	2	c.2514delG	p.L839*	3 patients, 2 grossesses cliniques	PMID: 34657236
		c.10820 T>C & c.12692C>T	p.M3607T & p.T4231I		
	5 (/643 patients Chinois)	c.12838G>A	p.Gly4280Arg		PMID: 34237282
		c.7601C>T	p.Thr2534Met		
		c.5663G>A & c.11887C>T	p.Arg1888Gln & p.Arg3963Cys		
c.7260dup & c.12235del	p.Glu2421Argfs*26 & p.Ser4079Alafs*5				
<i>DNAH17</i>	1	c.C4445T & c.C6857T	p.A1482V & p.S2286L	1 patient, échec de développement	PMID: 31841227
	1	c.4810C>T	p.R1604C		PMID: 34373205
	1	c.5368C > T & c.13183C > T	p.R1790C & p.R4395W		PMID: 35932098
	2 apparentés (Pakistanais)	c.6308C > T & c.11803C > T	p.Ala2103Val & p.Gln3935*		PMID: 35692830
	1 (Chinois)	c.5707C > T	p.Arg1903Cys		
<i>DRC1</i>	2 (/100)	c.C1660T	p.R554X	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 34169321
		c.C238T	p.R80X		PMID: 34815526
	1	c.1296 G>A	p.(Trp432*)		PMID: 35873463
	1	c.156-1724_244-2550del	p.(Glu53Asnfs*13)		
Complexes associés aux IDA					

CCDC39	2 frères	c.983 T>C	p. Leu328Pro	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 34674941
CCDC40	1	c.901C>T & c.2065_2068dup	p.Arg301* & p. Ala690Glyfs*67	/	PMID: 35449766
CFAP43	3 (/30)	c.2802T>A & c.4132C>T	p.Cys934* & p.Arg1378*	1 patient, 1 grossesse clinique (PMID: 30251428)	PMID: 28552195
		c.253C>T & c.3945_4431del	p.Arg85Trp & p.Ile1316Leufs*10		
		c.386C>A & c.2802T>A	p.Ser129Tyr & p.Cys934*		
	10 (/78)	c.3541-2A>C	p.Ser1181Lysfs*4		PMID: 29449551
		c.1240_1241delGT	p.Val414LeufsTer46		
		c.2658G>A	p.Trp886Ter		
		c.2680C>T	p.Arg894Ter		
		c.3882delA	p.Glu1294AspfsTer47		
		c.3352C>T	p.Arg1118Ter		
		c.1302dupT	p.Leu435SerfsTer26		
		c.1040T>C	p.Val347Ala		
	c.2141+5G>A	p.Lys714Val*11			
	1 (/27)	c.3661-2delA	p.E1221_K1256del		PMID: 32207550
	4 (/13)	c.1140_1143del	p.Asn380Lysfs*3		PMID: 30904354
		c.739A>T	p.Lys247*		
c.1474G>C		p.Gln492Arg			

		c.4600C>G	p.Leu1534Val		
	3 (2 frères + 1 apparenté)	c.899_900del & c.1577_1578del	p.Arg300Lysfs*22 & p.Thr526Serfs*43		PMID: 34100391
		c.1577_1578del	p.Thr526Serfs*43		
CFAP44	1 (/30)	c.2005_2006delAT	p.Met669Valfs*13	4 patients, 2 grossesses cliniques (PMID: 30251428)	PMID: 28552195
	6 (/78)	c.1890+1G>A	p.Pro631Ile*22		PMID: 29449551
		c.3175C>T	p.Arg1059Ter		
		c.2818dupG	p.Glu940GlyfsTer19		
		c.1387G>T	p.Glu463Ter		
		c.4767delT	p.Ile1589MetfsTer6		
	4 (/27)	c.2935_2944del	p.D979*		PMID: 29277146
		c.T1769A	p.L590Q		
		c.2005_2006del	p.M669Vfs*13		
		c.G3262A & c.C1718A	p.G1088S & p.P573H		
1 (/13)	c.4963C>T	p.Arg1655*			
CFAP65	1	c. 2675 G>A	p. Trp892*	3 patients, 3 fausses couches	PMID: 31571197
	6 (/88)	c.1775delC	p.Pro592Leufs*8		PMID: 31501240
		c.3072_3079dup & c.1946delC	p.Arg1027Profs*41 & p.Pro649Argfs*5		
		c.1580delT	p.Leu527Argfs*31		
		c.4855C>T & c.5270T>A	p.Arg1619* & p.Leu1757*		
		c.4855C>T	p.Arg1619*		
		c.5341G>T	p.Glu1781*		
	2 (/167)	c.645G>A	-		
		c.3047T>G	p.Leu1016Arg		
DNAI3	1 (/243 patients Chinois)	c.163 C > T	p.Arg55*	/	PMID: 34782613

Complexes associés aux ODA					
CFAP70	2 (/167)	c.1723-1G>T		1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 31621862
		c.178T>A	p.Phe60Ile		
Complexe des ponts radiaires					
CFAP61	4 frères + 4 frères + 3 frères	c.451_452del	p. I151Nfs*13	/	PMID: 35174165
		c.847C > T	p. R283*		
CFAP91	6 (/167)	c.682+1G>A	-	/	PMID: 32161152
		c.124G>C	p.(Asp42His)		
CFAP206	1 (/167)	c.1430dup	p.Asn477LysfsTer15	1 patient, échec de développement	PMID: 34255152
CFAP251	7 (/78)	c.3007_3337del	p.Ile1003Lysfs26	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 30122540
	1 (/32)	c.1192-3C>G	-		PMID: 35087568
	3 (/65)	c.799 C > T	p.Arg267*		PMID: 30310178
		c.415 C > T & c.1718delT	p.Gln139* & p.Phe574Leu*3		
		c.1286 + 2 T > C	-		
Structures péri-axonéales					
AK7	2 frères	c.2018T>C	p.L673P	/	PMID: 29365104
	1	c.1846G>A	p.E616K		PMID: 34854019
AKAP3	2 (/150 patients Chinois)	c.2286_2287del	p.His762Glnfs*22	Oui	PMID: 35228300
		c.44G>A	p.Cys15Tyr		
CFAP58	2 (/55)	c.323C > T & c.1855C > T	p.S108L & p.R619W	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 33314088
		c.1883A > G & c.2020G > T	p.Y628C & p.A674S		
FSIP2	4 (/78)	c.910delC		1 patient, échec de développement + 2 patients, 2	PMID: 30137358
		c.16389_16392delAATA			
		c.2282dupA			

		c.1606_1607insTGT; 1607_1616delAAAGATTGCA		grossesses cliniques		
	1	c.16246_16247insCCCAAATATCAC C & c.17323C > T	p. T5416fs*7 & p.Q5774*		PMID: 33631238	
	2 frères	c.1750T>A & c.13600A>G	p.C584S & p.I4534V		PMID: 34935173	
	1	c.1494C > A & c.11020_11024del	p.C498* & p.Tyr3675Cysfs*3		PMID: 35672654	
<i>ODF2</i>	1	Heterozygous variant	/	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 35102900	
Centrosome						
<i>CEP135</i>	1		p.D455V	1 patient, pas de grossesse	PMID: 28866084	
		c.A1364T				
<i>DZIP1</i>	2	c.188G>A	p.Arg63Gln	/	PMID: 32051257	
		c.690T>G	p.Tyr230*			
Transport intra-flagellaire (IFT)						
<i>CCDC34</i>	2 (/267)	c.731dup	p.Asn244Lysfs*3	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 34348960	
		c.799_817del	p.Glu267Lysfs*72			
<i>CFAP69</i>	2 (/78)	c.860+1G>A	-	/	PMID: 29606301	
		c.763C>T	p.Gln255Ter			
	2	c.1069_1070insAC	p.Leu357Hisfs11*			PMID: 30415212
		c.647G>A	p.Trp216*			
<i>IFT74</i>	1 (/167)	c.256G > A	p.Gly86Ser	/	PMID: 33689014	
<i>SPEF2</i>	6 (/47)	c.2507+5delG	/	1 patient, pas de grossesse	PMID: 31942643	
		c.C4096T	p.R1366X			
		c.2649dupA	p.N887Efs*2			
		c.3400delA	p.I1134fs			
	1	c.2734delC & c.4952delT	p.P912Lfs*74 & p.V1651Gfs*46		PMID: 31942643	
2 (/42)	c. 12delC & c. 1745-2A > G	p. I4fs	PMID: 31151990			

		c. 4102 G > T & c. 4323dupA	p.E1368X & p. l1441fs		
	2 (/50 patients chinois)	c.910C>T	p.Arg304*		PMID: 31048344
		c.3400delA	p.Ile1134Serfs*13		
TTC21A	1 (/59)	c.3450+2delT	/	1 patient, 1 grossesse	PMID: 30929735
	3 (/65 patients Chinois)	c.716+1G>A	p.Ile240*		PMID: 30929735
		c.341A>G & c.2329C>T	p.Tyr114Cys & p.Gln777*		
		c.2563del	p.Val855*		
TTC29	1	c.254+1G>A & c.1185C>G	p.Tyr395*	1 patient, échec de développement + 2 patients, 2 grossesses	PMID: 36346162
	3 (/80 patients Chinois)	c.1107C>G	p.Tyr369*		PMID: 31735294
		c.412_425del	p.Asp138Leufs*10		
		c.977+1G>T	p.Ser326Profs*8		
	5 (/167)	c.176+1G>A	p.Tyr60*		PMID: 31735292

		c.330_334delGGAGG	p.Glu111Alafs*		
		c.750C>A	p.Tyr250*		
	1	c.1185C>G & c.254+1G>A	p.Tyr395*		PMID: 36346162
<i>WDR19</i>	1 (/65)	c.A3811G	p.K1271E	1 patient, 1 grossesse	PMID: 32323121
Complexe de dégradation des protéines					
<i>QRICH2</i>	2 (/167)	c.3501C>G	p.Tyr1167Ter	/	PMID: 31292949
		c.4614C>G	p.Tyr1538Ter		
	2 frères + 1	c.192G>A	p. L64*		PMID: 30683861
		c.3037C>T	p.R1013*		
Rôle non défini					
<i>ARMC2</i>	5 (/168)	c.1023+1G>A	-	Oui	PMID: 30686508
		c.2279T>A	-		
		c.2353_2354delTT	-		
		c.1284_1288delACAAA	-		
		c.421C>T	-		
	3 apparentés	c.182C>G	-		PMID: 34493464
	?	c.1264C>T	-		PMID: 35543806
<i>BRWD1</i>	3/53	c.C523T	p.H175Y	/	PMID: 33389130
		c.A5573T	p.Q1858L		
		c.G166A & c.T1016C	p.G56S & p.L339S		
<i>CFAP47</i>	3 (/331)	c.7154T>A	p.Ile2385Asn	4 patients, 3 grossesses cliniques	PMID: 33472045
		c.5224A>G	p.Ser1742Gly		
		c.8668C>A	p.Pro2890Thr		
	1 (/24)	CNV, del Xp21.1	-		
<i>CFAP74</i>	2	c.983G>A & c.3532G>A	p.(Gly328Asp) & p.(Asp1178Asn)	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 32555313

		c.652C>T & c.4331G>C	p.(Arg218Trp) & p.(Ser1444Thr)		
DNHD1	8 (/497)	c.5560C>T & c.6498T>G	p.Arg1854Cys & p.Tyr2166*	/	PMID: 34932939
		c.8782C>T	p.Arg2928*		
		c.522_525del & c.911G>A	p.Arg174Serfs*3 & p.Arg304Gln		
		c.425_428del & c.4072C>T	p.Asp142Valfs*35 & p.Arg1358Cys		
		c.8909A>G	p.Tyr2970Cys		
		c. 9649C>T & c.12473A>G	p.Arg3217* & p.His4158Arg		

		c.12453G>A & c.4141C>T	p.Trp4151* & p.Gln1381*		
		c.14234T>C & c.5347delC	p.Val4745Ala & p.Gln1783Serfs*28		
	3 (/167)	c.8782C>T	p.Arg2928Ter		PMID: 36768883
		c.5989G>A	p.Gly1997Ser		
		c.2581C>T & c.6031C>T	p.Arg861Cys & p.Arg2011Trp		
<i>SPAG6</i>	2	c.308C > A	p. A103D	1 patient, 1 grossesse clinique	PMID: 35232447
		c. 585delA	p. K196Sfs*6		
<i>STK33</i>	4 frères	c.1235del	p.T412Kfs*14	/	PMID: 34155512

Annexe 2 : Liste des publications non incluses dans la thèse

Genetic causes of macrozoospermia and proposal for an optimized genetic diagnosis strategy based on sperm parameters

Alicia Coudert ^{1,2,3}, **Caroline Cazin** ^{1,2}, Amir Amiri-Yekta ^{1,2,3,1}, Selima Fourati Ben Mustapha ⁴, Raoudha Zouari ⁴, Julien Bessonat ⁵, Abdelali Zoghmar ⁶, Antoine Clergeau ⁷, Catherine Metzler-Guillemain ⁸, Chema Triki ⁹, Hervé Lejeune ¹⁰, Nathalie Sermondade ¹¹, Eva Pipiras ¹¹, Nadia Prisant ¹², Isabelle Cedrin ¹³, Isabelle Koscinski ¹⁴, Leila Keskes ¹⁵, Florence Lestrade ¹⁶, Laetitia Hesters ¹⁷, Nathalie Rives ¹⁸, Béatrice Dorphin ¹⁹, Agnes Guichet ²⁰, Catherine Patrat ²¹, Emmanuel Dulioust ²¹, Aurélie Feraille ¹⁸, François Robert ²², Sophie Brouillet ²³, Frédéric Morel ^{24,25}, Aurore Perrin ^{24,25}, Nathalie Rougier ²⁶, Eric Bieth ²⁷, Arthur Sorlin ²⁸, Jean-Pierre Siffroi ²⁹, Mariem Ben Khelifa ³⁰, Florence Boiterelle ³², Sylvianne Hennebicq ^{1,5}, Veronique Satre ^{1,3}, Christophe Arnoult ¹, Charles Coutton ^{1,3}, Anne-Laure Barbotin ³³, Nicolas Thierry-Mieg ³⁴, Zine-Eddine Kherraf ^{1,2}, Pierre F. Ray ^{1,2}

PMID: **37116580** DOI: 10.1016/j.jgg.2023.04.007

Abstract

Macrozoospermia, characterized by the presence of large-headed spermatozoa usually carrying several flagella, is one of the most severe phenotype of male infertility phenotypes, as in most cases, the gametes are chromosomally abnormal and cannot be used for assisted reproductive technologies (ART). In 2007, subjects from consanguineous families were shown to carry the same homozygous deleterious *AURKC* variant establishing *AURKC* as the first and main gene associated with macrozoospermia. Since then several other deleterious variants were identified. Since the identification of *AURKC*, several other genes have been described to cause macrozoospermia such as *ZMYND15* and *NUP210L* but deleterious variants have only been identified in few subjects. Here, we present the exhaustive genetic analysis of 156 patients described to present large-headed spermatozoa in their ejaculate and sent to Grenoble by clinicians from various centers between 2007 and 2021 for the genetic diagnosis of their sperm defect. Partial results from some of these patients were published previously but reanalysis of all patients, including 70 unreported subjects was never done. We note that the percentage of large-headed spermatozoa varied from 2% to 100% with an average of 64.9% of macrozoospermia and the percentage of multiple flagella varied from 0 to 75% with an average of 30.2%. Targeted analysis of *AURKC* was first carried out before performing whole exome sequencing (WES) on the undiagnosed patients, allowing the identification of candidate variants in five additional genes, including three new candidate genes. In addition, we performed a genotype-phenotype correlation to establish an algorithm to optimize the genetic diagnosis of subjects with macrozoospermia.

New Mutations in DNHD1 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella

Guillaume Martinez,^{1,2,*} Anne-Laure Barbotin,³ **Caroline Cazin**,^{2,4} Zeina Wehbe,² Angèle Boursier,³ Amir Amiri-Yekta,⁵ Abbas Daneshpour,⁵ Seyedeh-Hanieh Hosseini,⁶ Nathalie Rives,^{7,8} Aurélie Feraille,^{7,8} Nicolas Thierry-Mieg,⁹ Marie Bidart,^{2,10} Véronique Satre,^{1,2} Christophe Arnoult,² Pierre F. Ray,^{2,4} Zine-Eddine Kherraf,^{2,4} and Charles Coutton^{1,2,*}

PMID: **36768883**. DOI: 10.3390/ijms24032559.

Abstract

Male infertility is a common and complex disease and presents as a wide range of heterogeneous phenotypes. Multiple morphological abnormalities of the sperm flagellum (MMAF) phenotype is a peculiar condition of extreme morphological sperm defects characterized by a mosaic of sperm flagellum defects to a total asthenozoospermia. At this time, about 40 genes were associated with the MMAF phenotype. However, mutation prevalence for most genes remains individually low and about half of individuals remain without diagnosis, encouraging us to pursue the effort to identify new mutations and genes. In the present study, an a cohort of 167 MMAF patients was analyzed using whole-exome sequencing, and we identified three unrelated patients with new pathogenic mutations in DNHD1, a new gene recently associated with MMAF. Immunofluorescence experiments showed that DNHD1 was totally absent from sperm cells from DNHD1 patients, supporting the deleterious effect of the identified mutations. Transmission electron microscopy reveals severe flagellum abnormalities of sperm cells from one mutated patient, which appeared completely disorganized with the absence of the central pair and midpiece defects with a shortened and misshapen mitochondrial sheath. Immunostaining of IFT20 was not altered in mutated patients, suggesting that IFT may be not affected by DNHD1 mutations. Our data confirmed the importance of DNHD1 for the function and structural integrity of the sperm flagellum. Overall, this study definitively consolidated its involvement in MMAF phenotype on a second independent cohort and enriched the mutational spectrum of the DNHD1 gene.

Keywords: DNHD1; MMAF; genetics of male infertility; teratozoospermia; whole-exome sequencing.

Expanding the sperm phenotype caused by mutations in SPATA20: A novel splicing mutation in an infertile patient with partial globozoospermia.

Guillaume Martinez, Catherine Metzler-Guillemain, [Caroline Cazin](#), Zine-Eddine Kherraf, Odile Paulmyer-Lacroix, Christophe Arnoult, Pierre F. Ray, Charles Coutton

PMID: **36537262**. DOI: 10.1111/cge.14284

Abstract

The study identifies a novel biallelic pathogenic mutation in SPATA20 (c.1957+2T>A) in one infertile patient presenting with partial globozoospermia supporting its involvement in sperm head defects. The sperm phenotype described in our patient is however slightly different from the typical acephalic spermatozoa syndrome (ASS) previously reported. This data suggests a phenotypic heterogeneity associated with SPATA20 mutation and raises the hypothesis of a phenotypic continuum between partial or pseudo-globozoospermia and ASS. Last, our study confirmed that ICSI does not seem to be a valuable therapeutic option for patient with SPATA20 mutation.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

A recurrent ZP1 variant is responsible for oocyte maturation defect with degenerated oocytes in infertile females.

Corinne Loeuillet¹, Magali Dhellemmes¹, **Caroline Cazin**^{1,2,3}, Zine-Eddine Kherraf^{1,2}, Selima Fourati Ben Mustapha⁴, Raoudha Zouari⁴, Nicolas Thierry-Mieg⁵, Christophe Arnoult¹, Pierre F Ray^{1,2}

PMID: **35460069** DOI: 10.1111/cge.14144

Abstract

A female factor is present in approximately 70% of couple infertility, often due to ovulatory disorders. In oocyte maturation defect (OMD), affected patients have a primary infertility with normal menstrual cycles but produce no oocyte, degenerated (atretic) or abnormal oocytes blocked at different stages of maturation. Four genes have so far been associated with OMD: PATL2, TUBB8, WEE2, and ZP1. In our initial study, 6 out of 23 OMD subjects were shown to carry the same PATL2 homozygous loss of function variant and one patient had a TUBB8 truncating variant. Here, we included four additional OMD patients and reanalyzed all 27 subjects. In addition to the seven patients with a previously identified defect, five carried the same deleterious homozygous ZP1 variant (c.1097G>A; p.Arg366Gln). All the oocytes from ZP1-associated patients appeared shriveled and dark indicating that the abnormal ZP1 protein induced oocyte death and degeneration. Overall ZP1-associated patients had degenerated or absent oocytes contrary to PATL2-associated subjects who had immature oocytes blocked mainly at the germinal vesicle stage. In this cohort of North African OMD patients, whole exome sequencing permitted to diagnose 44% of the patients studied and to identify a new frequent ZP1 variant.

Keywords: OMD; infertility; oocytes; zona pellucida.

© 2022 The Authors. Clinical Genetics published by John Wiley & Sons Ltd.

Homozygous mutations in *CCDC34* cause male infertility with oligoasthenoteratozoospermia in humans and mice

Jiangshan Cong^{# 1 2}, Xiong Wang^{# 3 4}, Amir Amiri-Yekta^{# 5 6}, Lingbo Wang^{# 1 2}, Zine-Eddine Kherraf^{6 7}, Chunyu Liu^{1 2}, **Caroline Cazin**^{6 7 8}, Shuyan Tang^{1 2}, Seyedeh Hanieh Hosseini⁹, Shixiong Tian^{1 2}, Abbas Daneshpour⁵, Jiaxiong Wang^{10 11}, Yiling Zhou^{1 2}, Yuyan Zeng¹, Shenmin Yang^{10 11}, Xiaojin He^{12 13 14}, Jinsong Li^{15 16}, Yunxia Cao^{12 13 14}, Li Jin¹, Pierre F Ray^{17 7}, Feng Zhang^{18 2}

PMID: **34348960**. DOI: 10.1136/jmedgenet-2021-107919

Abstract

Background: Oligoasthenoteratozoospermia is a typical feature of sperm malformations leading to male infertility. Only a few genes have been clearly identified as pathogenic genes of oligoasthenoteratozoospermia.

Methods and results: Here, we identified a homozygous frameshift variant (c.731dup, p.Asn244Lysfs*3) in *CCDC34*, which is preferentially expressed in the human testis, using whole-exome sequencing in a cohort of 100 Chinese men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). In an additional cohort of 167 MMAF-affected men from North Africa, Iran and France, we identified a second subject harbouring a homozygous *CCDC34* frameshift variant (c.799_817del, p.Glu267Lysfs*72). Both affected men presented a typical MMAF phenotype with an abnormally low sperm concentration (ie, oligoasthenoteratozoospermia). Transmission electron microscopy analysis of the sperm flagella affected by *CCDC34* deficiency further revealed dramatic disorganisation of the axoneme. Immunofluorescence assays of the spermatozoa showed that *CCDC34* deficiency resulted in almost absent staining of *CCDC34* and intraflagellar transport-B complex-associated proteins (such as IFT20 and IFT52). Furthermore, we generated a mouse *Ccdc34* frameshift mutant using CRISPR-Cas9 technology. *Ccdc34*-mutated (*Ccdc34*^{mut/mut}) male mice were sterile and presented oligoasthenoteratozoospermia with typical MMAF anomalies. Intracytoplasmic sperm injection has good pregnancy outcomes in both humans and mice.

Conclusions: Our findings support that *CCDC34* is crucial to the formation of sperm flagella and that biallelic deleterious mutations in *CCDC34/Ccdc34* cause male infertility with oligoasthenoteratozoospermia in humans and mice.

Keywords: genetic variation; genetics; medical; reproductive medicine.

© Author(s) (or their employer(s)) 2021. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

From azoospermia to macrozoospermia, a phenotypic continuum due to mutations in the ZMYND15 gene

Zine-Eddine Kherraf^{1,2}, **Caroline Cazin**^{1,2}, Florence Lestrade³, Jana Muronova¹, Charles Coutton^{1,4}, Christophe Arnoult¹, Nicolas Thierry-Mieg⁵, Pierre F Ray^{1,2}

PMID: **35017390** PMCID: PMC9226687 DOI: 10.4103/aja202194

Abstract

Thanks to tremendous advances in sequencing technologies and in particular to whole exome sequencing (WES), many genes have now been linked to severe sperm defects. A precise genetic diagnosis is obtained for a minority of patients and only for the most severe defects like azoospermia or macrozoospermia which is very often due to defects in the aurora kinase C (AURKC gene. Here, we studied a subject with a severe oligozoospermia and a phenotypic diagnosis of macrozoospermia. AURKC analysis did not reveal any deleterious variant. WES was then initiated which permitted to identify a homozygous loss of function variant in the zinc finger MYND-type containing 15 (ZMYND15 gene. ZMYND15 has been described to serve as a switch for haploid gene expression, and mice devoid of ZMYND15 were shown to be sterile due to nonobstructive azoospermia (NOA). In man, ZMYND15 has been associated with NOA and severe oligozoospermia. We confirm here that the presence of a bi-allelic ZMYND15 variant induces a severe oligozoospermia. In addition, we show that severe oligozoospermia can be associated macrozoospermia, and that a phenotypic misdiagnosis is possible, potentially delaying the genetic diagnosis. In conclusion, genetic defects in ZMYND15 can induce complete NOA or severe oligozoospermia associated with a very severe teratozoospermia. In our experience, severe oligozoospermia is often associated with severe teratozoospermia and can sometimes be misinterpreted as macrozoospermia or globozoospermia. In these instances, specific AURKC or dpy-19 like 2 (DPY19L2) diagnosis is usually negative and we recommend the direct use of a pan-genomic techniques such as WES.

Keywords: azoospermia; gene defect; macrozoospermia; male infertility.

Oligogenic heterozygous inheritance of sperm abnormalities in mouse.

Guillaume Martinez^{1,2}, Charles Coutton^{1,2}, Corinne Loeuillet¹, **Caroline Cazin**^{1,3}, Jana Muroňová¹, Magalie Boguenet¹, Emeline Lambert¹, Magali Dhellemmes¹, Geneviève Chevalier¹, Jean-Pascal Hograindleur¹, Charline Vilpreux¹, Yasmine Neirijnck⁴, Zine-Eddine Kherraf^{1,3}, Jessica Escoffier¹, Serge Nef⁴, Pierre F Ray^{1,3}, Christophe Arnoult^{1,5}

PMID: **35451961** PMCID: PMC9071268 DOI: 10.7554/eLife.75373

Abstract

Male infertility is an important health concern that is expected to have a major genetic etiology. Although high-throughput sequencing has linked gene defects to more than 50% of rare and severe sperm anomalies, less than 20% of common and moderate forms are explained. We hypothesized that this low success rate could at least be partly due to oligogenic defects - the accumulation of several rare heterozygous variants in distinct, but functionally connected, genes. Here, we compared fertility and sperm parameters in male mice harboring one to four heterozygous truncating mutations of genes linked to multiple morphological anomalies of the flagellum (MMAF) syndrome. Results indicated progressively deteriorating sperm morphology and motility with increasing numbers of heterozygous mutations. This first evidence of oligogenic inheritance in failed spermatogenesis strongly suggests that oligogenic heterozygosity could explain a significant proportion of asthenoteratozoospermia cases. The findings presented pave the way to further studies in mice and man.

Keywords: MMAF; cell biology; heredity; infertility; mouse; oligogenism; sperm abnormalities.

© 2022, Martinez et al.

CFAP61 is required for sperm flagellum formation and male fertility in human and mouse

Siyu Liu, Jintao Zhang, Zine Eddine Kherraf, Shuya Sun, Xin Zhang, [Caroline Cazin](#), Charles Coutton, Raoudha Zouari, Shuqin Zhao, Fan Hu, Selima Fourati Ben Mustapha, Christophe Arnoult, Pierre F Ray, Mingxi Liu

PMID: **34792097** DOI: 10.1101/2021.03.04.433881

Abstract

Defects in the structure or motility of cilia and flagella may lead to severe diseases such as primary ciliary dyskinesia (PCD), a multisystemic disorder with heterogeneous manifestations affecting primarily respiratory and reproductive functions. We report that CFAP61 is a conserved component of the Calmodulin and radial Spoke associated Complex (CSC) of cilia. We find that a CFAP61 splice variant, c.143+5G>A, causes exon skipping in human, inducing a multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF) phenotype. We generated *Cfap61* knockout mice that recapitulate the infertility phenotype of the human CFAP61 mutation, but without other symptoms usually observed in PCD. We find that CFAP61 interacts with the CSC, radial spoke stalk and RS head. During early stages of *Cfap61*^{-/-} spermatid development, the assembly of RS components is impaired. With the progress of spermiogenesis, the axoneme in *Cfap61*^{-/-} cells becomes unstable and scatters, and the distribution of intraflagellar transport proteins is disrupted. This study reveals an organ specific mechanism of axoneme stabilization that is related to male infertility.

Bi-allelic truncating variants in CFAP206 cause male infertility in human and mouse

Qunshan Shen^{# 1 2 3}, Guillaume Martinez^{# 4 5}, Hongbin Liu⁶, Julie Beurois⁴, Huan Wu^{1 2 3}, Amir Amiri-Yekta⁷, Dan Liang^{1 2 3}, Zine-Eddine Kherraf^{4 8}, Marie Bidart^{4 9}, **Caroline Cazin**⁴, Tristan Celse^{4 5}, Véronique Satre^{4 5}, Nicolas Thierry-Mieg¹⁰, Marjorie Whitfield⁴, Aminata Touré⁴, Bing Song^{1 2 3}, Mingrong Lv^{1 2 3}, Kuokuo Li^{1 2 3}, Chunyu Liu^{11 12}, Fangbiao Tao^{2 3}, Xiaojin He^{1 2 3}, Feng Zhang^{11 12}, Christophe Arnoult⁴, Pierre F Ray^{4 8}, Yunxia Cao^{# 13 14 15}, Charles Coutton^{# 16 17 18}

PMID: **34255152**. DOI: 10.1007/s00439-021-02313-z

Abstract

Spermatozoa are polarized cells with a head and a flagellum joined together by the connecting piece. Flagellum integrity is critical for normal sperm function, and flagellum defects consistently lead to male infertility. Multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF) is a distinct sperm phenotype consistently leading to male infertility due to a reduced or absent sperm motility associated with severe morphological and ultrastructural flagellum defects. Despite numerous genes recently described to be recurrently associated with MMAF, more than half of the cases analyzed remain unresolved, suggesting that many yet uncharacterized gene defects account for this phenotype. By performing a retrospective exome analysis of the unsolved cases from our initial cohort of 167 infertile men with a MMAF phenotype, we identified one individual carrying a homozygous frameshift variant in CFAP206, a gene encoding a microtubule-docking adapter for radial spoke and inner dynein arm. Immunostaining experiments in the patient's sperm cells demonstrated the absence of WDR66 and RSPH1 proteins suggesting severe radial spokes and calmodulin and spoke-associated complex defects. Using the CRISPR-Cas9 technique, we generated homozygous Cfp206 knockout (KO) mice which presented with male infertility due to functional, structural and ultrastructural sperm flagellum defects associated with a very low rate of embryo development using ICSI. Overall, we showed that CFAP206 is essential for normal sperm flagellum structure and function in human and mouse and that bi-allelic mutations in CFAP206 cause male infertility in man and mouse by inducing morphological and functional defects of the sperm flagellum that may also cause ICSI failures.

© 2021. The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature.

Leucine zipper transcription factor-like 1 (LZTFL1), an intraflagellar transporter protein 27 (IFT27) associated protein, is required for normal sperm function and male fertility

Qian Huang ¹, Wei Li ², Qi Zhou ¹, Parirokh Awasthi ³, **Caroline Cazin** ⁴, Yitian Yap ², Ljiljana Mladenovic-Lucas ⁵, Bo Hu ⁶, Pancharatnam Jeyasuria ⁷, Ling Zhang ⁸, James G Granneman ⁵, Rex A Hess ⁹, Pierre F Ray ⁴, Zine-Eddine Kherraf ⁴, Ven Natarajan ³, Zhibing Zhang ¹⁰

PMID: **34023333**. PMCID: **PMC8277734** (available on 2022-09-01); DOI: [10.1016/j.ydbio.2021.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.05.006)

Abstract

Intraflagellar transport (IFT) is an evolutionarily conserved mechanism essential for the assembly and maintenance of most eukaryotic cilia and flagella, including mammalian sperm tails. Depletion of IFT27, a component of the IFT complex, in male germ cells results in infertility associated with disrupted sperm flagella structure and motility. Leucine zipper transcription factor-like 1 (LZTFL1) is an IFT27 associated protein. LZTFL1, also known as BBS17, is a Bardet-Biedl syndrome (BBS) associated protein. Patients carrying biallelic variants of LZTFL1 gene exhibit the common BBS phenotypes. The global *Lztf1* knockout mice showed abnormal growth rate and retinal degeneration, typical of BBS phenotype. However, it is not clear if *Lztf1* has a role in male fertility. The LZTFL1 protein is highly and predominantly expressed in mouse testis. During the first wave of spermatogenesis, the protein is only expressed during spermiogenesis phase from the round spermatid stage and displays a cytoplasmic localization with a vesicular distribution pattern. At the elongated spermatid stage, LZTFL1 is present in the developing flagella and appears also close to the manchette. Fertility of *Lztf1* knockout mice was significantly reduced and associated with low sperm motility and a high level of abnormal sperm (astheno-teratozoospermia). In vitro assessment of fertility revealed reduced fertilization and embryonic development when using sperm from homozygous mutant mice. In addition, we observed a significant decrease of the testicular IFT27 protein level in *Lztf1* mutant mice contrasting with a stable expression levels of other IFT proteins, including IFT20, IFT81, IFT88 and IFT140. Overall, our results support strongly the important role of LZTFL1 in mouse spermatogenesis and male fertility.

Keywords: Intraflagellar transporter protein 27; Leucine zipper transcription factor-like 1; Male fertility; Spermatogenesis.

Copyright © 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

A missense mutation in IFT74, encoding for an essential component for intraflagellar transport of Tubulin, causes asthenozoospermia and male infertility without clinical signs of Bardet-Biedl syndrome

Patrick Lorès ¹, Zine-Eddine Kherraf ^{2 3}, Amir Amiri-Yekta ⁴, Marjorie Whitfield ², Abbas Daneshpour ⁴, Laurence Stouvenel ¹, **Caroline Cazin** ^{2 3}, Emma Cavarocchi ², Charles Coutton ^{2 5}, Marie-Astrid Llabador ⁶, Christophe Arnoult ², Nicolas Thierry-Mieg ⁷, Lucile Ferreux ^{1 8}, Catherine Patrat ^{1 8}, Seyedeh-Hanieh Hosseini ⁹, Selima Fourati Ben Mustapha ¹⁰, Raoudha Zouari ¹⁰, Emmanuel Dulioust ^{# 1 8}, Pierre F Ray ^{# 2 3}, Aminata Touré ¹¹

PMID: **33689014**. DOI: 10.1007/s00439-021-02270-7

Abstract

Cilia and flagella are formed around an evolutionary conserved microtubule-based axoneme and are required for fluid and mucus clearance, tissue homeostasis, cell differentiation and movement. The formation and maintenance of cilia and flagella require bidirectional transit of proteins along the axonemal microtubules, a process called intraflagellar transport (IFT). In humans, IFT defects contribute to a large group of systemic diseases, called ciliopathies, which often display overlapping phenotypes. By performing exome sequencing of a cohort of 167 non-syndromic infertile men displaying multiple morphological abnormalities of the sperm flagellum (MMAF) we identified two unrelated patients carrying a homozygous missense variant adjacent to a splice donor consensus site of IFT74 (c.256G > A;p.Gly86Ser). IFT74 encodes for a core component of the IFT machinery that is essential for the anterograde transport of tubulin. We demonstrate that this missense variant affects IFT74 mRNA splicing and induces the production of at least two distinct mutant proteins with abnormal subcellular localization along the sperm flagellum. Importantly, while IFT74 deficiency was previously implicated in two cases of Bardet-Biedl syndrome, a pleiotropic ciliopathy with variable expressivity, our data indicate that this missense mutation only results in primary male infertility due to MMAF, with no other clinical features. Taken together, our data indicate that the nature of the mutation adds a level of complexity to the clinical manifestations of ciliary dysfunction, thus contributing to the expanding phenotypical spectrum of ciliopathies.

KH domain containing 3 like (KHDC3L) frame-shift mutation causes both recurrent pregnancy loss and hydatidiform mole

Nayeralsadat Fatemi ¹, Pierre F Ray ², Fariba Ramezanali ³, Tina Shahani ⁴, Amir Amiri-Yekta ⁵, Zine-Eddine Kherraf ², **Caroline Cazin** ², Navid Almadani ⁵, Maryam Varkiani ⁶, Soheila Sarmadi ⁷, Niloofer Sodeifi ⁸, Hamid Gourabi ⁵, Alireza Biglari ⁹, Mehdi Totonchi ¹⁰

PMID: **33639414**. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2021.02.006

Abstract

Objective: Recurrent pregnancy loss (RPL) is a common infertility-related complication that affects approximately 1-3 % of women worldwide. Known causes of etiology are found in approximately half the cases but the other half remain unexplained. It is estimated that several thousands of genes contribute to reproductive success in mammals and the genetic causes of RPL cannot be fully addressed through targeted genetic tests. In recent years, massive parallel sequencing technologies has helped discovering many causal mutations in hereditary diseases such as RPL.

Study design: Using whole-exome sequencing (WES), we studied a large multiplex consanguineous family with multiple cases of RPL and hydatidiform moles (HM). In addition, targeted Sanger sequencing was applied to 40 additional non-related individuals with RPL.

Results: The use of WES permitted to identify the pathogenic variant in KHDC3L (c.322_325delGACT) in related who experienced RPL with or without HM. Sanger sequencing confirmed the segregation of the mutation throughout the pedigree and permitted to establish this variant as the genetic cause responsible for RPL and HM in this family.

Conclusion: KHDC3L is well established as a susceptibility gene for HM but we confirmed here that KHDC3L deleterious variants can also induce RPL. In addition, we observed a genotype-phenotype correlation, demonstrating that women with a truncating KHDC3L homozygous variant could not sustain a pregnancy and often had pregnancy losses mainly due to HM while those with the same heterozygous variant could have children but often endured RPL with no HM.

Keywords: Hydatidiform mole (HR); KHDC3L; Recurrent pregnancy loss (RPL); Whole-exome sequencing.

Copyright © 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Defect in the nuclear pore membrane glycoprotein 210-like gene is associated with extreme uncondensed sperm nuclear chromatin and male infertility: a case report

Karim Arafah ¹, Fabrice Lopez ², **Caroline Cazin** ^{3 4}, Zine-Eddine Kherraf ^{3 4}, Virginie Tassistro ⁵, Anderson Loundou ⁶, Christophe Arnoult ³, Nicolas Thierry-Mieg ⁷, Philippe Bulet ^{1 8}, Marie-Roberte Guichaoua ⁵, Pierre F Ray ^{3 4}

PMID: **33332558**. DOI: 10.1093/humrep/deaa329

Abstract

After the two meiotic divisions, haploid round spermatids undergo dramatic changes to become mature spermatozoa. One of the main transformations consists of compacting the cell nucleus to confer the sperm its remarkable hydrodynamic property and to protect its DNA from the oxidative stress it will encounter during its reproductive journey. Here, we studied an infertile subject with low sperm count, poor motility and highly abnormal spermatozoa with strikingly large heads due to highly uncondensed nuclear sperm DNA. Whole-exome sequencing was performed on the subject's DNA to identify the genetic defect responsible for this severe sperm anomaly. Bioinformatics analysis of exome sequence data uncovered a homozygous loss of function variant, ENST00000368559.7:c.718-1G>A, altering a consensus splice site expected to prevent the synthesis of the nucleoporin 210 like (NUP210L) protein. High-resolution mass spectrometry of sperm protein extracts did not reveal any NUP210L peptide sequence in the patient's sperm, contrary to what was observed in control donors, thus confirming the absence of NUP210L in the patient's sperm. Interestingly, homozygous Nup210l knock-out mice have been shown to be infertile due to a reduced sperm count, a high proportion of round-headed sperm, other head and flagella defects and a poor motility. NUP210L is almost exclusively expressed in the testis and sequence analogy suggests that it encodes a nuclear pore membrane glycoprotein. The protein might be crucial to regulate nuclear trafficking during and/or before spermiogenesis, its absence potentially impeding adequate nuclear compaction by preventing the entry of histone variants/transition proteins/protamines into the nucleus and/or by preventing the adequate replacement of core histones. This work describes a new gene necessary for male fertility, potentially improving the efficiency of the genetic diagnosis of male infertility. The function of NUP210L still remains to be resolved and its future investigation will help to understand the complex mechanisms necessary for sperm compaction.

Keywords: NUP210L; chromatin remodelling; exome sequencing, proteomics; male infertility; nucleoporin 210 like; spermatogenesis; uncondensed sperm nucleus.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player

Tristan Celse ^{1 2}, **Caroline Cazin** ^{1 2}, Flore Mietton ², Guillaume Martinez ^{1 3}, Delphine Martinez ², Nicolas Thierry-Mieg ⁴, Amandine Septier ⁴, Catherine Guillemain ^{5 6}, Julie Beurois ¹, Antoine Clergeau ⁷, Selima Fourati Ben Mustapha ⁸, Mahmoud Kharouf ⁸, Abdelali Zoghmar ⁹, Ahmed Chargui ¹⁰, Aline Papaxanthos ¹¹, Béatrice Dorphin ¹², Bernard Foliguet ¹³, Chema Triki ¹⁴, Christophe Sifer ¹⁵, Dominique Lauton ¹⁶, Gérard Tachdjian ¹⁷, Gilles Schuler ¹⁸, Hervé Lejeune ¹⁹, Jacques Puechberty ²⁰, Julien Bessonnat ²¹, Laurent Pasquier ²², Lionel Mery ²³, Marine Poulain ²⁴, Myriam Chaabouni ⁸, Nathalie Sermondade ²⁵, Rosalie Cabry ²⁶, Sebti Benbouhadja ⁹, Ségolène Veau ²⁷, Cynthia Frapsauce ²⁸, Valérie Mitchell ²⁹, Vincent Achard ^{30 31 32}, Veronique Satre ^{1 3}, Sylviane Hennebicq ^{1 21}, Raoudha Zouari ⁵, Christophe Arnoult ¹, Zine-Eddine Kherraf ^{1 2}, Charles Coutton ^{1 3}, Pierre F Ray ^{33 34}

PMID: **33108537**. DOI: 10.1007/s00439-020-02229-0

Abstract

Globozoospermia is a rare phenotype of primary male infertility inducing the production of round-headed spermatozoa without acrosome. Anomalies of DPY19L2 account for 50-70% of all cases and the entire deletion of the gene is by far the most frequent defect identified. Here, we present a large cohort of 69 patients with 20-100% of globozoospermia. Genetic analyses including multiplex ligation-dependent probe amplification, Sanger sequencing and whole-exome sequencing identified 25 subjects with a homozygous DPY19L2 deletion (36%) and 14 carrying other DPY19L2 defects (20%). Overall, 11 deleterious single-nucleotide variants were identified including eight novel and three already published mutations. Patients with a higher rate of round-headed spermatozoa were more often diagnosed and had a higher proportion of loss of function anomalies, highlighting a good genotype phenotype correlation. No gene defects were identified in patients carrying < 50% of globozoospermia while diagnosis efficiency rose to 77% for patients with > 50% of globozoospermia. In addition, results from whole-exome sequencing were scrutinized for 23 patients with a DPY19L2 negative diagnosis, searching for deleterious variants in the nine other genes described to be associated with globozoospermia in human (C2CD6, C7orf61, CCDC62, CCIN, DNAH17, GGN, PICK1, SPATA16, and ZBP1). Only one homozygous novel truncating variant was identified in the GGN gene in one patient, confirming the association of GGN with globozoospermia. In view of these results, we propose a novel diagnostic strategy focusing on patients with at least 50% of globozoospermia and based on a classical qualitative PCR to detect DPY19L2 homozygous deletions. In the absence of the latter, we recommend to perform whole-exome sequencing to search for defects in DPY19L2 as well as in the other previously described candidate genes.

Genetics of teratozoospermia: Back to the head

Julie Beurois ¹, **Caroline Cazin** ¹, Zine-Eddine Kherraf ², Guillaume Martinez ³, Tristan Celse ³, Aminata Touré ¹, Christophe Arnoult ¹, Pierre F Ray ², Charles Coutton ⁴

PMID: **33183966**. DOI: 10.1016/j.beem.2020.101473

Abstract

Spermatozoa are polarized cells with a head and a flagellum joined by the connecting piece. Head integrity is critical for normal sperm function, and head defects consistently lead to male infertility. Abnormalities of the sperm head are among the most severe and characteristic sperm defects. Patients presenting with a monomorphic head sperm defects such as globozoospermia or macrozoospermia were analyzed permitting to identify several key genes for spermatogenesis such as AURKC and DPY19L2. The study of patients with other specific sperm head defects such as acephalic spermatozoa have also enabled the identification of new infertility genes such as SUN5. Here, we review the genetic causes leading to morphological defects of sperm head. Advances in the genetics of male infertility are necessary to improve the management of infertility and will pave the road towards future strategies of treatments, especially for patients with the most severe phenotype as sperm head defects.

Keywords: acephalic spermatozoa; globozoospermia; intracytoplasmic sperm injection (ICSI); large headed spermatozoa; male infertility; teratozoospermia.

Copyright © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail

Aminata Touré ^{1 2 3}, Guillaume Martinez ^{4 5}, Zine-Eddine Kherraf ^{4 6}, [Caroline Cazin](#) ⁴, Julie Beurois ⁴, Christophe Arnoult ⁴, Pierre F Ray ^{4 6}, Charles Coutton ^{7 8}

PMID: **31950240**. DOI: 10.1007/s00439-020-02113-x

Abstract

Spermatozoa contain highly specialized structural features reflecting unique functions required for fertilization. Among them, the flagellum is a sperm-specific organelle required to generate the motility, which is essential to reach the egg. The flagellum integrity is, therefore, critical for normal sperm function and flagellum defects consistently lead to male infertility due to reduced or absent sperm motility defined as asthenozoospermia. Multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF), also called short tails, is among the most severe forms of sperm flagellum defects responsible for male infertility and is characterized by the presence in the ejaculate of spermatozoa being short, coiled, absent and of irregular caliber. Recent studies have demonstrated that MMAF is genetically heterogeneous which is consistent with the large number of proteins (over one thousand) localized in the human sperm flagella. In the past 5 years, genomic investigation of the MMAF phenotype allowed the identification of 18 genes whose mutations induce MMAF and infertility. Here we will review information about those genes including their expression pattern, the features of the encoded proteins together with their localization within the different flagellar protein complexes (axonemal or peri-axonemal) and their potential functions. We will categorize the identified MMAF genes following the protein complexes, functions or biological processes they may be associated with, based on the current knowledge in the field.

Biallelic variants in *MAATS1* encoding CFAP91, a calmodulin-associated and spoke-associated complex protein, cause severe astheno-teratozoospermia and male infertility

Guillaume Martinez^{# 1 2}, Julie Beurois^{# 1}, Denis Dacheux^{3 4}, **Caroline Cazin¹**, Marie Bidart^{1 5}, Zine-Eddine Kherraf^{1 6}, Derrick R Robinson⁴, Véronique Satre^{1 2}, Gerald Le Gac^{7 8}, Chandran Ka⁷, Isabelle Gourlaouen⁷, Yann Fichou⁷, Graciane Petre⁹, Emmanuel Dulioust^{10 11}, Raoudha Zouari¹², Nicolas Thierry-Mieg¹³, Aminata Touré^{11 14 15}, Christophe Arnoult¹, Mélanie Bonhivers³, Pierre Ray^{# 1 6}, Charles Coutton^{# 16 2}

PMID: **32161152**. DOI: 10.1136/jmedgenet-2019-106775

Abstract

Background: Multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF) consistently lead to male infertility due to a reduced or absent sperm motility defined as asthenozoospermia. Despite numerous genes recently described to be recurrently associated with MMAF, more than half of the cases analysed remain unresolved, suggesting that many yet uncharacterised gene defects account for this phenotype. **METHODS:** Exome sequencing was performed on 167 infertile men with an MMAF phenotype. Immunostaining and transmission electron microscopy (TEM) in sperm cells from affected individuals were performed to characterise the ultrastructural sperm defects. Gene inactivation using RNA interference (RNAi) was subsequently performed in *Trypanosoma*.

Results: We identified six unrelated affected patients carrying a homozygous deleterious variants in *MAATS1*, a gene encoding CFAP91, a calmodulin-associated and spoke-associated complex (CSC) protein. TEM and immunostaining experiments in sperm cells showed severe central pair complex (CPC) and radial spokes defects. Moreover, we confirmed that the WDR66 protein is a physical and functional partner of CFAP91 into the CSC. Study of *Trypanosoma* *MAATS1*'s orthologue (TbCFAP91) highlighted high sequence and structural analogies with the human protein and confirmed the axonemal localisation of the protein. Knockdown of TbCFAP91 using RNAi impaired flagellar movement led to CPC defects in *Trypanosoma* as observed in humans.

Conclusions: We showed that CFAP91 is essential for normal sperm flagellum structure and function in human and *Trypanosoma* and that biallelic variants in this gene lead to severe flagellum malformations resulting in astheno-teratozoospermia and primary male infertility.

Keywords: genetics; molecular genetics; reproductive medicine.

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

Bi-allelic DNAH8 Variants Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Primary Male Infertility

Chunyu Liu ¹, Haruhiko Miyata ², Yang Gao ³, Yanwei Sha ⁴, Shuyan Tang ⁵, Zoulan Xu ⁶, Marjorie Whitfield ⁷, Catherine Patrat ⁸, Huan Wu ³, Emmanuel Dulioust ⁸, Shixiong Tian ⁵, Keisuke Shimada ², Jiangshan Cong ⁵, Taichi Noda ², Hang Li ³, Akane Morohoshi ⁹, **Caroline Cazin** ¹⁰, Zine-Eddine Kherraf ¹¹, Christophe Arnoult ¹², Li Jin ¹³, Xiaojin He ³, Pierre F Ray ¹¹, Yunxia Cao ³, Aminata Touré ⁷, Feng Zhang ¹⁴, Masahito Ikawa ¹⁵

PMID: **32619401**. PMCID: PMC7413861. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.06.004

Abstract

Sperm malformation is a direct factor for male infertility. Multiple morphological abnormalities of the flagella (MMAF), a severe form of asthenoteratozoospermia, are characterized by immotile spermatozoa with malformed and/or absent flagella in the ejaculate. Previous studies indicated genetic heterogeneity in MMAF. To further define genetic factors underlying MMAF, we performed whole-exome sequencing in a cohort of 90 Chinese MMAF-affected men. Two cases (2.2%) were identified as carrying bi-allelic missense DNAH8 variants, variants which were either absent or rare in the control human population and were predicted to be deleterious by multiple bioinformatic tools. Re-analysis of exome data from a second cohort of 167 MMAF-affected men from France, Iran, and North Africa permitted the identification of an additional male carrying a DNAH8 homozygous frameshift variant. DNAH8 encodes a dynein axonemal heavy-chain component that is expressed preferentially in the testis. Hematoxylin-eosin staining and electron microscopy analyses of the spermatozoa from men harboring bi-allelic DNAH8 variants showed a highly aberrant morphology and ultrastructure of the sperm flagella. Immunofluorescence assays performed on the spermatozoa from men harboring bi-allelic DNAH8 variants revealed the absent or markedly reduced staining of DNAH8 and its associated protein DNAH17. Dnah8-knockout male mice also presented typical MMAF phenotypes and sterility. Interestingly, intracytoplasmic sperm injections using the spermatozoa from Dnah8-knockout male mice resulted in good pregnancy outcomes. Collectively, our experimental observations from humans and mice demonstrate that DNAH8 is essential for sperm flagellar formation and that bi-allelic deleterious DNAH8 variants lead to male infertility with MMAF.

Keywords: CRISPR; DNAH17; DNAH8; ICSI; dynein; exome; flagella; infertility; knockout; sperm.

Copyright © 2020 American Society of Human Genetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

The essential role of intraflagellar transport protein IFT81 in male mice spermiogenesis and fertility

Wei Qu ^{1 2}, Shuo Yuan ^{1 2}, Chao Quan ¹, Qian Huang ^{1 2}, Qi Zhou ^{1 2}, Yitian Yap ², Lin Shi ^{1 2}, David Zhang ³, Tamia Guest ², Wei Li ², Siu-Pok Yee ⁴, Ling Zhang ¹, **Caroline Cazin** ^{5 6}, Rex A Hess ⁷, Pierre F Ray ^{5 6}, Zine-Eddine Kherraf ^{5 6}, Zhibing Zhang ^{2 8}

PMID: **32233951**. PMCID: PMC7311741. DOI: 10.1152/ajpcell.00450.2019

Abstract

Intraflagellar transport (IFT) is an evolutionarily conserved mechanism that is indispensable for the formation and maintenance of cilia and flagella; however, the implications and functions of IFT81 remain unknown. In this study, we disrupted IFT81 expression in male germ cells starting from the spermatocyte stage. As a result, homozygous mutant males were completely infertile and displayed abnormal sperm parameters. In addition to oligozoospermia, spermatozoa presented dysmorphic and nonfunctional flagella. Histological examination of testes from homozygous mutant mice revealed abnormal spermiogenesis associated with sloughing of germ cells and the presence of numerous multinucleated giant germ cells (symblasts) in the lumen of seminiferous tubules and epididymis. Moreover, only few elongated spermatids and spermatozoa were seen in analyzed cross sections. Transmission electron microscopy showed a complete disorganization of the axoneme and para-axonemal structures such as the mitochondrial sheath, fibrous sheath, and outer dense fibers. In addition, numerous vesicles that contain unassembled microtubules were observed within developing spermatids. Acrosome structure analysis showed normal appearance, thus excluding a crucial role of IFT81 in acrosome biogenesis. These observations showed that IFT81 is an important member of the IFT process during spermatogenesis and that its absence is associated with abnormal flagellum formation leading to male infertility. The expression levels of several IFT components in testes, including IFT20, IFT25, IFT27, IFT57, IFT74, and IFT88, but not IFT140, were significantly reduced in homozygous mutant mice. Overall, our study demonstrates that IFT81 plays an essential role during spermatogenesis by modulating the assembly and elongation of the sperm flagella.

Keywords: IFT81; ciliogenesis; germ cell; male infertility.

Biallelic mutations in *CFAP65* cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice

Weiyu Li^{# 1 2 3 4}, Huan Wu^{# 4 5 6}, Fuping Li^{# 7 8}, Shixiong Tian^{1 2}, Zine-Eddine Kherraf^{9 10}, Jintao Zhang¹¹, Xiaoqing Ni^{4 5 6}, Mingrong Lv^{4 5 6}, Chunyu Liu^{1 2 3 4}, Qing Tan^{4 5 6}, Ying Shen¹², Amir Amiri-Yekta^{9 10 13}, **Caroline Cazin**^{9 10}, Jingjing Zhang^{4 5 6}, Wangjie Liu^{1 2 3}, Yan Zheng^{7 8}, Huiru Cheng^{4 5 6}, Yingbi Wu^{7 8}, Jiajia Wang^{4 5 6}, Yang Gao^{4 5 6}, Yujie Chen^{4 5 6}, Xiaomin Zha^{4 5 6}, Li Jin¹, Mingxi Liu¹¹, Xiaojin He^{4 5 6}, Pierre F Ray^{9 10}, Yunxia Cao^{14 5 6}, Feng Zhang^{15 2 3 4}

PMID: **31501240**. DOI: 10.1136/jmedgenet-2019-106344

Abstract

Background: Male infertility is a prevalent issue worldwide, mostly due to the impaired sperm motility. Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) present aberrant spermatozoa with absent, short, coiled, bent and irregular-calibre flagella resulting in severely decreased motility. Previous studies reported several MMAF-associated genes accounting for approximately half of MMAF cases.

Methods and result: We conducted genetic analysis using whole-exome sequencing in 88 Han Chinese MMAF probands. *CFAP65* homozygous mutations were identified in four unrelated consanguineous families, and *CFAP65* compound heterozygous mutations were found in two unrelated cases with MMAF. All these *CFAP65* mutations were null, including four frameshift mutations (c.1775delC [p.Pro592Leufs*8], c.3072_3079dup [p.Arg1027Profs*41], c.1946delC [p.Pro649Argfs*5] and c.1580delT [p.Leu527Argfs*31]) and three stop-gain mutations (c.4855C>T [p.Arg1619*], c.5270T>A [p.Leu1757*] and c.5341G>T [p.Glu1781*]). Additionally, two homozygous *CFAP65* variants likely affecting splicing were identified in two MMAF-affected men of Tunisian and Iranian ancestries, respectively. These biallelic variants of *CFAP65* were verified by Sanger sequencing and were absent or very rare in large data sets aggregating sequence information from various human populations. *CFAP65*, encoding the cilia and flagella associated protein 65, is highly and preferentially expressed in the testis. Here we also generated a frameshift mutation in mouse orthologue *Cfap65* using CRISPR-Cas9 technology. Remarkably, the phenotypes of *Cfap65*-mutated male mice were consistent with human MMAF.

Conclusions: Our experimental observations performed on both human subjects and on *Cfap65*-mutated mice demonstrate that the presence of biallelic mutations in *CFAP65* causes the MMAF phenotype and impairs sperm motility.

Keywords: CFAP65; exome sequencing; male infertility; mouse model; sperm flagella.

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

Mutations in TTC29, Encoding an Evolutionarily Conserved Axonemal Protein, Result in Asthenozoospermia and Male Infertility

Patrick Lorès¹, Denis Dacheux², Zine-Eddine Kherraf³, Jean-Fabrice Nsota Mbango¹, Charles Coutton⁴, Laurence Stouvenel¹, Come laly-Radio¹, Amir Amiri-Yekta⁵, Marjorie Whitfield¹, Alain Schmitt¹, **Caroline Cazin**⁶, Maëlle Givelet¹, Lucile Ferreux⁷, Selima Fourati Ben Mustapha⁸, Lazhar Halouani⁸, Ouafi Marrakchi⁸, Abbas Daneshpour⁵, Elma El Khouri¹, Marcio Do Cruzeiro¹, Maryline Favier¹, François Guillonau¹, Marhaba Chaudhry¹, Zeinab Sakheli¹, Jean-Philippe Wolf⁹, Catherine Patrat⁹, Gérard Gacon¹, Sergey N Savinov¹⁰, Seyedeh Hanieh Hosseini¹¹, Derrick R Robinson¹², Raoudha Zouari⁸, Ahmed Ziyat¹³, Christophe Arnoult⁶, Emmanuel Dulioust⁹, Mélanie Bonhivers¹², Pierre F Ray³, Aminata Touré¹⁴

PMID: **31735292**. PMCID: PMC6904810. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.10.007.

Abstract

In humans, structural or functional defects of the sperm flagellum induce asthenozoospermia, which accounts for the main sperm defect encountered in infertile men. Herein we focused on morphological abnormalities of the sperm flagellum (MMAF), a phenotype also termed "short tails," which constitutes one of the most severe sperm morphological defects resulting in asthenozoospermia. In previous work based on whole-exome sequencing of a cohort of 167 MMAF-affected individuals, we identified bi-allelic loss-of-function mutations in more than 30% of the tested subjects. In this study, we further analyzed this cohort and identified five individuals with homozygous truncating variants in TTC29, a gene preferentially and highly expressed in the testis, and encoding a tetratricopeptide repeat-containing protein related to the intraflagellar transport (IFT). One individual carried a frameshift variant, another one carried a homozygous stop-gain variant, and three carried the same splicing variant affecting a consensus donor site. The deleterious effect of this last variant was confirmed on the corresponding transcript and protein product. In addition, we produced and analyzed TTC29 loss-of-function models in the flagellated protist *T. brucei* and in *M. musculus*. Both models confirmed the importance of TTC29 for flagellar beating. We showed that in *T. brucei* the TPR structural motifs, highly conserved between the studied orthologs, are critical for TTC29 axonemal localization and flagellar beating. Overall our work demonstrates that TTC29 is a conserved axonemal protein required for flagellar structure and beating and that TTC29 mutations are a cause of male sterility due to MMAF.

Keywords: MMAF; TPR; TTC29; asthenozoospermia; flagella; infertility; mouse; sperm; trypanosome.

Copyright © 2019 American Society of Human Genetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Whole exome sequencing of men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella reveals novel homozygous QRICH2 mutations

Zine-Eddine Kherraf ^{1 2}, **Caroline Cazin** ^{1 2}, Charles Coutton ^{1 3}, Amir Amiri-Yekta ^{1 2 4}, Guillaume Martinez ^{1 3}, Magalie Boguenet ¹, Selima Fourati Ben Mustapha ⁵, Mahmoud Kharouf ⁵, Hamid Gourabi ⁴, Seyedeh Hanieh Hosseini ⁶, Abbas Daneshpour ⁴, Aminata Touré ^{7 8 9}, Nicolas Thierry-Mieg ¹⁰, Raoudha Zouari ⁵, Christophe Arnoult ¹, Pierre F Ray ^{1 2}

PMID: **31292949**. DOI: 10.1111/cge.13604

Abstract

Multiple morphological anomalies of the sperm flagella (MMAF syndrome) is a severe male infertility phenotype which has so far been formally linked to the presence of biallelic mutations in nine genes mainly coding for axonemal proteins overexpressed in the sperm flagellum. Homozygous mutations in QRICH2, a gene coding for a protein known to be required for stabilizing proteins involved in sperm flagellum biogenesis, have recently been identified in MMAF patients from two Chinese consanguineous families. Here, in order to better assess the contribution of QRICH2 in the etiology of the MMAF phenotype, we analyzed all QRICH2 variants from whole exome sequencing data of a cohort of 167 MMAF-affected subjects originating from North Africa, Iran, and Europe. We identified a total of 14 potentially deleterious variants in 18 unrelated individuals. Two unrelated subjects, representing 1% of the cohort, carried a homozygous loss-of-function variant: c.3501C>G [p.Tyr1167Ter] and c.4614C>G [p.Tyr1538Ter], thus confirming the implication of QRICH2 in the MMAF phenotype and human male infertility. Sixteen MMAF patients (9.6%) carried a heterozygous QRICH2 potentially deleterious variant. This rate was comparable to what was observed in a control group (15.5%) suggesting that the presence of QRICH2 heterozygous variants is not associated with MMAF syndrome.

Keywords: flagella; gene defects; genetic diagnosis; male infertility; spermatogenesis; whole exome sequencing.

© 2019 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

CFAP70 mutations lead to male infertility due to severe astheno-teratozoospermia. A case report

Julie Beurois ¹, Guillaume Martinez ^{1 2}, **Caroline Cazin** ¹, Zine-Eddine Kherraf ^{1 3}, Amir Amiri-Yekta ⁴, Nicolas Thierry-Mieg ⁵, Marie Bidart ⁶, Graciane Petre ⁶, Véronique Satre ^{1 2}, Sophie Brouillet ⁷, Aminata Touré ^{8 9 10}, Christophe Arnoult ¹, Pierre F Ray ^{1 3}, Charles Coutton ^{1 2}

PMID: **31621862**. DOI: 10.1093/humrep/dez166

Abstract

The use of high-throughput sequencing techniques has allowed the identification of numerous mutations in genes responsible for severe astheno-teratozoospermia due to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). However, more than half of the analysed cases remain unresolved suggesting that many yet uncharacterised gene defects account for this phenotype. Based on whole-exome sequencing data from a large cohort of 167 MMAF-affected subjects, we identified two unrelated affected individuals carrying a homozygous deleterious mutation in CFAP70, a gene not previously linked to the MMAF phenotype. One patient had a homozygous splice variant c.1723-1G>T, altering a consensus splice acceptor site of CFAP70 exon 16, and one had a likely deleterious missense variant in exon 3 (p.Phe60Ile). The CFAP70 gene encodes a regulator protein of the outer dynein arms (ODA) strongly expressed in the human testis. In the sperm cells from the patient carrying the splice variant, immunofluorescence (IF) experiments confirmed the absence of the protein in the sperm flagellum. Moreover, IF analysis showed the absence of markers for the ODAs and the central pair complex of the axoneme. Interestingly, whereas CFAP70 staining was present in sperm cells from patients with mutations in the three other MMAF-related genes ARMC2, FSIP2 and CFAP43, we observed an absence of staining in sperm cells from patients mutated in the WDR66 gene, suggesting a possible interaction between two different axonemal components. In conclusion, this work provides the first evidence that loss of CFAP70 function causes MMAF and that ODA-related proteins may be crucial for the assembly and/or stability of the flagellum axoneme in addition to its motility.

Keywords: CFAP70; MMAF; flagellum; gene mutation; genetics; male infertility; outer dynein arm; whole-exome sequencing.

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

Annexe 3 : Formulaire de consentement utilisé au CHU de Grenoble



Identification du patient prélevé (étiquette)

Article 16-10 du Code civil et articles L.1131-1-2 et L.1111-2 du Code de la Santé Publique, L6211-2, R.1131-4/5 modifiés selon la loi de Bioéthique. Arrêté du 27 mai 2013. Recommandations de BP HAS « délivrance de l'information à la personne sur son état de santé » mai 2012. Décret n° 2013-527 du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale

CONSENTEMENT EN VUE D'UN EXAMEN A FINALITE MEDICALE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES CHEZ UNE PERSONNE

Je soussigné (e), Né(e) le :

Nom JF :

[] patient majeur [] parent ou responsable de : Né(e) le :

Déclare avoir reçu les informations nécessaires du Docteur

ou de la Conseillère en Génétique (sous la responsabilité du Dr..... et par délégation de celui-ci)

Accepte que soient réalisés sur : [] ma personne [] mon enfant [] la personne susnommée

les examens concernant le diagnostic de

[] par analyse cytogénétique / cytogénétique moléculaire

[] par analyse de biologie moléculaire

Ces examens peuvent révéler d'autres affections que celle recherchée initialement chez moi-même.

J'en serai informé uniquement si ces informations comportent un bénéfice direct pour ma personne ou ma famille en l'état actuel des connaissances comme par exemple une possibilité de prévention et /ou de traitement.

Ces examens seront réalisés par des praticiens agréés dans un laboratoire autorisé à cet effet. Les résultats de l'analyse me seront transmis et expliqués par le médecin qui me l'a prescrite.

• Je souhaite / je ne souhaite pas (1) être informé(e) des résultats.

Je déclare être conscient(e) de la signification de l'anomalie éventuellement détectée, pour moi-même, mes proches et mes apparentés et de l'obligation légale de transmettre cette information à mes apparentés si celle-ci peut permettre d'assurer une prévention. Lors du rendu des résultats, je devrai choisir entre assurer moi-même la transmission de l'information génétique aux membres de ma famille ou autoriser le médecin à le faire. Dans ce cas, je lui communiquerai les coordonnées des membres de ma famille.

• J'autorise / je n'autorise pas (1) la conservation des échantillons biologiques prélevés à des fins de diagnostics ultérieurs. Le médecin prescripteur des examens assure la responsabilité de l'utilisation de ces échantillons. Je garde la liberté de demander à tout moment la destruction du matériel biologique conservé.

Dans le cadre de la démarche diagnostique, une partie des échantillons issus du prélèvement peut ne pas être utilisée. Elle peut être importante pour la recherche scientifique.

• J'autorise / je n'autorise pas (1) la conservation des échantillons biologiques et leur utilisation pour la recherche. Conformément à la loi informatique et liberté, les données contenues dans mon dossier médical peuvent faire l'objet d'un traitement informatique et sont protégées par ces dispositions (Loi N° 78-17 de janvier 1978, modifiée). Vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification.

Signature

Fait à

Le

(1) rayer la mention inutile

ATTESTATION DE CONSULTATION MEDICALE

Je soussigné(e), Docteur

ou Conseillère en Génétique (sous la responsabilité du Dr) certifie avoir reçu en consultation ce jour :

Monsieur / Madame, l'enfant,

et avoir apporté les informations définies selon les articles L.1111-2, L.1131-1-2, R.1131-5 du code de la santé publique (caractéristiques de la maladie recherchée, moyens de la détecter, degré de fiabilité des analyses, possibilités de prévention et de traitement, modalités de transmission génétique de la maladie recherchée, possibles conséquences chez d'autres membres de sa famille), et avoir recueilli le consentement éclairé conformément aux articles R.1131-4 du Code de la Santé Publique.

Fait à

, le

Signature du médecin ou de la conseillère en Génétique

Annexe 4 : Communications

JUIN 2022 : 40^E EDITION DU CONGRES ANNUEL DE LA SOCIETE D'ANDROLOGIE DE LANGUE FRANCAISE (SALF)

- Communication orale : Les variants bi-alléliques de *BRME1* sont responsables d'arrêt méiotique complet de la spermatogenèse chez l'homme.

FEVRIER 2022 : 11^E EDITION DES ASSISES DE GENETIQUE HUMAINE ET MEDICALE, RENNES

- Communication orale : Les variants bi-alléliques de *BRME1* sont responsables d'arrêt méiotique complet de la spermatogenèse chez l'homme.
- Communication affichée : Combinaison de l'utilisation du séquençage exomique et de la technologie CRISPR/Cas9 pour étudier l'étiologie de l'azoospermie non-obstructive : Etude de l'implication des gènes *C1orf185* et *CCT6B*

AVRIL 2021 : 4^E EDITION REPROSCIENCES GROUPEMENT DE RECHERCHE DE LA REPRODUCTION (GDR REPRO), EN LIGNE

- Communication orale : Identification et caractérisation du variant causal le plus fréquent du syndrome des spermatozoïdes acéphales.

AVRIL 2019 : 3^E EDITION REPROSCIENCES GROUPEMENT DE RECHERCHE DE LA REPRODUCTION (GDR REPRO), TOULOUSE

- Communication orale et affichée: A novel homozygous variant in *SUN5* disrupts spermatogenesis and leads to acephalic spermatozoa phenotype and Human male infertility.

Références

- Abdelhedi, F., Chalas, C., Petit, J.-M., Abid, N., Mokadem, E., Hizem, S., Kamoun, H., Keskes, L., Dupont, J.-M., 2019. Altered three-dimensional organization of sperm genome in DPY19L2-deficient globozoospermic patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36, 69–77. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1342-y>
- Agarwal, A., Cannarella, R., Saleh, R., Boitrelle, F., Gül, M., Toprak, T., Salvio, G., Arafa, M., Russo, G.I., Harraz, A.M., Singh, R., Garrido, N., Hamoda, T.A.-A.A.-M., Rambhatla, A., Kavoussi, P., Kuroda, S., Çalik, G., Saini, P., Ceyhan, E., Dimitriadis, F., Henkel, R., Crafa, A., Palani, A., Duran, M.B., Maziotis, E., Saïs, É., Bendayan, M., Darbandi, M., Le, T.V., Gunes, S., Tsioulou, P., Sengupta, P., Hazir, B., Çeker, G., Darbandi, S., Durairajanayagam, D., Aghamajidi, A., Alkhalidi, N., Sogutdelen, E., Leisegang, K., Alarbid, A., Ho, C.C.K., Malhotra, V., Finocchi, F., Crisóstomo, L., Kosgi, R., ElBardisi, H., Zini, A., Birowo, P., Colpi, G., Park, H.J., Serefoglu, E.C., Nguyen, Q., Ko, E., de la Rosette, J., Pinggera, G.M., Nguyen, H.V.P., Kandil, H., Shah, R., 2022. Impact of Varicocele Repair on Semen Parameters in Infertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World J. Mens Health.* <https://doi.org/10.5534/wjmh.220142>
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M.R., 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 13. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Al-Agha, A.E., Ahmed, I.A., Nuebel, E., Moriwaki, M., Moore, B., Peacock, K.A., Mosbrugger, T., Neklason, D.W., Jorde, L.B., Yandell, M., Welt, C.K., 2018. Primary Ovarian Insufficiency and Azoospermia in Carriers of a Homozygous PSMC3IP Stop Gain Mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 555–563. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01966>
- AlAsiri, S., Basit, S., Wood-Trageser, M.A., Yatsenko, S.A., Jeffries, E.P., Surti, U., Ketterer, D.M., Afzal, S., Ramzan, K., Faiyaz-Ul Haque, M., Jiang, H., Trakselis, M.A., Rajkovic, A., 2015. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J. Clin. Invest.* 125, 258–262. <https://doi.org/10.1172/JCI78473>
- Alhathal, N., Maddirevula, S., Coskun, S., Alali, H., Assoum, M., Morris, T., Deek, H.A., Hamed, S.A., Alsuhaibani, S., Mirdawi, A., Ewida, N., Al-Qahtani, M., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Altaweel, W., Dasouki, M.J., Assiri, A., Qabbaj, W., Alkuraya, F.S., 2020. A genomics approach to male infertility. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 22, 1967–1975. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0916-0>
- Alimohammadi, F., Ebrahimi Nasab, M., Rafeae, A., Hashemi, M., Totonchi, M., Mohseni Meybodi, A., Sadighi Gilani, M.A., Sabbaghian, M., 2020. Deletion of dpy-19 like 2 (DPY19L2) gene is associated with total but not partial globozoospermia. *Reprod. Fertil. Dev.* 32, 727–737. <https://doi.org/10.1071/RD19025>
- Alsaikhan, B., Alrabeeah, K., Delouya, G., Zini, A., 2016. Epidemiology of varicocele. *Asian J. Androl.* 18, 179–181. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.172640>
- Amann, R.P., 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.* 29, 469–487. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655>
- Amiri-Yekta, A., Coutton, C., Kherraf, Z.-E., Karaouzène, T., Le Tanno, P., Sanati, M.H., Sabbaghian, M., Almadani, N., Gilani, S., Ali, M., Hosseini, S.H., Bahrami, S., Daneshipour, A., Bini, M., Arnoult, C., Colombo, R., Gourabi, H., Ray, P.F., 2016. Whole-exome sequencing of familial cases of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) reveals new DNAH1 mutations. *Hum. Reprod.* 31, 2872–2880. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew262>
- An, M., Liu, Y., Zhang, M., Hu, K., Jin, Y., Xu, S., Wang, H., Lu, M., 2021. Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02154-9>
- Annamalai, J., Namasivayam, V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ. Int.* 76, 78–97. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.006>

- Arafah, K., Lopez, F., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Tassistro, V., Loundou, A., Arnoult, C., Thierry-Mieg, N., Bulet, P., Guichaoua, M.-R., Ray, P.F., 2021. Defect in the nuclear pore membrane glycoprotein 210-like gene is associated with extreme uncondensed sperm nuclear chromatin and male infertility: a case report. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 36, 693–701. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa329>
- Arafat, M., Har-Vardi, I., Harlev, A., Levitas, E., Zeadna, A., Abofoul-Azab, M., Dyomin, V., Sheffield, V.C., Lunenfeld, E., Huleihel, M., Parvari, R., 2017. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J. Med. Genet.* 54, 633–639. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104514>
- Arafat, M., Kleiman, S.E., AbuMadighem, A., Zeadna, A., Levitas, E., Vardi, I.H., Barda, S., Lehavi, O., Hauser, R., Lunenfeld, E., Huleihel, M., Gershoni, M., Parvari, R., 2021. Pathogenic variations in Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase (GCNA) are associated with human male infertility. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 29, 1781–1788. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00946-2>
- Arafat, M., Zeadna, A., Levitas, E., Har Vardi, I., Samuelli, B., Shaco-Levy, R., Dabsan, S., Lunenfeld, E., Huleihel, M., Parvari, R., 2020. Novel mutation in USP26 associated with azoospermia in a Sertoli cell-only syndrome patient. *Mol. Genet. Genomic Med.* 8, e1258. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1258>
- Araujo, T.F., Friedrich, C., Grangeiro, C.H.P., Martelli, L.R., Grzesiuk, J.D., Emich, J., Wyrwoll, M.J., Kliesch, S., Simões, A.L., Tüttelmann, F., 2020. Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: challenges in variant assessment and validating genes. *Andrology* 8, 434–441. <https://doi.org/10.1111/andr.12704>
- Assidi, M., 2022. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* 11, 1711. <https://doi.org/10.3390/cells11101711>
- Auger, J., Eustache, F., David, G., 2012. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 10, 358–373. <https://doi.org/10.1007/BF03034491>
- Auguste, Y., Delague, V., Desvignes, J.-P., Longepied, G., Gnisci, A., Besnier, P., Levy, N., Beroud, C., Megarbane, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M.J., 2018. Loss of Calmodulin- and Radial-Spoke-Associated Complex Protein CFAP251 Leads to Immotile Spermatozoa Lacking Mitochondria and Infertility in Men. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.013>
- Avenarius, M.R., Hildebrand, M.S., Zhang, Y., Meyer, N.C., Smith, L.L.H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Smith, R.J.H., 2009. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.004>
- Avidan, N., Tamary, H., Dgany, O., Cattan, D., Pariente, A., Thulliez, M., Borot, N., Moati, L., Barthelme, A., Shalmon, L., Krasnov, T., Ben-Asher, E., Olender, T., Khen, M., Yaniv, I., Zaizov, R., Shalev, H., Delaunay, J., Fellous, M., Lancet, D., Beckmann, J.S., 2003. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 11, 497–502. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200991>
- Avo Santos, M., van de Werken, C., de Vries, M., Jahr, H., Vromans, M.J.M., Laven, J.S.E., Fauser, B.C., Kops, G.J., Lens, S.M., Baart, E.B., 2011. A role for Aurora C in the chromosomal passenger complex during human preimplantation embryo development. *Hum. Reprod.* 26, 1868–1881. <https://doi.org/10.1093/humrep/der111>
- Ayhan, Ö., Balkan, M., Guven, A., Hazan, R., Atar, M., Tok, A., Tolun, A., 2014. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J. Med. Genet.* 51, 239–244. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102102>
- Bailleul, J., Mauroy, B., 1991. Anatomie du testicule, des voies spermatiques et des bourses. *EMC Urol.* 18-600-A-10.
- Bakker, S.T., van de Vrugt, H.J., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Steltenpool, J., Delzenne-Goette, E., van der Wal, A., van der Valk, M., Joenje, H., te Riele, H., de Winter, J.P., 2009. Fanconi anemia complementation group M mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3484–3495. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp297>

- Barbitoff, Y.A., Plev, D.E., Glotov, A.S., Serebryakova, E.A., Shcherbakova, I.V., Kiselev, A.M., Kostareva, A.A., Glotov, O.S., Predeus, A.V., 2020. Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. *Sci. Rep.* 10, 2057. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59026-y>
- Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P.B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., Rottinghaus, S., Jackson, S.P., Tagle, D., Ried, T., Wynshaw-Boris, A., 1998. Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptoneuma of prophase I. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4007–4017. <https://doi.org/10.1242/dev.125.20.4007>
- Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R., Avila, R., Avendaño, C., Oehninger, S., 2009. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil. Steril.* 92, 835–848. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.06.030>
- Bashamboo, A., Eozenou, C., Rojo, S., McElreavey, K., 2017. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. *Clin. Genet.* 91, 143–156. <https://doi.org/10.1111/cge.12932>
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., de Massy, B., 2010. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 327, 836–840. <https://doi.org/10.1126/science.1183439>
- Bearlly, P., Oates, R., 2019. Recent advances in managing and understanding Klinefelter syndrome. *F1000Research* 8, F1000 Faculty Rev-112. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16747.1>
- Ben Khelifa, M., Coutton, C., Blum, M.G.B., Abada, F., Harbuz, R., Zouari, R., Guichet, A., May-Panloup, P., Mitchell, V., Rollet, J., Triki, C., Merdassi, G., Vialard, F., Kosciński, I., Viville, S., Keskes, L., Soulie, J.P., Rives, N., Dorphin, B., Lestrade, F., Hesters, L., Poirot, C., Benzacken, B., Jouk, P.-S., Satre, V., Hennebicq, S., Arnoult, C., Lunardi, J., Ray, P.F., 2012. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 3337–3346. <https://doi.org/10.1093/humrep/des296>
- Ben Khelifa, M., Ghieh, F., Boudjenah, R., Hue, C., Fauvert, D., Dard, R., Garchon, H.J., Vialard, F., 2018. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 1034–1037. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey073>
- Ben Khelifa, M., Zouari, R., Harbuz, R., Halouani, L., Arnoult, C., Lunardi, J., Ray, P.F., 2011. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 762–768. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar050>
- Ben Khelifa, M., Coutton, C., Zouari, R., Karaouzène, T., Rendu, J., Bidart, M., Yassine, S., Pierre, V., Delaroche, J., Hennebicq, S., Grunwald, D., Escalier, D., Pernet-Gallay, K., Jouk, P.-S., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P.F., 2014. Mutations in DNAH1, which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.017>
- Beurois, J., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Martinez, G., Celse, T., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2020. Genetics of teratozoospermia: Back to the head. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 34, 101473. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101473>
- Beurois, J., Martinez, G., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Thierry-Mieg, N., Bidart, M., Petre, G., Satre, V., Brouillet, S., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2019. CFAP70 mutations lead to male infertility due to severe astheno-teratozoospermia. A case report. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 34, 2071–2079. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez166>
- Bloise, E., Ciarmela, P., Dela Cruz, C., Luisi, S., Petraglia, F., Reis, F.M., 2019. Activin A in Mammalian Physiology. *Physiol. Rev.* 99, 739–780. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2018>
- Boitrelle, F., Shah, R., Saleh, R., Henkel, R., Kandil, H., Chung, E., Vogiatzi, P., Zini, A., Arafa, M., Agarwal, A., 2021. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life* 11, 1368. <https://doi.org/10.3390/life11121368>
- Bonomi, M., Rochira, V., Pasquali, D., Balercia, G., Jannini, E.A., Ferlin, A., 2017. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J. Endocrinol. Invest.* 40, 123–134. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0541-6>

- Bouker, A., Halouani, L., Kharouf, M., Latrous, H., Makni, M., Marrakchi, O., Zouari, R., Fourati, S., 2019. Step-by-step loupes-mTESE in non-obstructive azoospermic men, a retrospective study. *Basic Clin. Androl.* 29, 11. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0091-9>
- Bower, R., Tritschler, D., VanderWaal, K., Perrone, C.A., Mueller, J., Fox, L., Sale, W.S., Porter, M.E., 2013. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol. Biol. Cell* 24, 1134–1152. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0801>
- Brown, S.G., Miller, M.R., Lishko, P.V., Lester, D.H., Publicover, S.J., Barratt, C.L.R., Martins Da Silva, S., 2018. Homozygous in-frame deletion in CATSPERE in a man producing spermatozoa with loss of CatSper function and compromised fertilizing capacity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 1812–1816. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey278>
- Candas, V., Becmeur, F., Bothorel, B., Hoeft, A., 1993. Qualitative assessment of thermal and evaporative adjustments of human scrotal skin in response to heat stress. *Int. J. Androl.* 16, 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01166.x>
- Capalbo, A., Poli, M., Riera-Escamilla, A., Shukla, V., Kudo Høffding, M., Krausz, C., Hoffmann, E.R., Simon, C., 2021. Preconception genome medicine: current state and future perspectives to improve infertility diagnosis and reproductive and health outcomes based on individual genomic data. *Hum. Reprod. Update* 27, 254–279. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa044>
- Carlson, A.E., Quill, T.A., Westenbroek, R.E., Schuh, S.M., Hille, B., Babcock, D.F., 2005. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J. Biol. Chem.* 280, 32238–32244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501430200>
- Carreau, S., 1996. Paracrine control of human Leydig cell and Sertoli cell functions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 34, 111–119.
- Carrell, D.T., Guo, J., Aston, K.I., 2020. The Potential of CRISPR/Cas Gene Editing to Correct Male Infertility, in: Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., Agarwal, A. (Eds.), *Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians*. Springer International Publishing, Cham, pp. 347–367. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37972-8_22
- Cavarocchi, E., Whitfield, M., Chargui, A., Stouvenel, L., Lorès, P., Coutton, C., Arnoult, C., Santulli, P., Patrat, C., Thierry-Mieg, N., Ray, P.F., Dulioust, E., Touré, A., 2021. The sodium/proton exchanger SLC9C1 (sNHE) is essential for human sperm motility and fertility. *Clin. Genet.* 99, 684–693. <https://doi.org/10.1111/cge.13927>
- Cazin, C., Boumerdassi, Y., Martinez, G., Fourati Ben Mustapha, S., Whitfield, M., Coutton, C., Thierry-Mieg, N., Di Pizio, P., Rives, N., Arnoult, C., Touré, A., Ray, P.F., Zouari, R., Sifer, C., Kherraf, Z.-E., 2021a. Identification and Characterization of the Most Common Genetic Variant Responsible for Acephalic Spermatozoa Syndrome in Men Originating from North Africa. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22042187>
- Cazin, C., Neirijnck, Y., Loeuillet, C., Wehrli, L., Kühne, F., Lordey, I., Mustapha, S.F.B., Bouker, A., Zouari, R., Thierry-Mieg, N., Nef, S., Arnoult, C., Ray, P.F., Kherraf, Z.-E., 2021b. Combined Use of Whole Exome Sequencing and CRISPR/Cas9 to Study the Etiology of Non-Obstructive Azoospermia: Demonstration of the Dispensable Role of the Testis-Specific Genes C1orf185 and CCT6B. *Cells* 11, 118. <https://doi.org/10.3390/cells11010118>
- Celse, T., Cazin, C., Mietton, F., Martinez, G., Martinez, D., Thierry-Mieg, N., Septier, A., Guillemain, C., Beurois, J., Clergeau, A., Mustapha, S.F.B., Kharouf, M., Zoghmar, A., Chargui, A., Papaxanthos, A., Dorphin, B., Foliguet, B., Triki, C., Sifer, C., Lauton, D., Tachdjian, G., Schuler, G., Lejeune, H., Puechberty, J., Bessonnat, J., Pasquier, L., Mery, L., Poulain, M., Chaabouni, M., Sermondade, N., Cabry, R., Benbouhadja, S., Veau, S., Frapsauce, C., Mitchell, V., Achard, V., Satre, V., Hennebicq, S., Zouari, R., Arnoult, C., Kherraf, Z.-E., Coutton, C., Ray, P.F., 2020. Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02229-0>
- Chapman, K.M., Medrano, G.A., Jaichander, P., Chaudhary, J., Waits, A.E., Nobrega, M.A., Hotaling, J.M., Ober, C., Hamra, F.K., 2015. Targeted Germline Modifications in Rats using CRISPR/Cas9

- and Spermatogonial Stem Cells. *Cell Rep.* 10, 1828–1835. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.040>
- Charalambous, C., Webster, A., Schuh, M., 2023. Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 27–44. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00517-3>
- Chemes, H.E., Brugo, S., Zanchetti, F., Carrere, C., Lavieri, J.C., 1987. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil. Steril.* 48, 664–669. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59482-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59482-5)
- Chemes, H.E., Puigdomenech, E.T., Carizza, C., Olmedo, S.B., Zanchetti, F., Hermes, R., 1999. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14, 1811–1818. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.7.1811>
- Chen, D., Liang, Y., Li, J., Zhang, X., Zheng, R., Wang, X., Zhang, H., Shen, Y., 2021. A novel CCDC39 mutation causes multiple morphological abnormalities of the flagella in a primary ciliary dyskinesia patient. *Reprod. Biomed. Online* 43, 920–930. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.07.005>
- Chen, H., Zhu, Y., Zhu, Z., Zhi, E., Lu, K., Wang, X., Liu, F., Li, Z., Xia, W., 2018. Detection of heterozygous mutation in hook microtubule-tethering protein 1 in three patients with decapitated and decaudated spermatozoa syndrome. *J. Med. Genet.* 55, 150–157. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104404>
- Chen, M., Yao, C., Qin, Y., Cui, X., Li, P., Ji, Z., Lin, L., Wu, H., Zhou, Z., Gui, Y., Li, Z., Gao, F., 2022. Mutations of MSH5 in nonobstructive azoospermia (NOA) and rescued via in vivo gene editing. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00710-4>
- Chen, P., Saiyin, H., Shi, R., Liu, B., Han, X., Gao, Y., Ye, X., Zhang, X., Sun, Y., 2021. Loss of SPACA1 function causes autosomal recessive globozoospermia by damaging the acrosome–acroplaxome complex. *Hum. Reprod.* 36, 2587–2596. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab144>
- Chen, S., Wang, G., Zheng, X., Ge, S., Dai, Y., Ping, P., Chen, X., Liu, G., Zhang, J., Yang, Y., Zhang, X., Zhong, A., Zhu, Y., Chu, Q., Huang, Y., Zhang, Y., Shen, C., Yuan, Y., Yuan, Q., Pei, X., Cheng, C.Y., Sun, F., 2020. Whole-exome sequencing of a large Chinese azoospermia and severe oligospermia cohort identifies novel infertility causative variants and genes. *Hum. Mol. Genet.* 29, 2451–2459. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa101>
- Cheung, S., Parrella, A., Tavares, D., Keating, D., Xie, P., Rosenwaks, Z., Palermo, G.D., 2021. Single-center thorough evaluation and targeted treatment of globozoospermic men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38, 2073–2086. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02191-4>
- Chianese, C., Fino, M.G., Riera Escamilla, A., López Rodrigo, O., Vinci, S., Guarducci, E., Daguin, F., Muratori, M., Tamburrino, L., Lo Giacco, D., Ars, E., Bassas, L., Costa, M., Pisatauro, V., Noci, I., Coccia, E., Provenzano, A., Ruiz-Castañé, E., Giglio, S., Piomboni, P., Krausz, C., 2015. Comprehensive investigation in patients affected by sperm macrocephaly and globozoospermia. *Andrology* 3, 203–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12016>
- Chiang, H.-S., Wang, Y.-Y., Lin, Y.-H., Wu, Y.-N., 2019. The role of SLC9A3 in Taiwanese patients with congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD). *J. Formos. Med. Assoc.* 118, 1576–1583. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2019.01.019>
- Choi, Y., Jeon, S., Choi, M., Lee, M., Park, M., Lee, D.R., Jun, K.-Y., Kwon, Y., Lee, O.-H., Song, S.-H., Kim, J.-Y., Lee, K.-A., Yoon, T.K., Rajkovic, A., Shim, S.H., 2010. Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia. *Hum. Mutat.* 31, 788–793. <https://doi.org/10.1002/humu.21264>
- Chung, E., Brock, G.B., 2011. Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can. Urol. Assoc. J. J. Assoc. Urol. Can.* 5, 210–214. <https://doi.org/10.5489/cuaj.10106>
- Cioppi, F., Rosta, V., Krausz, C., 2021. Genetics of Azoospermia. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3264. <https://doi.org/10.3390/ijms22063264>

- Clark, M.M., Stark, Z., Farnaes, L., Tan, T.Y., White, S.M., Dimmock, D., Kingsmore, S.F., 2018. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genomic Med.* 3, 16. <https://doi.org/10.1038/s41525-018-0053-8>
- Clavijo, R.I., Arora, H., Gibbs, E., Cohen, S., Griswold, A., Bakircioglu, E., Bademci, G., Tekin, M., Ramasamy, R., 2018. Whole Exome Sequencing of a Consanguineous Turkish Family Identifies a Mutation in GTF2H3 in Brothers With Spermatogenic Failure. *Urology* 120, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2018.06.031>
- Clermont, Y., 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112, 35–51. <https://doi.org/10.1002/aja.1001120103>
- Colombo, R., Pontoglio, A., Bini, M., 2017. Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 82, 283–286. <https://doi.org/10.1159/000468934>
- Cong, J., Wang, X., Amiri-Yekta, A., Wang, L., Kherraf, Z.-E., Liu, C., Cazin, C., Tang, S., Hosseini, S.H., Tian, S., Daneshpour, A., Wang, J., Zhou, Y., Zeng, Y., Yang, S., He, X., Li, J., Cao, Y., Jin, L., Ray, P.F., Zhang, F., 2021. Homozygous mutations in CCDC34 cause male infertility with oligoasthenoteratozoospermia in humans and mice. *J. Med. Genet.* *jmedgenet-2021-107919*. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107919>
- Cools, M., Nordenström, A., Robeva, R., Hall, J., Westerveld, P., Flück, C., Köhler, B., Berra, M., Springer, A., Schweizer, K., Pasterski, V., 2018. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): a Consensus Statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 415–429. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0010-8>
- Corona, G., Minhas, S., Giwercman, A., Bettocchi, C., Dinkelman-Smit, M., Dohle, G., Fusco, F., Kadioglou, A., Kliesch, S., Kopa, Z., Krausz, C., Pelliccione, F., Pizzocaro, A., Rassweiler, J., Verze, P., Vignozzi, L., Weidner, W., Maggi, M., Sofikitis, N., 2019. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 25, 733–757. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz028>
- Coudert, A., Cazin, C., Amiri-Yekta, A., Ben Mustapha, S.F., Zouari, R., Bessonat, J., Zoghmar, A., Clergeau, A., Metzler-Guillemain, C., Triki, C., Lejeune, H., Sermondade, N., Pipiras, E., Prisant, N., Cedrin, I., Koscinski, I., Keskes, L., Lestrade, F., Hesters, L., Rives, N., Dorphin, B., Guichet, A., Patrat, C., Dulioust, E., Feraille, A., Robert, F., Brouillet, S., Morel, F., Perrin, A., Rougier, N., Bieth, E., Sorlin, A., Siffroi, J.-P., Ben Khelifa, M., Boitrelle, F., Hennebicq, S., Satre, V., Arnoult, C., Coutton, C., Barbotin, A.-L., Thierry-Mieg, N., Kherraf, Z.-E., Ray, P.F., 2023. Genetic causes of macrozoospermia and proposal for an optimized genetic diagnosis strategy based on sperm parameters. *J. Genet. Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.04.007>
- Coutton, C., Martinez, G., Kherraf, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Boguenet, M., Saut, A., He, X., Zhang, F., Cristou-Kent, M., Escoffier, J., Bidart, M., Satre, V., Conne, B., Fourati Ben Mustapha, S., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Pernet-Gallay, K., Bonhivers, M., Hennebicq, S., Rives, N., Dulioust, E., Touré, A., Gourabi, H., Cao, Y., Zouari, R., Hosseini, S.H., Nef, S., Thierry-Mieg, N., Arnoult, C., Ray, P.F., 2019. Bi-allelic Mutations in ARMC2 Lead to Severe Astheno-Teratozoospermia Due to Sperm Flagellum Malformations in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.12.013>
- Coutton, C., Vargas, A.S., Amiri-Yekta, A., Kherraf, Z.-E., Mustapha, S.F.B., Tanno, P.L., Wambergue-Legrand, C., Karaouzène, T., Martinez, G., Crouzy, S., Daneshpour, A., Hosseini, S.H., Mitchell, V., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Deleuze, J.-F., Boland, A., Hennebicq, S., Satre, V., Jouk, P.-S., Thierry-Mieg, N., Conne, B., Dacheux, D., Landrein, N., Schmitt, A., Stouvenel, L., Lorès, P., Khouri, E.E., Bottari, S.P., Fauré, J., Wolf, J.-P., Pernet-Gallay, K., Escoffier, J., Gourabi, H., Robinson, D.R., Nef, S., Dulioust, E., Zouari, R., Bonhivers, M., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P.F., 2018. Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in Trypanosoma and human. *Nat. Commun.* 9, 686. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02792-7>
- Coutton, C., Zouari, R., Abada, F., Ben Khelifa, M., Merdassi, G., Triki, C., Escalier, D., Hesters, L., Mitchell, V., Levy, R., Sermondade, N., Boitrelle, F., Vialard, F., Satre, V., Hennebicq, S., Jouk,

- P.-S., Arnoult, C., Lunardi, J., Ray, P.F., 2012. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 2549–2558. <https://doi.org/10.1093/humrep/des160>
- Crafa, A., Condorelli, R.A., La Vignera, S., Calogero, A.E., Cannarella, R., 2023. Globozoospermia: A Case Report and Systematic Review of Literature. *World J. Mens Health* 41, 49–80. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220020>
- Craig, J.R., Jenkins, T.G., Carrell, D.T., Hotaling, J.M., 2017. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertil. Steril.* 107, 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.115>
- da Silva, S.M., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R., 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62–68. <https://doi.org/10.1038/ng0996-62>
- Dai, J., Li, Q., Zhou, Q., Zhang, S., Chen, J., Wang, Y., Guo, J., Gu, Y., Gong, F., Tan, Y., Lu, G., Zheng, W., Lin, G., 2022. IQCN disruption causes fertilization failure and male infertility due to manchette assembly defect. *EMBO Mol. Med.* 14, e16501. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216501>
- Dai, J., Zhang, T., Guo, J., Zhou, Q., Gu, Y., Zhang, J., Hu, L., Zong, Y., Song, J., Zhang, S., Dai, C., Gong, F., Lu, G., Zheng, W., Lin, G., 2021. Homozygous pathogenic variants in ACTL9 cause fertilization failure and male infertility in humans and mice. *Am. J. Hum. Genet.* 108, 469–481. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.02.004>
- Dai, S., Liang, Y., Liu, M., Yang, Y., Liu, H., Shen, Y., 2022. Novel biallelic mutations in TTC29 cause asthenoteratospermia and male infertility. *Mol. Genet. Genomic Med.* 10, e2078. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2078>
- Dam, A.H., Ramos, L., Dijkman, H.B., Woestenenk, R., Robben, H., van den Hoven, L., Kremer, J.A., 2011. Morphology of partial globozoospermia. *J. Androl.* 32, 199–206. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009530>
- Dam, A.H.D.M., Kosciński, I., Kremer, J.A.M., Moutou, C., Jaeger, A.-S., Oudakker, A.R., Tournaye, H., Charlet, N., Lagier-Tourenne, C., van Bokhoven, H., Viville, S., 2007. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 813–820. <https://doi.org/10.1086/521314>
- Datta, U., Wexler, I.D., Kerr, D.S., Raz, I., Patel, M.S., 1999. Characterization of the regulatory region of the human testis-specific form of the pyruvate dehydrogenase alpha-subunit (PDHA-2) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 236–243. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(99\)00158-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(99)00158-x)
- Davie, E., 2012. Un premier enfant à 28 ans. *Insee Prem.* 1–4.
- Davies, B., Baumann, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Nubbemeyer, R., Habenicht, U.-F., Theuring, F., Gottwald, U., 2004. Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8642–8648. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8642-8648.2004>
- de La Rochebrochard, É., 2018. 1 enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France. *Popul. Sociétés* 556, 1–4. <https://doi.org/10.3917/popsoc.556.0001>
- De Rosa, M., Zarrilli, S., Di Sarno, A., Milano, N., Gaccione, M., Boggia, B., Lombardi, G., Colao, A., 2003. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine* 20, 75–82. <https://doi.org/10.1385/ENDO:20:1-2:75>
- de Souza, D.A.S., Faucz, F.R., Pereira-Ferrari, L., Sotomaior, V.S., Raskin, S., 2018. Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens as an Atypical Form of Cystic Fibrosis: Reproductive Implications and Genetic Counseling. *Andrology* 6, 127–135. <https://doi.org/10.1111/andr.12450>
- Délot, E.C., Vilain, E.J., 1993. Nonsyndromic 46,XX Testicular Disorders/Differences of Sex Development, in: Adam, M.P., Everman, D.B., Mirzaa, G.M., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Gripp, K.W., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Deng, T.-Q., Xie, Y.-L., Pu, J.-B., Xuan, J., Li, X.-M., 2022. Compound heterozygous mutations in PMFBP1 cause acephalic spermatozoa syndrome: A case report. *World J. Clin. Cases* 10, 12761–12767. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i34.12761>

- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., Perrin, J., Martinez, D., Sèle, B., Jouk, P.-S., Ohlmann, T., Rousseaux, S., Lunardi, J., Ray, P.F., 2007. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat. Genet.* 39, 661–665. <https://doi.org/10.1038/ng2027>
- Dieterich, K., Zouari, R., Harbuz, R., Vialard, F., Martinez, D., Bellayou, H., Prisant, N., Zoghmar, A., Guichaoua, M.R., Kosciński, I., Kharouf, M., Noruzinia, M., Nadifi, S., Sefiani, A., Lornage, J., Zahi, M., Viville, S., Sèle, B., Jouk, P.-S., Jacob, M.-C., Escalier, D., Nikas, Y., Hennebicq, S., Lunardi, J., Ray, P.F., 2009. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1301–1309. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp029>
- Dil, S., Khan, A., Unar, A., Yang, M.-L., Ali, I., Zeb, A., Zhang, H., Zhou, J.-T., Zubair, M., Khan, K., Bai, S., Shi, Q.-H., 2022. A novel homozygous frameshift variant in DNAH8 causes multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in a consanguineous Pakistani family. *Asian J. Androl.* <https://doi.org/10.4103/aja202274>
- Dirami, T., Rode, B., Jollivet, M., Da Silva, N., Escalier, D., Gaitch, N., Norez, C., Tuffery, P., Wolf, J.-P., Becq, F., Ray, P.F., Dulioust, E., Gacon, G., Bienvenu, T., Touré, A., 2013. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.03.016>
- Dong, F.N., Amiri-Yekta, A., Martinez, G., Saut, A., Tek, J., Stouvenel, L., Lorès, P., Karaouzène, T., Thierry-Mieg, N., Satre, V., Brouillet, S., Daneshpour, A., Hosseini, S.H., Bonhivers, M., Gourabi, H., Dulioust, E., Arnoult, C., Touré, A., Ray, P.F., Zhao, H., Coutton, C., 2018. Absence of CFAP69 Causes Male Infertility due to Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella in Human and Mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 102, 636–648. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.007>
- du Fossé, N.A., van der Hoorn, M.-L.P., van Lith, J.M.M., le Cessie, S., Lashley, E.E.L.O., 2020. Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 26, 650–669. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa010>
- Dupont, C., Faure, C., Daoud, F., Gautier, B., Czernichow, S., Lévy, R., Aknin, I., Cedrin-Durnerin, I., Cens, S., Chavatte-Palmer, P., Herberg, S., Pocate, K., Sermondade, N., Uthurriague, C., Wolf, J.-P., the ALIFERT collaborative group, 2019. Metabolic syndrome and smoking are independent risk factors of male idiopathic infertility. *Basic Clin. Androl.* 29, 9. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0090-x>
- Elfatih, A., Mohammed, I., Abdelrahman, D., Mifsud, B., 2021. Frequency and management of medically actionable incidental findings from genome and exome sequencing data: a systematic review. *Physiol. Genomics* 53, 373–384. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2021>
- ElInati, E., Fossard, C., Okutman, O., Ghédir, H., Ibalá-Romdhane, S., Ray, P.F., Saad, A., Hennebicq, S., Viville, S., 2016. A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 815–820. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0715-3>
- Elinati, E., Kuentz, P., Redin, C., Jaber, S., Vanden Meerschaut, F., Makarian, J., Kosciński, I., Nasr-Esfahani, M.H., Demiroglu, A., Gurgan, T., Louanjli, N., Iqbal, N., Bisharah, M., Pigeon, F.C., Gourabi, H., De Briel, D., Brugnol, F., Gitlin, S.A., Grillo, J.-M., Ghaedi, K., Deemeh, M.R., Tanhaei, S., Modarres, P., Heindryckx, B., Benkhalifa, M., Nikiforaki, D., Oehninger, S.C., De Sutter, P., Muller, J., Viville, S., 2012. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3695–3702. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds200>
- Elkhatib, R.A., Paci, M., Longepied, G., Saias-Magnan, J., Courbière, B., Guichaoua, M.-R., Lévy, N., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M.J., 2017. Homozygous deletion of SUN5 in three men with decapitated spermatozoa. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3167–3171. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx200>

- Escoffier, J., Lee, H.C., Yassine, S., Zouari, R., Martinez, G., Karaouzène, T., Coutton, C., Kherraf, Z.-E., Halouani, L., Triki, C., Nef, S., Thierry-Mieg, N., Savinov, S.N., Fissore, R., Ray, P.F., Arnoult, C., 2016. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Hum. Mol. Genet.* 25, 878–891. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv617>
- Escoffier, J., Yassine, S., Lee, H.C., Martinez, G., Delaroché, J., Coutton, C., Karaouzène, T., Zouari, R., Metzler-Guillemain, C., Pernet-Gallay, K., Hennebicq, S., Ray, P.F., Fissore, R., Arnoult, C., 2015. Subcellular localization of phospholipase C ζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 21, 157–168. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau098>
- Esteves, S.C., 2015. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J. Androl.* 17, 459–470. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.148719>
- Esteves, S.C., Miyaoka, R., Agarwal, A., 2011. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol.* 37, 570–583. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382011000500002>
- Faja, F., Pallotti, F., Cargnelutti, F., Senofonte, G., Carlini, T., Lenzi, A., Lombardo, F., Paoli, D., 2021. Molecular Analysis of DPY19L2, PICK1 and SPATA16 in Italian Unrelated Globozoospermic Men. *Life Basel Switz.* 11, 641. <https://doi.org/10.3390/life11070641>
- Fakhro, K.A., Elbardisi, H., Arafa, M., Robay, A., Rodriguez-Flores, J.L., Al-Shakaki, A., Syed, N., Mezey, J.G., Abi Khalil, C., Malek, J.A., Al-Ansari, A., Al Said, S., Crystal, R.G., 2018. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 20, 1365–1373. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.10>
- Fallara, G., Tang, S., Pang, K.H., Pozzi, E., Belladelli, F., Schifano, N., Capogrosso, P., Alnajjar, H.M., Montorsi, F., Salonia, A., Castiglione, F., Muneer, A., ESSM Scientific Collaboration and Partnership (ESCAP), 2022. Treatment of Persistent or Recurrent Varicoceles: A Systematic Review. *Eur. Urol. Focus* S2405-4569(22)00250–4. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2022.11.008>
- Fan, S., Jiao, Y., Khan, R., Jiang, X., Javed, A.R., Ali, A., Zhang, H., Zhou, J., Naeem, M., Murtaza, G., Li, Y., Yang, G., Zaman, Q., Zubair, M., Guan, H., Zhang, X., Ma, H., Jiang, H., Ali, H., Dil, S., Shah, W., Ahmad, N., Zhang, Y., Shi, Q., 2021. Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 108, 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.01.010>
- Fang, J., Zhang, J., Zhu, F., Yang, X., Cui, Y., Liu, J., 2018. Patients with acephalic spermatozoa syndrome linked to SUN5 mutations have a favorable pregnancy outcome from ICSI. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 372–377. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex382>
- Fatemi, N., Ray, P.F., Ramezanalil, F., Shahani, T., Amiri-Yekta, A., Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Almadani, N., Varkiani, M., Sarmadi, S., Sodeifi, N., Gourabi, H., Biglari, A., Totonchi, M., 2021. KH domain containing 3 like (KHDC3L) frame-shift mutation causes both recurrent pregnancy loss and hydatidiform mole. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 259, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.02.006>
- Fayomi, A.P., Orwig, K.E., 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 29, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Fellmeth, J.E., Ghanaim, E.M., Schindler, K., 2016. Characterization of macrozoospermia-associated AURKC mutations in a mammalian meiotic system. *Hum. Mol. Genet.* 25, 2698–2711. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw128>
- Férec, C., 2021. La mucoviscidose - Du gène à la thérapeutique. *médecine/sciences* 37, 618–624. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021085>
- Fernandez-Gonzalez, A., Kourembanas, S., Wyatt, T.A., Mitsialis, S.A., 2009. Mutation of murine adenylate kinase 7 underlies a primary ciliary dyskinesia phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 305–313. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0102OC>
- Ferreux, L., Bourdon, M., Chargui, A., Schmitt, A., Stouvenel, L., Lorès, P., Ray, P., Lousqui, J., Pocate-Cheriet, K., Santulli, P., Dulioust, E., Toure, A., Patrat, C., 2021. Genetic diagnosis, sperm phenotype and ICSI outcome in case of severe asthenozoospermia with multiple

- morphological abnormalities of the flagellum. *Hum. Reprod.* 36, 2848–2860. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab200>
- Flannigan, R., Schlegel, P.N., 2017. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 44, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.05.002>
- Foresta, C., Ferlin, A., Moro, E., 2000. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1161–1169. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1161>
- Frapsauce, C., Ravel, C., Legendre, M., Sibony, M., Mandelbaum, J., Donadille, B., Achermann, J.C., Siffroi, J.-P., Christin-Maitre, S., 2011. Birth after TESE-ICSI in a man with hypogonadotropic hypogonadism and congenital adrenal hypoplasia linked to a DAX-1 (NR0B1) mutation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26, 724–728. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq372>
- Frintrop, L., Wiesehöfer, C., Stoskus, A., Hilken, G., Dubicanac, M., von Ostau, N.E., Rode, S., Elgeti, J., Dankert, J.T., Wennemuth, G., 2022. cAMP and the Fibrous Sheath Protein CABYR (Ca²⁺-Binding Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Protein) Is Required for 4D Sperm Movement. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10607. <https://doi.org/10.3390/ijms231810607>
- Frohnert, C., Schweizer, S., Hoyer-Fender, S., 2011. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 207–218. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq099>
- Fujihara, Y., Oji, A., Larasati, T., Kojima-Kita, K., Ikawa, M., 2017. Human Globozoospermia-Related Gene Spata16 Is Required for Sperm Formation Revealed by CRISPR/Cas9-Mediated Mouse Models. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2208. <https://doi.org/10.3390/ijms18102208>
- Fujihara, Y., Satouh, Y., Inoue, N., Isotani, A., Ikawa, M., Okabe, M., 2012. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Dev. Camb. Engl.* 139, 3583–3589. <https://doi.org/10.1242/dev.081778>
- Gao, Y., Tian, S., Sha, Y., Zha, X., Cheng, H., Wang, A., Liu, C., Lv, M., Ni, X., Li, Q., Wu, H., Tan, Q., Tang, D., Song, B., Ding, D., Cong, J., Xu, Yuping, Zhou, P., Wei, Z., Cao, Y., Xu, Yuanhong, Zhang, F., He, X., 2021. Novel bi-allelic variants in DNAH2 cause severe asthenoteratozoospermia with multiple morphological abnormalities of the flagella. *Reprod. Biomed. Online* 42, 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.01.011>
- Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P., Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.-L., Guardiola, P., Pernet, K., Debernardi, A., Lopez, F., Holota, H., Imbert, J., Wolgemuth, D.J., Gérard, M., Rousseaux, S., Khochbin, S., 2012. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J.* 31, 3809–3820. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.233>
- Gerlevik, U., Ergoren, M.C., Sezerman, O.U., Temel, S.G., 2022. Structural analysis of M1AP variants associated with severely impaired spermatogenesis causing male infertility. *PeerJ* 10, e12947. <https://doi.org/10.7717/peerj.12947>
- Gershoni, M., Hauser, R., Barda, S., Lehavi, O., Arama, E., Pietrokovski, S., Kleiman, S.E., 2019. A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 34, 666–671. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez016>
- Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., Pietrokovski, S., Kleiman, S.E., 2017. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 19, 998–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.225>
- Ghédér, H., Braham, A., Viville, S., Saad, A., Ibalá-Romdhane, S., 2019. Comparison of sperm morphology and nuclear sperm quality in SPATA16- and DPY19L2-mutated globozoospermic patients. *Andrologia* 51, e13277. <https://doi.org/10.1111/and.13277>
- Ghédér, H., Ibalá-Romdhane, S., Okutman, O., Viot, G., Saad, A., Viville, S., 2016. Identification of a new DPY19L2 mutation and a better definition of DPY19L2 deletion breakpoints leading to globozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 35–45. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav061>
- Ghieh, F., Barbotin, A.-L., Leroy, C., Marcelli, F., Swierkowsky-Blanchard, N., Serazin, V., Mandon-Pepin, B., Vialard, F., 2021. Will whole-genome sequencing become the first-line genetic analysis for

- male infertility in the near future? *Basic Clin. Androl.* 31, 21. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00138-4>
- Ghieh, F., Barbotin, A.L., Swierkowski-Blanchard, N., Leroy, C., Fortemps, J., Gerault, C., Hue, C., Mambu Mambueni, H., Jaillard, S., Albert, M., Bailly, M., Izard, V., Molina-Gomes, D., Marcelli, F., Prasivoravong, J., Serazin, V., Dieudonne, M.N., Delcroix, M., Garchon, H.J., Louboutin, A., Mandon-Pepin, B., Ferlicot, S., Vialard, F., 2022. Whole-exome sequencing in patients with maturation arrest: a potential additional diagnostic tool for prevention of recurrent negative testicular sperm extraction outcomes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 37, 1334–1350. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac057>
- Goel, P., Rawat, J.D., Wakhlu, A., Kureel, S.N., 2015. Undescended testicle: An update on fertility in cryptorchid men. *Indian J. Med. Res.* 141, 163–171. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.155544>
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O.R., Ramos, I., García-Tuñón, I., de Rooij, D.G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J.L., Benavente, R., Llano, E., Pendas, A.M., 2016. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat. Commun.* 7, 13298. <https://doi.org/10.1038/ncomms13298>
- Gong, C., Abbas, T., Muhammad, Z., Zhou, J., Khan, R., Ma, H., Zhang, H., Shi, Q., Shi, B., 2022. A Homozygous Loss-of-Function Mutation in MSH5 Abolishes MutSy Axial Loading and Causes Meiotic Arrest in NOA-Affected Individuals. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6522. <https://doi.org/10.3390/ijms23126522>
- González-Martínez, J., Cwetsch, A.W., Martínez-Alonso, D., López-Sainz, L.R., Almagro, J., Melati, A., Gómez, J., Pérez-Martínez, M., Megías, D., Boskovic, J., Gilabert-Juan, J., Graña-Castro, O., Pierani, A., Behrens, A., Ortega, S., Malumbres, M., 2021. Deficient adaptation to centrosome duplication defects in neural progenitors causes microcephaly and subcortical heterotopias. *JCI Insight* 6, e146364. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146364>
- Graves, J.A.M., Wakefield, M.J., Toder, R., 1998. The Origin and Evolution of the Pseudoautosomal Regions of Human Sex Chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1991–1996. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.1991>
- Guo, T., Tu, C.-F., Yang, D.-H., Ding, S.-Z., Lei, C., Wang, R.-C., Liu, L., Kang, X., Shen, X.-Q., Yang, Y.-F., Tan, Z.-P., Tan, Y.-Q., Luo, H., 2021. Bi-allelic BRWD1 variants cause male infertility with asthenoteratozoospermia and likely primary ciliary dyskinesia. *Hum. Genet.* 140, 761–773. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02241-4>
- Guo, Y., Jiang, J., Zhang, Haotian, Wen, Y., Zhang, Hao, Cui, Y., Tian, J., Jiang, M., Liu, X., Wang, G., Li, Y., Hu, Z., Zhou, Z., Sha, J., Chen, D., Yang, X., Guo, X., 2019. Proteomic Analysis of Dpy19l2-Deficient Human Globozoospermia Reveals Multiple Molecular Defects. *Proteomics Clin. Appl.* 13, e1900007. <https://doi.org/10.1002/prca.201900007>
- Gurney, J.K., McGlynn, K.A., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J., Sarfati, D., 2017. Risk factors for cryptorchidism. *Nat. Rev. Urol.* 14, 534–548. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.90>
- Guthauser, B., Vialard, F., Dakouane, M., Izard, V., Albert, M., Selva, J., 2006. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil. Steril.* 85, 750.e5-750.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1334>
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortés, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., Wilson, D.I., 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 91, 403–407. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00307-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00307-x)
- Hao, S.-L., Ni, F.-D., Yang, W.-X., 2019. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 706, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Harbuz, R., Zouari, R., Pierre, V., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Coutton, C., Merdassi, G., Abada, F., Escoffier, J., Nikas, Y., Vialard, F., Kosciński, I., Triki, C., Sermondade, N., Schweitzer, T., Zhioua, A., Zhioua, F., Latrous, H., Halouani, L., Ouafi, M., Makni, M., Jouk, P.-S., Sèle, B., Hennebicq, S., Satre, V., Viville, S., Arnoult, C., Lunardi, J., Ray, P.F., 2011. A Recurrent Deletion of DPY19L2

- Causes Infertility in Man by Blocking Sperm Head Elongation and Acrosome Formation. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.007>
- Hardy, J.J., Wyrwoll, M.J., Mcfadden, W., Malcher, A., Rotte, N., Pollock, N.C., Munyoki, S., Veroli, M.V., Houston, B.J., Xavier, M.J., Kasak, L., Punab, M., Laan, M., Kliesch, S., Schlegel, P., Jaffe, T., Hwang, K., Vukina, J., Brieño-Enríquez, M.A., Orwig, K., Yanowitz, J., Buszczak, M., Veltman, J.A., Oud, M., Nagirnaja, L., Olszewska, M., O'Bryan, M.K., Conrad, D.F., Kurpisz, M., Tüttelmann, F., Yatsenko, A.N., GEMINI Consortium, 2021. Variants in GCNA, X-linked germ-cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure. *Hum. Genet.* 140, 1169–1182. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02287-y>
- Harrison, C.J., Schwab, C., 2016. Constitutional abnormalities of chromosome 21 predispose to iAMP21-acute lymphoblastic leukaemia. *Eur. J. Med. Genet., Special Issue: Acute lymphoblastic leukemia prone syndromes* 59, 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.01.006>
- Harton, G.L., Tempest, H.G., 2012. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J. Androl.* 14, 32–39. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.66>
- He, W.-B., Tu, C.-F., Liu, Q., Meng, L.-L., Yuan, S.-M., Luo, A.-X., He, F.-S., Shen, J., Li, W., Du, J., Zhong, C.-G., Lu, G.-X., Lin, G., Fan, L.-Q., Tan, Y.-Q., 2018. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J. Med. Genet.* 55, 198–204. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104992>
- He, X., Li, W., Wu, H., Lv, M., Liu, W., Liu, C., Zhu, F., Li, C., Fang, Y., Yang, C., Cheng, H., Zhang, J., Tan, J., Chen, T., Tang, D., Song, B., Wang, X., Zha, X., Wang, H., Wei, Z., Yang, S., Saiyin, H., Zhou, P., Jin, L., Wang, J., Zhang, Z., Zhang, F., Cao, Y., 2019. Novel homozygous CFAP69 mutations in humans and mice cause severe asthenoteratospermia with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *J. Med. Genet.* 56, 96–103. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105486>
- Heinlein, C.A., Chang, C., 2002. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Mol. Endocrinol.* 16, 2181–2187. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0070>
- Heller, C.G., Clermont, Y., 1963. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science* 140, 184–186. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.184>
- Hermo, L., Robaire, B., 2002. Epididymal Cell Types and Their Functions, in: Robaire, B., Hinton, B.T. (Eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens*. Springer US, Boston, MA, pp. 81–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0679-9_5
- Hess, R.A., de Franca, L.R., 2008. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium, in: Cheng, C.Y. (Ed.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY, pp. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Heuser, T., Dymek, E.E., Lin, J., Smith, E.F., Nicastro, D., 2012. The CSC connects three major axonemal complexes involved in dynein regulation. *Mol. Biol. Cell* 23, 3143–3155. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0357>
- Hodžić, A., Maver, A., Plaseska-Karanfilska, D., Ristanović, M., Noveski, P., Zorn, B., Terzic, M., Kunej, T., Peterlin, B., 2021. De novo mutations in idiopathic male infertility-A pilot study. *Andrology* 9, 212–220. <https://doi.org/10.1111/andr.12897>
- Homan, G.F., Davies, M., Norman, R., 2007. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum. Reprod. Update* 13, 209–223. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml056>
- Hoque, M., Chen, D., Hess, R.A., Li, F.-Q., Takemaru, K.-I., 2021. CEP164 is essential for efferent duct multiciliogenesis and male fertility. *Reprod. Camb. Engl.* 162, 129–139. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0042>
- Hou, M., Xi, Q., Zhu, L., Jia, W., Liu, Z., Wang, C., Zhou, X., Zhang, D., Xing, C., Peng, X., Luo, Y., Jin, L., Li, Z., Zhang, X., 2022. Novel Compound Heterozygous Mutation in FSIP2 Causes Multiple

- Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella (MMAF) and Male Infertility. *Reprod. Sci.* 29, 2697–2702. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00965-4>
- Howards, S.S., 1997. Antoine van Leeuwenhoek and the discovery of sperm. *Fertil. Steril.* 67, 16–17. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81848-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81848-1)
- Hoyer-Fender, S., 2022. Development of the Connecting Piece in ODF1-Deficient Mouse Spermatids. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10280. <https://doi.org/10.3390/ijms231810280>
- Hu, H.-Y., Wei, T.-Y., Feng, Z.-K., Li, S.-J., Zhao, R., Yi, X.-L., Hu, T.-L., Zhao, H., Li, C.-X., Liu, Z.-G., 2021. Novel Biallelic DNAH1 Variations Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *DNA Cell Biol.* 40, 833–840. <https://doi.org/10.1089/dna.2021.0097>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., Dinh, A., 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum. Immunol., Next Generation Sequencing and its Application to Medical Laboratory Immunology* 82, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hu, T.-Y., Zhang, H., Meng, L.-L., Yuan, S.-M., Tu, C.-F., Du, J., Lu, G.-X., Lin, G., Nie, H.-C., Tan, Y.-Q., 2021. Novel homozygous truncating variants in ZMYND15 causing severe oligozoospermia and their implications for male infertility. *Hum. Mutat.* 42, 31–36. <https://doi.org/10.1002/humu.24138>
- Hua, J., Wan, Y., 2019. Whole-exome sequencing identified a novel mutation of AURKC in a Chinese family with macrozoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36, 529–534. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1374-3>
- Huang, G., Zhang, X., Yao, G., Huang, L., Wu, S., Li, X., Guo, J., Wen, Y., Wang, Y., Shang, L., Li, N., Xu, W., 2022. A loss-of-function variant in SSFA2 causes male infertility with globozoospermia and failed oocyte activation. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 20, 103. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00976-5>
- Huang, Q., Li, W., Zhou, Q., Awasthi, P., Cazin, C., Yap, Y., Mladenovic-Lucas, L., Hu, B., Jeyasuria, P., Zhang, L., Granneman, J.G., Hess, R.A., Ray, P.F., Kherraf, Z.-E., Natarajan, V., Zhang, Z., 2021. Leucine zipper transcription factor-like 1 (LZTFL1), an intraflagellar transporter protein 27 (IFT27) associated protein, is required for normal sperm function and male fertility. *Dev. Biol.* 477, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.05.006>
- Huang, T., Yin, Y., Liu, C., Li, M., Yu, X., Wang, X., Zhang, H., Muhammad, T., Gao, F., Li, W., Chen, Z.-J., Liu, H., Ma, J., 2020. Absence of murine CFAP61 causes male infertility due to multiple morphological abnormalities of the flagella. *Sci. Bull.* 65, 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.01.023>
- Huhtaniemi, I., Teerds, K., 2018. Leydig Cells, in: Skinner, M.K. (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 30–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0>
- Hussain, Shah, Nawaz, S., Khan, I., Khan, N., Hussain, Shabir, Ullah, I., Fakhro, K.A., Ahmad, W., 2022. A novel homozygous variant in homologous recombination repair gene ZSWIM7 causes azoospermia in males and primary ovarian insufficiency in females. *Eur. J. Med. Genet.* 65, 104629. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104629>
- Hwang, J.Y., Nawaz, S., Choi, J., Wang, H., Hussain, S., Nawaz, M., Lopez-Giraldez, F., Jeong, K., Dong, W., Oh, J.-N., Bilguvar, K., Mane, S., Lee, C.-K., Bystrhoff, C., Lifton, R.P., Ahmad, W., Chung, J.-J., 2021. Genetic Defects in DNAH2 Underlie Male Infertility With Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella in Humans and Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 662903. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662903>
- Ito, C., Akutsu, H., Yao, R., Yoshida, K., Yamatoya, K., Mutoh, T., Makino, T., Aoyama, K., Ishikawa, H., Kunimoto, K., Tsukita, S., Noda, T., Kikkawa, M., Toshimori, K., 2019. Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice. *Sci. Rep.* 9, 14249. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50516-2>
- Jégou, B., Rolland, A.D., 2018. Sertoli Cell, in: Skinner, M.K. (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 24–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64359-3>

- Jensen, C.F.S., Østergren, P., Dupree, J.M., Ohl, D.A., Sønksen, J., Fode, M., 2017. Varicocele and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 14, 523–533. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.98>
- Jia, M., Shi, R., Xue, X., 2021. Novel DNAH17 mutations associated with fertilization failures after ICSI. *Gynecol. Endocrinol.* 37, 769–771. <https://doi.org/10.1080/09513590.2021.1937979>
- Jiang, C., Zhang, X., Zhang, H., Guo, J., Zhang, C., Li, J., Yang, Y., 2021. Novel bi-allelic mutations in DNAH1 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella resulting in male infertility. *Transl. Androl. Urol.* 10, 1656–1664. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1434>
- Jiang, L.-Y., Yang, L.-Y., Tong, X.-M., Zhu, H.-Y., Xue, Y.-M., Xu, W.-Z., Yang, Y., Zhang, S.-Y., 2015. Intracytoplasmic Sperm Injection Fertilization Rate Does Not Depend on the Proportion of Round-headed Sperm, Small-acrosomal Sperm, or Morphologically Normal Sperm in Patients with Partial Globozoospermia. *Chin. Med. J. (Engl.)* 128, 1590–1595. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.158310>
- Jiao, S.-Y., Yang, Y.-H., Chen, S.-R., 2021. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum. Reprod. Update* 27, 154–189. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa034>
- Jorgez, C.J., Wilken, N., Addai, J.B., Newberg, J., Vangapandu, H.V., Pastuszak, A.W., Mukherjee, S., Rosenfeld, J.A., Lipshultz, L.I., Lamb, D.J., 2015. Genomic and genetic variation in E2F transcription factor-1 in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 103, 44-52.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.021>
- Juul, A., Almstrup, K., Andersson, A.-M., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Main, K.M., Rajpert-De Meyts, E., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2014. Possible fetal determinants of male infertility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 553–562. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.97>
- K, L., G, W., M, L., J, W., Y, G., F, Tang, C, X., W, Y., H, Y., Z, S., H, G., Q, T., Q, S., D, T., X, N., T, W., B, S., H, W., R, H., Z, Z., Y, X., P, Z., F, Tao, Z, W., X, H., Y, C., 2022. Bi-allelic variants in DNAH10 cause asthenoteratozoospermia and male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02306-x>
- Karaca, N., Yilmaz, R., Kantan, G.E., Kervancioglu, E., Solakoglu, S., Kervancioglu, M.E., 2014. First successful pregnancy in a globozoospermic patient having homozygous mutation in SPATA16. *Fertil. Steril.* 102, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.002>
- Kasak, L., Punab, M., Nagirnaja, L., Grigorova, M., Minajeva, A., Lopes, A.M., Punab, A.M., Aston, K.I., Carvalho, F., Laasik, E., Smith, L.B., GEMINI Consortium, Conrad, D.F., Laan, M., 2018. Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.005>
- Kashimada, K., Koopman, P., 2010. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3921–3930. <https://doi.org/10.1242/dev.048983>
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>
- Khan, I., Dil, S., Zhang, H., Zhang, B., Khan, T., Zeb, A., Zhou, J., Nawaz, S., Zubair, M., Khan, K., Ma, H., Shi, Q., 2021a. A novel stop-gain mutation in ARMC2 is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Reprod. Biomed. Online* 43, 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.07.021>
- Khan, I., Shah, B., Dil, S., Ullah, N., Zhou, J.-T., Zhao, D.-R., Zhang, Y.-W., Jiang, X.-H., Khan, R., Khan, A., Ali, H., Zubair, M., Shah, W., Zhang, H., Shi, Q.-H., 2021b. Novel biallelic loss-of-function mutations in CFAP43 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagellum in Pakistani families. *Asian J. Androl.* 23, 627–632. https://doi.org/10.4103/aja.aja_26_21
- Khan, M.J., Pollock, N., Jiang, H., Castro, C., Nazli, R., Ahmed, J., Basit, S., Rajkovic, A., Yatsenko, A.N., 2018. X-linked ADGRG2 mutation and obstructive azoospermia in a large Pakistani family. *Sci. Rep.* 8, 16280. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34262-5>
- Khan, R., Zaman, Q., Chen, J., Khan, Manan, Ma, A., Zhou, J., Zhang, B., Ali, A., Naeem, M., Zubair, M., Zhao, D., Shah, W., Khan, Mazhar, Zhang, Y., Xu, B., Zhang, H., Shi, Q., 2021. Novel Loss-of-

- Function Mutations in DNAH1 Displayed Different Phenotypic Spectrum in Humans and Mice. *Front. Endocrinol.* 12, 765639. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.765639>
- Khandwala, Y.S., Zhang, C.A., Lu, Y., Eisenberg, M.L., 2017. The age of fathers in the USA is rising: an analysis of 168 867 480 births from 1972 to 2015. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 2110–2116. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex267>
- Khawar, M.B., Gao, H., Li, W., 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>
- Kherraf, Z.-E., 2018. Exploration génétique et moléculaire de défauts post-méiotiques sévères de la spermatogenèse entraînant une infertilité masculine (phdthesis). Université Grenoble Alpes.
- Kherraf, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Dacheux, D., Karaouzene, T., Coutton, C., Christou-Kent, M., Martinez, G., Landrein, N., Le Tanno, P., Fourati Ben Mustapha, S., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Pernet-Gallay, K., Gourabi, H., Robinson, D.R., Crouzy, S., Blum, M., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Zouari, R., Arnoult, C., Bonhivers, M., Ray, P.F., 2018a. A Homozygous Ancestral SVA-Insertion-Mediated Deletion in WDR66 Induces Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagellum and Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 400–412. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.014>
- Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Bouker, A., Fourati Ben Mustapha, S., Hennebicq, S., Septier, A., Coutton, C., Raymond, L., Nouchy, M., Thierry-Mieg, N., Zouari, R., Arnoult, C., Ray, P.F., 2022a. Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 109, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.01.011>
- Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Coutton, C., Amiri-Yekta, A., Martinez, G., Boguenet, M., Fourati Ben Mustapha, S., Kharouf, M., Gourabi, H., Hosseini, S.H., Daneshpour, A., Touré, A., Thierry-Mieg, N., Zouari, R., Arnoult, C., Ray, P.F., 2019. Whole exome sequencing of men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella reveals novel homozygous QRICH2 mutations. *Clin. Genet.* 96, 394–401. <https://doi.org/10.1111/cge.13604>
- Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Lestrade, F., Muronova, J., Coutton, C., Arnoult, C., Thierry-Mieg, N., Ray, P.F., 2022b. From azoospermia to macrozoospermia, a phenotypic continuum due to mutations in the ZMYND15 gene. *Asian J. Androl.* <https://doi.org/10.4103/aja202194>
- Kherraf, Z.-E., Christou-Kent, M., Karaouzene, T., Amiri-Yekta, A., Martinez, G., S Vargas, A., Lambert, E., Borel, C., Dorphin, B., Akinin-Seifer, I., Mitchell, M., Metzler-Guillemain, C., Escoffier, J., Nef, S., Grepillat, M., Thierry-Mieg, N., Satre, V., Bailly, M., Boitrelle, F., Arnoult, C., 2017. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol. Med.* 9, e201607461. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607461>
- Kherraf, Z.-E., Conne, B., Amiri-Yekta, A., Kent, M.C., Coutton, C., Escoffier, J., Nef, S., Arnoult, C., Ray, P.F., 2018b. Creation of knock out and knock in mice by CRISPR/Cas9 to validate candidate genes for human male infertility, interest, difficulties and feasibility. *Mol. Cell. Endocrinol., The impact of new technologies in our understanding of gonadal formation and function* 468, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.002>
- Kim, J., Ishiguro, K., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A.M., Takeda, N., Sakakibara, Y., Kitajima, T.S., Tanno, Y., Sakuno, T., Watanabe, Y., 2015. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* 517, 466–471. <https://doi.org/10.1038/nature14097>
- Kim, Jihye, Kwon, J.T., Jeong, J., Kim, Jaehwan, Hong, S.H., Kim, Jinyoung, Park, Z.Y., Chung, K.H., Eddy, E.M., Cho, C., 2018. SPATC1L maintains the integrity of the sperm head-tail junction. *EMBO Rep.* 19, e45991. <https://doi.org/10.15252/embr.201845991>
- Kim, W.J., Kim, B.S., Kim, H.J., Cho, Y.D., Shin, H.L., Yoon, H.I., Lee, Y.S., Baek, J.-H., Woo, K.M., Ryoo, H.-M., 2020. Intratesticular Peptidyl Prolyl Isomerase 1 Protein Delivery Using Cationic Lipid-Coated Fibroin Nanoparticle Complexes Rescues Male Infertility in Mice. *ACS Nano* 14, 13217–13231. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04936>
- Kimmins, S., Crosio, C., Kotaja, N., Hirayama, J., Monaco, L., Höög, C., van Duin, M., Gossen, J.A., Sassone-Corsi, P., 2007. Differential Functions of the Aurora-B and Aurora-C Kinases in

- Mammalian Spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* 21, 726–739. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0332>
- Klinefelter, H.F., JR., Reifenstein, E.C., JR., Albright, F., JR., 1942. Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2, 615–627. <https://doi.org/10.1210/jcem-2-11-615>
- Kmonickova, V., Frolikova, M., Steger, K., Komrskova, K., 2020. The Role of the LINC Complex in Sperm Development and Function. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9058. <https://doi.org/10.3390/ijms21239058>
- Knarston, I.M., Robevska, G., van den Bergen, J.A., Eggers, S., Croft, B., Yates, J., Hersmus, R., Looijenga, L.H.J., Cameron, F.J., Monhike, K., Ayers, K.L., Sinclair, A.H., 2019. NR5A1 gene variants repress the ovarian-specific WNT signaling pathway in 46,XX disorders of sex development patients. *Hum. Mutat.* 40, 207–216. <https://doi.org/10.1002/humu.23672>
- Kobayashi, D., Takeda, H., 2012. Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differ. Res. Biol. Divers.* 83, S23-29. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.009>
- Kortenkamp, A., Scholze, M., Ermler, S., Priskorn, L., Jørgensen, N., Andersson, A.-M., Frederiksen, H., 2022. Combined exposures to bisphenols, polychlorinated dioxins, paracetamol, and phthalates as drivers of deteriorating semen quality. *Environ. Int.* 165, 107322. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107322>
- Koscinski, I., Elinati, E., Fossard, C., Redin, C., Muller, J., Velez de la Calle, J., Schmitt, F., Ben Khelifa, M., Ray, P.F., Kilani, Z., Barratt, C.L.R., Viville, S., 2011. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.01.018>
- Krahn, M., Lévy, N., Bartoli, M., 2016. Le séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, ou NGS) appliqué au diagnostic de maladies monogéniques hétérogènes - Notions essentielles pour le dialogue entre cliniciens et généticiens. *Cah. Myol.* 31–33. <https://doi.org/10.1051/myolog/201613008>
- Krausz, C., Casamonti, E., 2017. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum. Genet.* 136, 637–655. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1793-8>
- Krausz, C., Riera-Escamilla, A., 2018. Genetics of male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 15, 369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Chianese, C., Moreno-Mendoza, D., Ars, E., Rajmil, O., Pujol, R., Bogliolo, M., Blanco, I., Rodríguez, I., Badell, I., Ruiz-Castañé, E., Surrallés, J., 2019. From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 21, 189–194. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0037-1>
- Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Moreno-Mendoza, D., Holleman, K., Cioppi, F., Algaba, F., Pybus, M., Friedrich, C., Wyrwoll, M.J., Casamonti, E., Pietroforte, S., Nagirnaja, L., Lopes, A.M., Kliesch, S., Pilatz, A., Carrell, D.T., Conrad, D.F., Ars, E., Ruiz-Castañé, E., Aston, K.I., Baarends, W.M., Tüttelmann, F., 2020. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 22, 1956–1966. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0907-1>
- Kuentz, P., Vanden Meerschaut, F., Elinati, E., Nasr-Esfahani, M.H., Gurgan, T., Iqbal, N., Carré-Pigeon, F., Brugnol, F., Gitlin, S.A., Velez de la Calle, J., Kilani, Z., De Sutter, P., Viville, S., 2013. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 1054–1061. <https://doi.org/10.1093/humrep/det005>
- Kumar, N., Singh, A.K., 2021. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biol. Reprod.* 104, 508–520. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa213>
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 22, 305–309.

- Kuo, P.-L., Chiang, H.-S., Wang, Y.-Y., Kuo, Y.-C., Chen, M.-F., Yu, I.-S., Teng, Y.-N., Lin, S.-W., Lin, Y.-H., 2013. SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 22102–22116. <https://doi.org/10.3390/ijms141122102>
- Kuroda, S., Usui, K., Sanjo, H., Takeshima, T., Kawahara, T., Uemura, H., Yumura, Y., 2020. Genetic disorders and male infertility. *Reprod. Med. Biol.* 19, 314–322. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12336>
- Kusz-Zamelczyk, K., Sajek, M., Spik, A., Glazar, R., Jędrzejczak, P., Latos-Bieleńska, A., Kotecki, M., Pawelczyk, L., Jaruzelska, J., 2013. Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligoastheno-teratozoospermia. *J. Med. Genet.* 50, 187–193. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101230>
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., Weitzman, M.D., 2010. The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS Lett.* 584, 3682–3695. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.029>
- Lanfranco, F., Kamischke, A., Zitzmann, M., Nieschlag, E., 2004. Klinefelter's syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 364, 273–283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16678-6)
- Lapoirie, M., Dijoud, F., Lejeune, H., Plotton, I., 2021. Effect of androgens on Sertoli cell maturation in human testis from birth to puberty. *Basic Clin. Androl.* 31, 31. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00150-8>
- Lehti, M.S., Sironen, A., 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol. Reprod.* 97, 522–536. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>
- Lei, C., Yang, D., Wang, R., Ding, S., Wang, L., Guo, T., Luo, H., 2022. DRC1 deficiency caused primary ciliary dyskinesia and MMAF in a Chinese patient. *J. Hum. Genet.* 67, 197–201. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00985-z>
- Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., Henkel, R., 2021. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia* 53, e13617. <https://doi.org/10.1111/and.13617>
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Jolles, M., Pinotti, R., Swan, S.H., 2022. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum. Reprod. Update* dmac035. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac035>
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., Swan, S.H., 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum. Reprod. Update* 23, 646–659. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>
- Li, K., Wang, G., Lv, M., Wang, J., Gao, Y., Tang, F., Xu, C., Yang, W., Yu, H., Shao, Z., Geng, H., Tan, Q., Shen, Q., Tang, D., Ni, X., Wang, T., Song, B., Wu, H., Huo, R., Zhang, Z., Xu, Y., Zhou, P., Tao, F., Wei, Z., He, X., Cao, Y., 2022. Bi-allelic variants in DNAH10 cause asthenoteratozoospermia and male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39, 251–259. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02306-x>
- Li, L., Sha, Y., Wang, X., Li, P., Wang, J., Kee, K., Wang, B., 2017. Whole-exome sequencing identified a homozygous BRDT mutation in a patient with acephalic spermatozoa. *Oncotarget* 8, 19914–19922. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15251>
- Li, L., Sha, Y.-W., Xu, X., Mei, L.-B., Qiu, P.-P., Ji, Z.-Y., Lin, S.-B., Su, Z.-Y., Wang, C., Yin, C., Li, P., 2018. DNAH6 is a novel candidate gene associated with sperm head anomaly. *Andrologia* 50, e12953. <https://doi.org/10.1111/and.12953>
- Li, W., He, X., Yang, S., Liu, C., Wu, H., Liu, W., Lv, M., Tang, D., Tan, J., Tang, S., Chen, Y., Wang, J., Zhang, Z., Wang, H., Jin, L., Zhang, F., Cao, Y., 2019. Biallelic mutations of CFAP251 cause sperm flagellar defects and human male infertility. *J. Hum. Genet.* 64, 49–54. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0520-1>
- Li, W., Wu, H., Li, F., Tian, S., Kherraf, Z.-E., Zhang, Jintao, Ni, X., Lv, M., Liu, C., Tan, Q., Shen, Y., Amiri-Yekta, A., Cazin, C., Zhang, Jingjing, Liu, W., Zheng, Y., Cheng, H., Wu, Y., Wang, J., Gao, Y., Chen, Y., Zha, X., Jin, L., Liu, M., He, X., Ray, P.F., Cao, Y., Zhang, F., 2020. Biallelic mutations in CFAP65 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in

- humans and mice. *J. Med. Genet.* 57, 89–95. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106344>
- Li, Y., Li, C., Lin, S., Yang, B., Huang, W., Wu, H., Chen, Y., Yang, L., Luo, M., Guo, H., Chen, J., Wang, T., Ma, Q., Gu, Y., Mou, L., Jiang, Z., Xia, J., Gui, Y., 2017. A nonsense mutation in *Ccdc62* gene is responsible for spermiogenesis defects and male infertility in *repro29/repro29* mice. *Biol. Reprod.* 96, 587–597. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141408>
- Li, Y., Sha, Y., Wang, X., Ding, L., Liu, W., Ji, Z., Mei, L., Huang, X., Lin, S., Kong, S., Lu, J., Qin, W., Zhang, X., Zhuang, J., Tang, Y., Lu, Z., 2019. *DNAH2* is a novel candidate gene associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin. Genet.* 95, 590–600. <https://doi.org/10.1111/cge.13525>
- Li, Yaqian, Wang, Y., Wen, Y., Zhang, T., Wang, X., Jiang, C., Zheng, R., Zhou, F., Chen, D., Yang, Y., Shen, Y., 2021. Whole-exome sequencing of a cohort of infertile men reveals novel causative genes in teratozoospermia that are chiefly related to sperm head defects. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 37, 152–177. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab229>
- Li, Yang, Wu, Y., Zhou, J., Zhang, H., Zhang, Y., Ma, H., Jiang, X., Shi, Q., 2021. A recurrent *ZSWIM7* mutation causes male infertility resulting from decreased meiotic recombination. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 36, 1436–1445. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab046>
- Li, Y.-Z., Li, N., Liu, W.-S., Sha, Y.-W., Wu, R.-F., Tang, Y.-L., Zhu, X.-S., Wei, X.-L., Zhang, X.-Y., Wang, Y.-F., Lu, Z.-X., Zhang, F.-X., 2022. Biallelic mutations in spermatogenesis and centriole-associated 1 like (*SPATC1L*) cause acephalic spermatozoa syndrome and male infertility. *Asian J. Androl.* 24, 67–72. https://doi.org/10.4103/aja.aja_56_21
- Li, Y.-Z., Wu, R.-F., Zhu, X.-S., Liu, W.-S., Ye, Y.-Y., Lu, Z.-X., Li, N., 2020. Identification of a novel deletion mutation in *DPY19L2* from an infertile patient with globozoospermia: a case report. *Mol. Cytogenet.* 13, 24. <https://doi.org/10.1186/s13039-020-00495-1>
- Lightbody, G., Haberland, V., Browne, F., Taggart, L., Zheng, H., Parkes, E., Blayney, J.K., 2019. Review of applications of high-throughput sequencing in personalized medicine: barriers and facilitators of future progress in research and clinical application. *Brief. Bioinform.* 20, 1795–1811. <https://doi.org/10.1093/bib/bby051>
- Lim, S.L., Qu, Z.P., Kortschak, R.D., Lawrence, D.M., Geoghegan, J., Hempfling, A.-L., Bergmann, M., Goodnow, C.C., Ormandy, C.J., Wong, L., Mann, J., Scott, H.S., Jamsai, D., Adelson, D.L., O’Bryan, M.K., 2015. *HENMT1* and piRNA Stability Are Required for Adult Male Germ Cell Transposon Repression and to Define the Spermatogenic Program in the Mouse. *PLoS Genet.* 11, e1005620. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005620>
- Lin, C.-H., Huang, T.-Y., 2020. Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) with bilaterally present seminal vesicles. *Urol. Case Rep.* 31, 101131. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2020.101131>
- Lin, Y.-H., Lin, Y.-M., Wang, Y.-Y., Yu, I.-S., Lin, Y.-W., Wang, Y.-H., Wu, C.-M., Pan, H.-A., Chao, S.-C., Yen, P.H., Lin, S.-W., Kuo, P.-L., 2009. The expression level of *septin12* is critical for spermiogenesis. *Am. J. Pathol.* 174, 1857–1868. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080955>
- Linck, R.W., Chemes, H., Albertini, D.F., 2016. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 141–156. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0652-1>
- Liu, Chunyu, He, X., Liu, W., Yang, S., Wang, L., Li, W., Wu, H., Tang, S., Ni, X., Wang, J., Gao, Y., Tian, S., Zhang, L., Cong, J., Zhang, Z., Tan, Q., Zhang, J., Li, H., Zhong, Y., Lv, M., Li, J., Jin, L., Cao, Y., Zhang, F., 2019. Bi-allelic Mutations in *TTC29* Cause Male Subfertility with Asthenoteratospermia in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* 105, 1168–1181. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.10.010>
- Liu, C., Lv, M., He, X., Zhu, Y., Amiri-Yekta, A., Li, W., Wu, H., Kherraf, Z.-E., Liu, W., Zhang, J., Tan, Q., Tang, S., Zhu, Y.-J., Zhong, Y., Li, C., Tian, S., Zhang, Z., Jin, L., Ray, P., Zhang, F., Cao, Y., 2020a. Homozygous mutations in *SPEF2* induce multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and male infertility. *J. Med. Genet.* 57, 31–37. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106011>

- Liu, C., Miyata, H., Gao, Y., Sha, Y., Tang, S., Xu, Z., Whitfield, M., Patrat, C., Wu, H., Dulioust, E., Tian, S., Shimada, K., Cong, J., Noda, T., Li, H., Morohoshi, A., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Arnoult, C., Jin, L., He, X., Ray, P.F., Cao, Y., Touré, A., Zhang, F., Ikawa, M., 2020b. Bi-allelic DNAH8 Variants Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Primary Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* 107, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.004>
- Liu, C., Shen, Y., Tang, S., Wang, J., Zhou, Y., Tian, S., Wu, H., Cong, J., He, X., Jin, L., Cao, Y., Yang, Y., Zhang, F., 2023. Homozygous variants in AKAP3 induce asthenoteratozoospermia and male infertility. *J. Med. Genet.* 60, 137–143. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-108271>
- Liu, C., Tu, C., Wang, L., Wu, H., Houston, B.J., Mastroianni, F.K., Zhang, W., Shen, Y., Wang, J., Tian, S., Meng, L., Cong, J., Yang, S., Jiang, Y., Tang, S., Zeng, Y., Lv, M., Lin, G., Li, J., Saiyin, H., He, X., Jin, L., Touré, A., Ray, P.F., Veltman, J.A., Shi, Q., O'Bryan, M.K., Cao, Y., Tan, Y.-Q., Zhang, F., 2021. Deleterious variants in X-linked CFAP47 induce asthenoteratozoospermia and primary male infertility. *Am. J. Hum. Genet.* 108, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.01.002>
- Liu, G., Shi, Q.-W., Lu, G.-X., 2010. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J. Androl.* 12, 556–560. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.47>
- Liu, G., Wang, N., Zhang, H., Yin, S., Dai, H., Lin, G., Li, W., 2020. Novel mutations in PMFBP1, TSGA10 and SUN5: Expanding the spectrum of mutations that may cause acephalic spermatozoa. *Clin. Genet.* 97, 938–939. <https://doi.org/10.1111/cge.13747>
- Liu, G., Xing, X., Zhang, H., Zhu, W., Lin, G., Lu, G., Li, W., 2021. Patients with acephalic spermatozoa syndrome linked to novel TSGA10/PMFBP1 variants have favorable pregnancy outcomes from intracytoplasmic sperm injection. *Clin. Genet.* 100, 334–339. <https://doi.org/10.1111/cge.14007>
- Liu, G., Yin, X., Xing, X., Yin, S., Shen, Y., Zhang, H., Lin, G., Lu, G., Li, W., 2022. Novel mutation in TTC21A triggers partial nonsense-mediated mRNA decay and causes male infertility with MMAF. *Clin. Genet.* 102, 459–460. <https://doi.org/10.1111/cge.14197>
- Liu, M., Li, J., Jiang, C., Zhou, Y., Sun, Y., Yang, Y., Shen, Y., 2022. A novel homozygous mutation in DNAJB13—a gene associated with the sperm axoneme—leads to teratozoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39, 757–764. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02431-1>
- Liu, M., Ru, Y., Gu, Y., Tang, J., Zhang, T., Wu, J., Yu, F., Yuan, Y., Xu, C., Wang, J., Shi, H., 2018. Disruption of Ssp411 causes impaired sperm head formation and male sterility in mice. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862, 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.005>
- Liu, M., Sun, Y., Li, Y., Sun, J., Yang, Y., Shen, Y., 2021. Novel mutations in FSIP2 lead to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and poor ICSI prognosis. *Gene* 781, 145536. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145536>
- Liu, S., Zhang, J., Kherraf, Z.E., Sun, S., Zhang, X., Cazin, C., Coutton, C., Zouari, R., Zhao, S., Hu, F., Fourati Ben Mustapha, S., Arnoult, C., Ray, P.F., Liu, M., 2021. CFAP61 is required for sperm flagellum formation and male fertility in human and mouse. *Dev. Camb. Engl.* 148, dev199805. <https://doi.org/10.1242/dev.199805>
- Liu, Wangjie, He, X., Yang, S., Zouari, R., Wang, J., Wu, H., Kherraf, Z.-E., Liu, C., Coutton, C., Zhao, R., Tang, D., Tang, S., Lv, M., Fang, Y., Li, W., Li, H., Zhao, J., Wang, X., Zhao, S., Zhang, J., Arnoult, C., Jin, L., Zhang, Z., Ray, P.F., Cao, Y., Zhang, F., 2019. Bi-allelic Mutations in TTC21A Induce Asthenoteratozoospermia in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.02.020>
- Liu, Wensheng, Sha, Y., Li, Y., Mei, L., Lin, S., Huang, X., Lu, J., Ding, L., Kong, S., Lu, Z., 2019. Loss-of-function mutations in SPEF2 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *J. Med. Genet.* 56, 678–684. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105952>
- Liu, X., Han, R., Ma, J., Wu, J., Song, X., Zhang, Z., Gao, Z., Zhang, X., 2017. [Mutation analysis and treatment of a case with globozoospermia]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin. J. Med. Genet.* 34, 764–766. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2017.05.031>
- Liu, Y., Lei, C., Wang, R., Yang, D., Yang, B., Xu, Y., Lu, C., Wang, L., Ding, S., Guo, T., Liu, S., Luo, H., 2022. Case Report: Whole-Exome Sequencing-Based Copy Number Variation Analysis Identified a

- Novel DRC1 Homozygous Exon Deletion in a Patient With Primary Ciliary Dyskinesia. *Front. Genet.* 13, 940292. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.940292>
- Liu, Z., Wang, C., Ni, F., Yang, F., Wei, H., Li, T., Wang, J., Wang, B., 2022. Novel compound heterozygous variants of DNAH17 in a Chinese infertile man with multiple morphological abnormalities of sperm flagella. *Andrologia* 54, e14553. <https://doi.org/10.1111/and.14553>
- Loeuillet, C., Dhellemmes, M., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Fourati Ben Mustapha, S., Zouari, R., Thierry-Mieg, N., Arnoult, C., Ray, P.F., 2022. A recurrent ZP1 variant is responsible for oocyte maturation defect with degenerated oocytes in infertile females. *Clin. Genet.* 102, 22–29. <https://doi.org/10.1111/cge.14144>
- Long, J., Huang, C., Chen, Y., Zhang, Y., Shi, S., Wu, L., Liu, Y., Liu, C., Wu, J., Lei, M., 2017. Telomeric TERB1–TRF1 interaction is crucial for male meiosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3496>
- Lorès, P., Coutton, C., El Khouri, E., Stouvenel, L., Givelet, M., Thomas, L., Rode, B., Schmitt, A., Louis, B., Sakheli, Z., Chaudhry, M., Fernandez-Gonzales, A., Mitsialis, A., Dacheux, D., Wolf, J.-P., Papon, J.-F., Gacon, G., Escudier, E., Arnoult, C., Bonhivers, M., Savinov, S.N., Amselem, S., Ray, P.F., Dulioust, E., Touré, A., 2018. Homozygous missense mutation L673P in adenylate kinase 7 (AK7) leads to primary male infertility and multiple morphological anomalies of the flagella but not to primary ciliary dyskinesia. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1196–1211. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy034>
- Lorès, P., Dacheux, D., Kherraf, Z.-E., Nsota Mbango, J.-F., Coutton, C., Stouvenel, L., Ialy-Radio, C., Amiri-Yekta, A., Whitfield, M., Schmitt, A., Cazin, C., Givelet, M., Ferreux, L., Fourati Ben Mustapha, S., Halouani, L., Marrakchi, O., Daneshpour, A., El Khouri, E., Do Cruzeiro, M., Favier, M., Guillonneau, F., Chaudhry, M., Sakheli, Z., Wolf, J.-P., Patrat, C., Gacon, G., Savinov, S.N., Hosseini, S.H., Robinson, D.R., Zouari, R., Ziyat, A., Arnoult, C., Dulioust, E., Bonhivers, M., Ray, P.F., Touré, A., 2019. Mutations in TTC29, Encoding an Evolutionarily Conserved Axonemal Protein, Result in Asthenozoospermia and Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* 105, 1148–1167. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.10.007>
- Lorès, P., Kheraff, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Whitfield, M., Daneshpour, A., Stouvenel, L., Cazin, C., Cavarocchi, E., Coutton, C., Llabador, M.-A., Arnoult, C., Thierry-Mieg, N., Ferreux, L., Patrat, C., Hosseini, S.-H., Mustapha, S.F.B., Zouari, R., Dulioust, E., Ray, P.F., Touré, A., 2021. A missense mutation in IFT74, encoding for an essential component for intraflagellar transport of Tubulin, causes asthenozoospermia and male infertility without clinical signs of Bardet-Biedl syndrome. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02270-7>
- Lou, Z., Minter-Dykhhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W., Chen, J., 2006. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* 21, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.025>
- Lu, M., Kong, S., Xiang, M., Wang, Y., Zhang, J., Duan, Z., Zha, X., Wang, F., Cao, Y., Zhu, F., 2021. A novel homozygous missense mutation of PMFBP1 causes acephalic spermatozoa syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38, 949–955. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02075-7>
- Lu, S., Gu, Y., Wu, Y., Yang, S., Li, C., Meng, L., Yuan, W., Jiang, T., Zhang, X., Li, Y., Wang, C., Liu, M., Ye, L., Guo, X., Shen, H., Yang, X., Tan, Y., Hu, Z., 2021. Bi-allelic variants in human WDR63 cause male infertility via abnormal inner dynein arms assembly. *Cell Discov.* 7, 110. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00327-5>
- Lu, X.-M., Liu, Y.-B., Zhang, D.-D., Cao, X., Zhang, T.-C., Liu, M., Shi, H.-J., Dong, X., Liu, S.-Y., 2022. Effect of advanced paternal age on reproductive outcomes in IVF cycles of non-male-factor infertility: a retrospective cohort study. *Asian J. Androl.* <https://doi.org/10.4103/aja202234>
- Luo, G., Hou, M., Wang, B., Liu, Z., Liu, W., Han, T., Zhang, D., Zhou, X., Jia, W., Tan, Y., Wu, Y., Wang, J., Zhang, X., 2021. Tsga10 is essential for arrangement of mitochondrial sheath and male fertility in mice. *Andrology* 9, 368–375. <https://doi.org/10.1111/andr.12889>

- Luo, T., Zhi, H.-J., Wu, Q.-Y., Li, W.-W., Zhu, P.-R., Jiang, W.-J., Zhao, G.-G., Wang, F., Xia, X.-Y., Yao, Q., 2020. [Detection of DPY19L2 gene mutation in 2 cases of globozoospermia]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* 26, 620–624.
- Lv, M., Liu, W., Chi, W., Ni, X., Wang, J., Cheng, H., Li, W.-Y., Yang, S., Wu, H., Zhang, Junqiang, Gao, Y., Liu, C., Li, C., Yang, C., Tan, Q., Tang, D., Zhang, Jingjing, Song, B., Chen, Y.-J., Li, Q., Zhong, Y., Zhang, Z., Saiyin, H., Jin, L., Xu, Y., Zhou, P., Wei, Z., Zhang, C., He, X., Zhang, F., Cao, Y., 2020. Homozygous mutations in DZIP1 can induce asthenoteratospermia with severe MMAF. *J. Med. Genet.* 57, 445–453. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106479>
- Ma, A., Zeb, A., Ali, I., Zhao, D., Khan, A., Zhang, B., Zhou, J., Khan, R., Zhang, H., Zhang, Y., Khan, I., Shah, W., Ali, H., Javed, A.R., Ma, H., Shi, Q., 2022. Biallelic Variants in CFAP61 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella and Male Infertility. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 803818. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.803818>
- Ma, H., Zhang, B., Khan, A., Zhao, D., Ma, A., Zhou, J., Khan, I., Khan, K., Zhang, H., Zhang, Y., Jiang, X., Dil, S., Zeb, A., Rahim, F., Shi, Q., 2021. Novel frameshift mutation in STK33 is associated with asthenozoospermia and multiple morphological abnormalities of the flagella. *Hum. Mol. Genet.* 30, 1977–1984. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab165>
- Ma, Q., Li, Y., Guo, H., Li, C., Chen, J., Luo, M., Jiang, Z., Li, H., Gui, Y., 2016. A Novel Missense Mutation in USP26 Gene Is Associated With Nonobstructive Azoospermia. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 23, 1434–1441. <https://doi.org/10.1177/1933719116641758>
- Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M.M., Kumar, T.R., 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17294–17299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404743101>
- Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Gallaud, E., Giet, R., 2019. Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond. *Biomolecules* 9, 28. <https://doi.org/10.3390/biom9010028>
- Maiburg, M., Repping, S., Giltay, J., 2012. The genetic origin of Klinefelter syndrome and its effect on spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 98, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.019>
- Malcher, A., Stokowy, T., Berman, A., Olszewska, M., Jedrzejczak, P., Sielski, D., Nowakowski, A., Rozwadowska, N., Yatsenko, A.N., Kurpisz, M.K., 2022. Whole-genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia. *Andrology* 10, 1605–1624. <https://doi.org/10.1111/andr.13269>
- Mantovani, G., De Menis, E., Borretta, G., Radetti, G., Bondioni, S., Spada, A., Persani, L., Beck-Peccoz, P., 2006. DAX1 and X-linked adrenal hypoplasia congenita: clinical and molecular analysis in five patients. *Eur. J. Endocrinol.* 154, 685–689. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02132>
- Maor-Sagie, E., Cinnamon, Y., Yaacov, B., Shaag, A., Goldsmidt, H., Zenvirt, S., Laufer, N., Richler, C., Frumkin, A., 2015. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 887–891. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0445-y>
- Marchiani, S., Tamburrino, L., Muratori, M., Baldi, E., 2020. Spermatozoal Chromatin Structure: Role in Sperm Functions and Fertilization, in: Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., Agarwal, A. (Eds.), *Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians*. Springer International Publishing, Cham, pp. 39–55. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37972-8_3
- Mark, M., Teletin, M., Vernet, N., Ghyselinck, N.B., 2015. Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.019>
- Martinez, G., Barbotin, A.-L., Cazin, C., Wehbe, Z., Boursier, A., Amiri-Yekta, A., Daneshpour, A., Hosseini, S.-H., Rives, N., Feraille, A., Thierry-Mieg, N., Bidart, M., Satre, V., Arnoult, C., Ray, P.F., Kherraf, Z.-E., Coutton, C., 2023. New Mutations in DNHD1 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2559. <https://doi.org/10.3390/ijms24032559>
- Martinez, G., Beurois, J., Dacheux, D., Cazin, C., Bidart, M., Kherraf, Z.-E., Robinson, D.R., Satre, V., Gac, G.L., Ka, C., Gourlaouen, I., Fichou, Y., Petre, G., Dulioust, E., Zouari, R., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Arnoult, C., Bonhivers, M., Ray, P., Coutton, C., 2020. Biallelic variants in MAATS1 encoding

- CFAP91, a calmodulin-associated and spoke-associated complex protein, cause severe astheno-teratozoospermia and male infertility. *J. Med. Genet.* <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106775>
- Martinez, G., Coutton, C., Loeuillet, C., Cazin, C., Muroňová, J., Bogueuet, M., Lambert, E., Dhellemmes, M., Chevalier, G., Hograindleur, J.-P., Vilpreux, C., Neirijnck, Y., Kherraf, Z.-E., Escoffier, J., Nef, S., Ray, P.F., Arnoult, C., 2022a. Oligogenic heterozygous inheritance of sperm abnormalities in mouse. *eLife* 11, e75373. <https://doi.org/10.7554/eLife.75373>
- Martinez, G., Kherraf, Z.-E., Zouari, R., Fourati Ben Mustapha, S., Saut, A., Pernet-Gallay, K., Bertrand, A., Bidart, M., Hograindleur, J.P., Amiri-Yekta, A., Kharouf, M., Karaouzène, T., Thierry-Mieg, N., Dacheux-Deschamps, D., Satre, V., Bonhivers, M., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2018. Whole-exome sequencing identifies mutations in FSIP2 as a recurrent cause of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 1973–1984. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey264>
- Martinez, G., Metzler-Guillemain, C., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Paulmyer-Lacroix, O., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2022b. Expanding the sperm phenotype caused by mutations in SPATA20: A novel splicing mutation in an infertile patient with partial globozoospermia. *Clin. Genet.* n/a. <https://doi.org/10.1111/cge.14284>
- Martins, L.R., Bung, R.K., Koch, S., Richter, K., Schwarzmüller, L., Terhardt, D., Kurtulmus, B., Niehrs, C., Rouhi, A., Lohmann, I., Pereira, G., Fröhling, S., Glimm, H., Scholl, C., 2018. Stk33 is required for spermatid differentiation and male fertility in mice. *Dev. Biol.* 433, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.11.007>
- Matzuk, M.M., Lamb, D.J., 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 14, 1197–1213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>
- Mayer, C., Adam, M., Walenta, L., Schmid, N., Heikelä, H., Schubert, K., Flenkenthaler, F., Dietrich, K.-G., Gruschka, S., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Schwarzer, J.U., Köhn, F.M., Strauss, L., Welter, H., Poutanen, M., Mayerhofer, A., 2018. Insights into the role of androgen receptor in human testicular peritubular cells. *Andrology* 6, 756–765. <https://doi.org/10.1111/andr.12509>
- Mazuy, M., Barbieri, M., Breton, D., d'Albis, H., 2015. L'évolution démographique récente de la France et ses tendances depuis 70 ans. *Population* 70, 417–486. <https://doi.org/10.3917/popu.1503.0417>
- Meachem, S.J., Nieschlag, E., Simoni, M., 2001. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 561–571. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1450561>
- Mendoza-Lujambio, I., Burfeind, P., Dixkens, C., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S., Engel, W., Neesen, J., 2002. The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1647–1658. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.14.1647>
- Merisalu, A., Punab, M., Altmäe, S., Haller, K., Tiido, T., Peters, M., Salumets, A., 2007. The contribution of genetic variations of aryl hydrocarbon receptor pathway genes to male factor infertility. *Fertil. Steril.* 88, 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.041>
- Miao, X.-Y., Zhang, X., 2011. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415, 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.044>
- Mieusset, R., Bujan, L., 1995. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int. J. Androl.* 18, 169–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00408.x>
- Miller, D.T., Lee, K., Abul-Husn, N.S., Amendola, L.M., Brothers, K., Chung, W.K., Gollob, M.H., Gordon, A.S., Harrison, S.M., Hershberger, R.E., Klein, T.E., Richards, C.S., Stewart, D.R., Martin, C.L., 2022. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* 24, 1407–1414. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.04.006>
- Mima, M., Greenwald, D., Ohlander, S., 2018. Environmental Toxins and Male Fertility. *Curr. Urol. Rep.* 19, 50. <https://doi.org/10.1007/s11934-018-0804-1>

- Miyamoto, T., Bando, Y., Koh, E., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Iijima, M., Namiki, M., Shiina, M., Ogata, K., Matsumoto, N., Sengoku, K., 2016. A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome. *Andrology* 4, 75–81. <https://doi.org/10.1111/andr.12113>
- Mobasserri, N., Babaei, F., Karimian, M., Nikzad, H., 2018. Androgen receptor (AR)-CAG trinucleotide repeat length and idiopathic male infertility: a case-control trial and a meta-analysis. *EXCLI J.* 17, 1167–1179. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1744>
- Modarres, P., Tanhaei, S., Tavalaei, M., Ghaedi, K., Deemeh, M.R., Nasr-Esfahani, M.H., 2016. Assessment of DPY19L2 Deletion in Familial and Non-Familial Individuals with Globozoospermia and DPY19L2 Genotyping. *Int. J. Fertil. Steril.* 10, 196–207. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4910>
- Morel, F., Douet-Guilbert, N., Moerman, A., Duban, B., Marchetti, C., Delobel, B., Le Bris, M.-J., Amice, V., De Braekeleer, M., 2004. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 835–838. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah111>
- Mou, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Y., Jiang, T., Huang, W., Li, Z., Chen, J., Xie, J., Liu, Y., Jiang, Z., Li, X., Ye, J., Cai, Z., Gui, Y., 2013. A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Hum. Genet.* 132, 159–165. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1234-7>
- Mou, L., Xie, N., Yang, L., Liu, Y., Diao, R., Cai, Z., Li, H., Gui, Y., 2015. A Novel Mutation of DAX-1 Associated with Secretory Azoospermia. *PLoS One* 10, e0133997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133997>
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2015. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr. Rev.* 36, 564–591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B.P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D.G., Vicini, E., 2013. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. *Biol. Reprod.* 89, 60, 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111682>
- Nagirnaja, L., Mørup, N., Nielsen, J.E., Stakaitis, R., Golubickaite, I., Oud, M.S., Winge, S.B., Carvalho, F., Aston, K.I., Khani, F., van der Heijden, G.W., Marques, C.J., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Schlegel, P.N., Jørgensen, N., Veltman, J.A., Lopes, A.M., Conrad, D.F., Almstrup, K., 2021. Variant PNLDC1, Defective piRNA Processing, and Azoospermia. *N. Engl. J. Med.* 385, 707–719. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028973>
- Nakamura, S., Kobori, Y., Ueda, Y., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Yoshida, A., Katsumi, M., Saito, K., Nakamura, A., Ogata, T., Okada, H., Nakai, H., Miyado, M., Fukami, M., 2018. STX2 is a causative gene for nonobstructive azoospermia. *Hum. Mutat.* 39, 830–833. <https://doi.org/10.1002/humu.23423>
- Nakamura, S., Miyado, M., Saito, K., Katsumi, M., Nakamura, A., Kobori, Y., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Yoshida, A., Okada, H., Hata, K., Nakabayashi, K., Okamura, K., Ogata, H., Matsubara, Y., Ogata, T., Nakai, H., Fukami, M., 2017. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology* 5, 824–831. <https://doi.org/10.1111/andr.12378>
- Neesen, J., Kirschner, R., Ochs, M., Schmiedl, A., Habermann, B., Mueller, C., Holstein, A.F., Nuesslein, T., Adham, I., Engel, W., 2001. Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1117–1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.11.1117>
- Ni, X., Wang, J., Lv, M., Liu, C., Zhong, Y., Tian, S., Wu, H., Cheng, H., Gao, Y., Tan, Q., Chen, B., Li, Q., Song, B., Wei, Z., Zhou, P., He, X., Zhang, F., Cao, Y., 2020. A novel homozygous mutation in WDR19 induces disorganization of microtubules in sperm flagella and nonsyndromic asthenoteratospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 37, 1431–1439. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01770-1>
- Nie, H., Tang, Y., Qin, W., 2020. Beyond Acephalic Spermatozoa: The Complexity of Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes. *BioMed Res. Int.* 2020, 6279795. <https://doi.org/10.1155/2020/6279795>

- Nie, H., Tang, Y., Zhang, X., Tan, Y., Qin, W., 2022. Novel mutations of PMFBP1 in a man with acephalic spermatozoa defects. *Mol. Genet. Genomic Med.* 10, e2020. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2020>
- Nistal, M., Paniagua, R., Herruzo, A., 1977. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 26, 111–118. <https://doi.org/10.1007/bf02889540>
- Noveski, P., Madjunkova, S., Maleva, I., Sotiroska, V., Petanovski, Z., Plaseska-Karanfilska, D., 2013. A Homozygous Deletion of the DPY19L2 Gene is a Cause of Globozoospermia in Men from the Republic of Macedonia. *Balk. J. Med. Genet. BJMG* 16, 73–76. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2013-0021>
- Obermann, H., Samalecos, A., Osterhoff, C., Schröder, B., Heller, R., Kirchhoff, C., 2003. HE6, a two-subunit heptahelical receptor associated with apical membranes of efferent and epididymal duct epithelia. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 13–26. <https://doi.org/10.1002/mrd.10220>
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., 2011. Spermiation. *Spermatogenesis* 1, 14–35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>
- O'Donnell, L., O'Bryan, M.K., 2014. Microtubules and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 30, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.003>
- Okutman, O., Muller, J., Baert, Y., Serdarogullari, M., Gultomruk, M., Piton, A., Rombaut, C., Benkhalifa, M., Teletin, M., Skory, V., Bakircioglu, E., Goossens, E., Bahceci, M., Viville, S., 2015. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5581–5588. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv290>
- Okutman, O., Muller, J., Skory, V., Garnier, J.M., Gaucherot, A., Baert, Y., Lamour, V., Serdarogullari, M., Gultomruk, M., Röpke, A., Kliesch, S., Herbein, V., Akin, I., Benkhalifa, M., Teletin, M., Bakircioglu, E., Goossens, E., Charlet-Berguerand, N., Bahceci, M., Tüttelmann, F., Viville, S., 2017. A no-stop mutation in MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family. *J. Assist. Reprod. Genet.* 34, 683–694. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0900-z>
- Olesen, I.A., Andersson, A.-M., Aksglaede, L., Skakkebaek, N.E., Rajpert-de Meyts, E., Joergensen, N., Juul, A., 2017. Clinical, genetic, biochemical, and testicular biopsy findings among 1,213 men evaluated for infertility. *Fertil. Steril.* 107, 74–82.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.015>
- Ortega, V., Oyanedel, J., Fleck-Lavergne, D., Horta, F., Mercado-Campero, A., Palma-Cepi, C., 2019. Macrozoospermia associated with mutations of AURKC gene: First case report in Latin America and literature review. *Rev. Int. Andrología.* <https://doi.org/10.1016/j.androl.2019.04.004>
- Oud, M.S., Houston, B.J., Volozonoka, L., Mastroianni, F.K., Holt, G.S., Alobaidi, B.K.S., deVries, P.F., Astuti, G., Ramos, L., McLachlan, R.I., O'Bryan, M.K., Veltman, J.A., Chemes, H.E., Sheth, H., 2021. Exome sequencing reveals variants in known and novel candidate genes for severe sperm motility disorders. *Hum. Reprod.* 36, 2597–2611. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab099>
- Oud, M.S., Okutman, Ö., Hendricks, L. a. J., de Vries, P.F., Houston, B.J., Vissers, L.E.L.M., O'Bryan, M.K., Ramos, L., Chemes, H.E., Viville, S., Veltman, J.A., 2020. Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 35, 240–252. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez246>
- Oud, M.S., Volozonoka, L., Smits, R.M., Vissers, L.E.L.M., Ramos, L., Veltman, J.A., 2019. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 34, 932–941. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez022>
- Ounis, L., Zoghmar, A., Coutton, C., Rouabah, L., Hachemi, M., Martinez, D., Martinez, G., Bellil, I., Khelifi, D., Arnoult, C., Fauré, J., Benbouhedja, S., Rouabah, A., Ray, P.F., 2015. Mutations of the aurora kinase C gene causing macrozoospermia are the most frequent genetic cause of male infertility in Algerian men. *Asian J. Androl.* 17, 68–73. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.136441>

- Paci, M., Elkhatib, R., Longepied, G., Hennebicq, S., Bessonat, J., Courbière, B., Bourgeois, P., Levy, N., Mitchell, M.J., Metzler-Guillemain, C., 2017. Abnormal retention of nuclear lamina and disorganization of chromatin-related proteins in spermatozoa from DPY19L2-deleted globozoospermic patients. *Reprod. Biomed. Online* 35, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.07.013>
- Pagin, A., Bergougnoux, A., Girodon, E., Reboul, M.-P., Willoquaux, C., Kesteloot, M., Raynal, C., Biennvenu, T., Humbert, M., Lalau, G., Bieth, E., 2020. Novel ADGRG2 truncating variants in patients with X-linked congenital absence of vas deferens. *Andrology* 8, 618–624. <https://doi.org/10.1111/andr.12744>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet Lond. Engl.* 340, 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-f)
- Pashaei, M., Rahimi Bidgoli, M.M., Zare-Abdollahi, D., Najmabadi, H., Haji-Seyed-Javadi, R., Fatehi, F., Alavi, A., 2020. The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01660-1>
- Patat, O., Pagin, A., Siegfried, A., Mitchell, V., Chassaing, N., Faguer, S., Monteil, L., Gaston, V., Bujan, L., Courtade-Saidi, M., Marcelli, F., Lalau, G., Rigot, J.-M., Mieusset, R., Bieth, E., 2016. Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.012>
- Peng, Y., Lin, Y., Deng, K., Shen, J., Cui, Y., Liu, J., Yang, X., Diao, F., 2023. Mutations in PLCZ1 induce male infertility associated with polyspermy and fertilization failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 40, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02670-2>
- Perrin, A., Morel, F., Moy, L., Colleu, D., Amice, V., De Braekeleer, M., 2007. Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature. *Fertil. Steril.* 90, 1201.e13–7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.013>
- Pierre, V., Martinez, G., Coutton, C., Delaroche, J., Yassine, S., Novella, C., Pernet-Gallay, K., Hennebicq, S., Ray, P.F., Arnoult, C., 2012. Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 139, 2955–2965. <https://doi.org/10.1242/dev.077982>
- Pigino, G., Ishikawa, T., 2012. Axonemal radial spokes. *Bioarchitecture* 2, 50–58.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., Schimenti, J.C., 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* 1, 697–705. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80069-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80069-6)
- Plotton, I., Renault, L., Lapoirie, M., Sanlaville, D., Ecochard, R., Giscard d’Estaing, S., Cuzin, B., Dijoud, F., Salle, B., Lejeune, H., 2022. Fertility in men with Klinefelter’s syndrome. *Ann. Endocrinol., 64th International Meeting of Clinical Endocrinology - Henri-Pierre Klotz: HORMONES & FERTILITY* 83, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2022.05.002>
- Porcu, G., Mercier, G., Boyer, P., Achard, V., Banet, J., Vasserot, M., Melone, C., Saias-Magnan, J., D’Ercole, C., Chau, C., Guichaoua, M.R., 2003. Pregnancies after ICSI using sperm with abnormal head-tail junction from two brothers: case report. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 562–567. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg121>
- Qu, W., Yuan, S., Quan, C., Huang, Q., Zhou, Q., Yap, Y., Shi, L., Zhang, D., Guest, T., Li, W., Yee, S.-P., Zhang, L., Cazin, C., Hess, R.A., Ray, P.F., Kherraf, Z.-E., Zhang, Z., 2020. The essential role of intraflagellar transport protein IFT81 in male mice spermiogenesis and fertility. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 318, C1092–C1106. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00450.2019>
- Quill, T.A., Sugden, S.A., Rossi, K.L., Doolittle, L.K., Hammer, R.E., Garbers, D.L., 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14869–14874. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136654100>

- Rahman, M.S., Lee, J.-S., Kwon, W.-S., Pang, M.-G., 2013. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 360986. <https://doi.org/10.1155/2013/360986>
- Ramasamy, R., Bakircioğlu, M.E., Cengiz, C., Karaca, E., Scovell, J., Jhangiani, S.N., Akdemir, Z.C., Bainbridge, M., Yu, Y., Huff, C., Gibbs, R.A., Lupski, J.R., Lamb, D.J., 2015. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 104, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.001>
- Ramelli, E., Brault, N., Tierny, C., Atlan, M., Cristofari, S., 2020. Intrascrotal injection of botulinum toxin A, a male genital aesthetic demand: Technique and limits. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* 30, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2020.04.016>
- Ray, P.F., Toure, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M.J., Arnoult, C., Coutton, C., 2017. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin. Genet.* 91, 217–232. <https://doi.org/10.1111/cge.12905>
- Refik-Rogers, J., Manova, K., Koff, A., 2006. Misexpression of cyclin B3 leads to aberrant spermatogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 1966–1973. <https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3137>
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., Clapham, D.E., 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603–609. <https://doi.org/10.1038/35098027>
- Ren, H., Ma, X., Peng, R., Li, X., Ming, L., 2020. [Analysis of (DPY19L2 gene variant in two brothers affected with globozoospermia)]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin. J. Med. Genet.* 37, 438–440. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.04.018>
- Reynolds, A., Qiao, H., Yang, Y., Chen, J.K., Jackson, N., Biswas, K., Holloway, J.K., Baudat, F., de Massy, B., Wang, J., Höög, C., Cohen, P.E., Hunter, N., 2013. RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nat. Genet.* 45, 269–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2541>
- Ribeiro, J., Dupaigne, P., Petrillo, C., Ducrot, C., Duquenne, C., Veaute, X., Saintomé, C., Busso, D., Guerois, R., Martini, E., Livera, G., 2021. The meiosis-specific MEIOB-SPATA22 complex cooperates with RPA to form a compacted mixed MEIOB/SPATA22/RPA/ssDNA complex. *DNA Repair* 102, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103097>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Reh, H.L., ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riera-Escamilla, A., Enguita-Marruedo, A., Moreno-Mendoza, D., Chianese, C., Sleddens-Linkels, E., Contini, E., Benelli, M., Natali, A., Colpi, G.M., Ruiz-Castañé, E., Maggi, M., Baarends, W.M., Krausz, C., 2019. Sequencing of a “mouse azoospermia” gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 34, 978–988. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez042>
- Riera-Escamilla, A., Vockel, M., Nagirnaja, L., Xavier, M.J., Carbonell, A., Moreno-Mendoza, D., Pybus, M., Farnetani, G., Rosta, V., Cioppi, F., Friedrich, C., Oud, M.S., van der Heijden, G.W., Soave, A., Diemer, T., Ars, E., Sánchez-Curbelo, J., Kliesch, S., O’Bryan, M.K., Ruiz-Castañe, E., Azorín, F., Veltman, J.A., Aston, K.I., Conrad, D.F., Tüttelmann, F., Krausz, C., 2022. Large-scale analyses of the X chromosome in 2,354 infertile men discover recurrently affected genes associated with spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.* 109, 1458–1471. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.06.007>
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., Bourbon, H.-M., de Massy, B., 2016. The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* 351, 943–949. <https://doi.org/10.1126/science.aad5309>

- Robin, G., Boitrelle, F., Leroy, X., Peers, M.-C., Marcelli, F., Rigot, J.-M., Mitchell, V., 2010. [Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann. Pathol.* 30, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2010.03.015>
- Rocca, M.S., Msaki, A., Ghezzi, M., Cosci, I., Pilichou, K., Celeghin, R., Foresta, C., Ferlin, A., 2020. Development of a novel next-generation sequencing panel for diagnosis of quantitative spermatogenic impairment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 37, 753–762. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01747-0>
- Roshandel, E., Mehravar, M., Nikoonezhad, M., Alizadeh, A.M., Majidi, M., Salimi, M., Hajifathali, A., 2022. Cell-Based Therapy Approaches in Treatment of Non-obstructive Azoospermia. *Reprod. Sci.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01115-6>
- Royo, H., Prosser, H., Ruzankina, Y., Mahadevaiah, S.K., Cloutier, J.M., Baumann, M., Fukuda, T., Höög, C., Tóth, A., de Rooij, D.G., Bradley, A., Brown, E.J., Turner, J.M.A., 2013. ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev.* 27, 1484–1494. <https://doi.org/10.1101/gad.219477.113>
- Saebnia, N., Ebrahimzadeh-Vesal, R., Haddad-Mashhadrizeh, A., Gholampour-Faraji, N., Schinzel, A., Neshati, Z., Azimi-Nezhad, M., 2022. Identification of a new splice-acceptor mutation in HFM1 and functional analysis through molecular docking in nonobstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39, 1195–1203. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02433-z>
- Salas-Huetos, A., Tüttelmann, F., Wyrwoll, M.J., Kliesch, S., Lopes, A.M., Goncalves, J., Boyden, S.E., Wöste, M., Hotaling, J.M., GEMINI Consortium, Nagirnaja, L., Conrad, D.F., Carrell, D.T., Aston, K.I., 2021. Disruption of human meiotic telomere complex genes TERB1, TERB2 and MAJIN in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Genet.* 140, 217–227. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02236-1>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schatten, G., Stearns, T., 2015. Sperm Centrosomes: Kiss Your Asterless Goodbye, for Fertility’s Sake. *Curr. Biol.* 25, R1178–R1181. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.015>
- Schlegel, P.N., 1999. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14, 131–135. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.1.131>
- Sengul, G., Ertekin, C., 2020. Human cremaster muscle and cremasteric reflex: A comprehensive review. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 131, 1354–1364. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2020.03.011>
- Serres, C., Escalier, D., David, G., 1983. Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol. Cell* 49, 153–161. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1984.tb00233.x>
- Setchell, B.P., Mieuxset, R., 1996. Régulation thermique du testicule. *Andrologie* 6, 137–140. <https://doi.org/10.1007/BF03034440>
- Sha, Yanwei, Liu, W., Li, L., Serafimovski, M., Isachenko, V., Li, Y., Chen, J., Zhao, B., Wang, Y., Wei, X., 2021. Pathogenic Variants in ACTRT1 Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 676246. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.676246>
- Sha, Y., Liu, W., Wei, X., Zhu, X., Luo, X., Liang, L., Guo, T., 2019a. Biallelic mutations in Sperm flagellum 2 cause human multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) phenotype. *Clin. Genet.* 96, 385–393. <https://doi.org/10.1111/cge.13602>
- Sha, Y., Wang, X., Yuan, J., Zhu, X., Su, Z., Zhang, X., Xu, X., Wei, X., 2020a. Loss-of-function mutations in centrosomal protein 112 is associated with human acephalic spermatozoa phenotype. *Clin. Genet.* 97, 321–328. <https://doi.org/10.1111/cge.13662>
- Sha, Y., Wei, X., Ding, L., Ji, Z., Mei, L., Huang, X., Su, Z., Wang, W., Zhang, X., Lin, S., 2020b. Biallelic mutations of CFAP74 may cause human primary ciliary dyskinesia and MMAF phenotype. *J. Hum. Genet.* 65, 961–969. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0790-2>

- Sha, Y., Wei, X., Ding, L., Mei, L., Huang, X., Lin, S., Su, Z., Kong, L., Zhang, Y., Ji, Z., 2019b. DNAH17 is associated with asthenozoospermia and multiple morphological abnormalities of sperm flagella. *Ann. Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1111/ahg.12369>
- Sha, Yankun, Sha, Yanwei, Liu, W., Zhu, X., Weng, M., Zhang, X., Wang, Y., Zhou, H., 2021. Biallelic mutations of CFAP58 are associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin. Genet.* 99, 443–448. <https://doi.org/10.1111/cge.13898>
- Sha, Y.-W., Sha, Y.-K., Ji, Z.-Y., Mei, L.-B., Ding, L., Zhang, Q., Qiu, P.-P., Lin, S.-B., Wang, X., Li, P., Xu, X., Li, L., 2018. TSGA10 is a novel candidate gene associated with acephalic spermatozoa. *Clin. Genet.* 93, 776–783. <https://doi.org/10.1111/cge.13140>
- Sha, Y.-W., Wang, X., Xu, X., Ding, L., Liu, W.-S., Li, P., Su, Z.-Y., Chen, J., Mei, L.-B., Zheng, L.-K., Wang, H.-L., Kong, S.-B., You, M., Wu, J.-F., 2019a. Biallelic mutations in PMFBP1 cause acephalic spermatozoa. *Clin. Genet.* 95, 277–286. <https://doi.org/10.1111/cge.13461>
- Sha, Y.-W., Wang, X., Xu, X., Su, Z.-Y., Cui, Y., Mei, L.-B., Huang, X.-J., Chen, J., He, X.-M., Ji, Z.-Y., Bao, H., Yang, X., Li, P., Li, L., 2019b. Novel Mutations in CFAP44 and CFAP43 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella (MMAF). *Reprod. Sci.* 26, 26–34. <https://doi.org/10.1177/1933719117749756>
- Sha, Yan-Wei, Xu, X., Ji, Z.-Y., Lin, S.-B., Wang, X., Qiu, P.-P., Zhou, Y., Mei, L.-B., Su, Z.-Y., Li, L., Li, P., 2018. Genetic contribution of SUN5 mutations to acephalic spermatozoa in Fujian China. *Gene* 647, 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.035>
- Sha, Y.-W., Xu, X., Mei, L.-B., Li, P., Su, Z.-Y., He, X.-Q., Li, L., 2017. A homozygous CEP135 mutation is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Gene* 633, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.08.033>
- Shafik, A., 1978. Absent dartos. *Br. J. Urol.* 50, 354. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1978.tb03649.x>
- Shang, Y., Yan, J., Tang, W., Liu, C., Xiao, S., Guo, Y., Yuan, L., Chen, L., Jiang, H., Guo, X., Qiao, J., Li, W., 2018. Mechanistic insights into acephalic spermatozoa syndrome-associated mutations in the human SUN5 gene. *J. Biol. Chem.* 293, 2395–2407. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000861>
- Shang, Y., Zhu, F., Wang, L., Ouyang, Y.-C., Dong, M.-Z., Liu, C., Zhao, H., Cui, X., Ma, D., Zhang, Z., Yang, X., Guo, Y., Liu, F., Yuan, L., Gao, F., Guo, X., Sun, Q.-Y., Cao, Y., Li, W., 2017. Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.28199>
- Shang, Y.-L., Zhu, F.-X., Yan, J., Chen, L., Tang, W.-H., Xiao, S., Mo, W.-K., Zhang, Z.-G., He, X.-J., Qiao, J., Cao, Y.-X., Li, W., 2019. Novel DPY19L2 variants in globozoospermic patients and the overcoming this male infertility. *Asian J. Androl.* 21, 183–189. https://doi.org/10.4103/aja.aja_79_18
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V.K., Assidi, M., Abu-Elmagd, M., Turki, R.F., 2015. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* RBE 13, 35. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0028-x>
- Shen, Q., Martinez, G., Liu, H., Beurois, J., Wu, H., Amiri-Yekta, A., Liang, D., Kherraf, Z.-E., Bidart, M., Cazin, C., Celse, T., Satre, V., Thierry-Mieg, N., Whitfield, M., Touré, A., Song, B., Lv, M., Li, K., Liu, C., Tao, F., He, X., Zhang, F., Arnoult, C., Ray, P.F., Cao, Y., Coutton, C., 2021. Bi-allelic truncating variants in CFAP206 cause male infertility in human and mouse. *Hum. Genet.* 140, 1367–1377. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02313-z>
- Shen, Y., Yue, H.-X., Li, F.-P., Hu, F.-Y., Li, X.-L., Wan, Q., Zhao, W.-R., Jing, J.-G., Cai, D.-M., Jiang, X.-H., 2019a. SCNN1B and CA12 play vital roles in occurrence of congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD). *Asian J. Androl.* 21, 525–527. https://doi.org/10.4103/aja.aja_112_18
- Shen, Y., Zhang, F., Li, F., Jiang, X., Yang, Y., Li, X., Li, W., Wang, X., Cheng, J., Liu, M., Zhang, X., Yuan, G., Pei, X., Cai, K., Hu, F., Sun, J., Yan, L., Tang, L., Jiang, C., Tu, W., Xu, J., Wu, H., Kong, W., Li, S., Wang, K., Sheng, K., Zhao, X., Yue, H., Yang, X., Xu, W., 2019b. Loss-of-function mutations in QRICH2 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Nat. Commun.* 10, 433. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08182-x>

- Shi, L., Zhou, T., Huang, Q., Zhang, S., Li, W., Zhang, L., Hess, R.A., Pazour, G.J., Zhang, Z., 2019. Intraflagellar transport protein 74 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice†. *Biol. Reprod.* 101, 188–199. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz071>
- Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S.L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R.S., Nakatsuji, N., Chuma, S., 2009. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev. Cell* 17, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.012>
- Sirokha, D., Gorodna, O., Vitrenko, Y., Zelinska, N., Ploski, R., Nef, S., Jaruzelska, J., Kusz-Zamelczyk, K., Livshits, L., 2021. A Novel WT1 Mutation Identified in a 46,XX Testicular/Ovotesticular DSD Patient Results in the Retention of Intron 9. *Biology* 10, 1248. <https://doi.org/10.3390/biology10121248>
- Skakkebaek, N.E., Lindahl-Jacobsen, R., Levine, H., Andersson, A.-M., Jørgensen, N., Main, K.M., Lidegaard, Ø., Priskorn, L., Holmboe, S.A., Bräuner, E.V., Almstrup, K., Franca, L.R., Znaor, A., Kortenkamp, A., Hart, R.J., Juul, A., 2022. Environmental factors in declining human fertility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 18, 139–157. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00598-8>
- Slattery, S.D., Moore, R.V., Brinkley, B.R., Hall, R.M., 2008. Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of cenp-A and borealin during mitosis. *Cell Cycle* 7, 787–795. <https://doi.org/10.4161/cc.7.6.5563>
- Smith, E.F., Yang, P., 2004. The Radial Spokes and Central Apparatus: Mechano-Chemical Transducers That Regulate Flagellar Motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 8–17. <https://doi.org/10.1002/cm.10155>
- Snyder, E., Chukrallah, L., Seltzer, K., Goodwin, L., Braun, R.E., 2020. ADAD1 and ADAD2, testis-specific adenosine deaminase domain-containing proteins, are required for male fertility. *Sci. Rep.* 10, 11536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67834-5>
- Stouffs, K., Lissens, W., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2006. Alterations of the USP26 gene in Caucasian men. *Int. J. Androl.* 29, 614–617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00708.x>
- Sullivan, R., Miesusset, R., 2016. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update* 22, 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., Oates, R., Page, D.C., 1999. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet.* 23, 429–432. <https://doi.org/10.1038/70539>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takasaki, N., Tachibana, K., Ogasawara, S., Matsuzaki, H., Hagiuda, J., Ishikawa, H., Mochida, K., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Noce, T., Ito, C., Toshimori, K., Narimatsu, H., 2014. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1120–1125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310777111>
- Tan, C., Meng, L., Lv, M., He, X., Sha, Y., Tang, D., Tan, Y., Hu, T., He, W., Tu, C., Nie, H., Zhang, H., Du, J., Lu, G., Fan, L., Cao, Y., Lin, G., Tan, Y.-Q., 2022. Bi-allelic variants in DNHD1 cause flagellar axoneme defects and asthenoteratozoospermia in humans and mice. *Am. J. Hum. Genet.* 109, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.022>
- Tan, M.-Q., Huang, W.-J., Lan, F.-H., Xu, Y.-J., Zheng, M.-Y., Tang, Y., 2022. Genetic mutation analysis of 22 patients with congenital absence of vas deferens: a single-center study†. *Biol. Reprod.* 106, 108–117. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab194>
- Tan, Y.-Q., Tu, C., Meng, L., Yuan, S., Sjaarda, C., Luo, A., Du, J., Li, W., Gong, F., Zhong, C., Deng, H.-X., Lu, G., Liang, P., Lin, G., 2019. Loss-of-function mutations in TDRD7 lead to a rare novel syndrome combining congenital cataract and nonobstructive azoospermia in humans. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 21, 1209–1217. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.130>

- Tang, D., Lv, M., Gao, Y., Cheng, H., Li, K., Xu, C., Geng, H., Li, G., Shen, Q., Wang, C., He, X., Cao, Y., 2021. Novel variants in helicase for meiosis 1 lead to male infertility due to non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 19, 129. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00815-z>
- Tang, D., Xu, C., Geng, H., Gao, Y., Cheng, H., Ni, X., He, X., Cao, Y., 2020. A novel homozygous mutation in the meiotic gene MSH4 leading to male infertility due to non-obstructive azoospermia. *Am. J. Transl. Res.* 12, 8185–8191.
- Tang, F., Gao, Y., Li, K., Tang, D., Hao, Y., Lv, M., Wu, H., Cheng, H., Fei, J., Jin, Z., Wang, C., Xu, Y., Wei, Z., Zhou, P., Zhang, Z., He, X., Cao, Y., 2023. Novel deleterious splicing variant in HFM1 causes gametogenesis defect and recurrent implantation failure: concerning the risk of chromosomal abnormalities in embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02761-8>
- Tang, S., Wang, X., Li, W., Yang, X., Li, Z., Liu, W., Li, C., Zhu, Z., Wang, L., Wang, Jiaxiong, Zhang, L., Sun, X., Zhi, E., Wang, H., Li, H., Jin, L., Luo, Y., Wang, Jian, Yang, S., Zhang, F., 2017. Biallelic Mutations in CFAP43 and CFAP44 Cause Male Infertility with Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.012>
- Tapanainen, J.S., Aittomäki, K., Min, J., Vaskivuo, T., Huhtaniemi, I.T., 1997. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat. Genet.* 15, 205–206. <https://doi.org/10.1038/ng0297-205>
- Tavalaee, M., Nomikos, M., Lai, F.A., Nasr-Esfahani, M.H., 2018. Expression of sperm PLC ζ and clinical outcomes of ICSI-AOA in men affected by globozoospermia due to DPY19L2 deletion. *Reprod. Biomed. Online* 36, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.013>
- Tewes, A.-C., Ledig, S., Tüttelmann, F., Kliesch, S., Wieacker, P., 2014. DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility. *Fertil. Steril.* 102, 816–820.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.022>
- Tiepolo, L., Zuffardi, O., 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.* 34, 119–124. <https://doi.org/10.1007/BF00278879>
- Touré, A., 2017. Genetics and Pathophysiology of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Male Reproduction: New Evidence of a Direct Effect on the Male Germline. *Genet. Hum. Infertil.* 21, 74–85. <https://doi.org/10.1159/000477279>
- Touré, A., Lhuillier, P., Gossen, J.A., Kuil, C.W., Lhôte, D., Jégou, B., Escalier, D., Gacon, G., 2007. The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1783–1793. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm117>
- Touré, A., Martinez, G., Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Beurois, J., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2020. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>
- Toure, A., Rode, B., Hunnicutt, G.R., Escalier, D., Gacon, G., 2011. Septins at the annulus of mammalian sperm 392, 799–803. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.074>
- Tournaye, H., 1999. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14 Suppl 1, 71–81. https://doi.org/10.1093/humrep/14.suppl_1.71
- Tournaye, H., Krausz, C., Oates, R.D., 2017. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 5, 544–553. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30040-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30040-7)
- Tran, T.-A., Koné-Paut, I., Marie, I., Ninet, J., Cuisset, L., Meinzer, U., 2012. Muckle-Wells syndrome and male hypofertility: a case series. *Semin. Arthritis Rheum.* 42, 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.03.005>

- Tsai-Morris, C.-H., Sheng, Y., Lee, E., Lei, K.-J., Dufau, M.L., 2004. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is essential for spermatid development and completion of spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6373–6378. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401855101>
- Tu, C., Cong, J., Zhang, Q., He, X., Zheng, R., Yang, X., Gao, Y., Wu, H., Lv, M., Gu, Y., Lu, S., Liu, C., Tian, S., Meng, L., Wang, W., Tan, C., Nie, H., Li, D., Zhang, H., Gong, F., Hu, L., Lu, G., Xu, W., Lin, G., Zhang, F., Cao, Y., Tan, Y.-Q., 2021. Bi-allelic mutations of DNAH10 cause primary male infertility with asthenoteratozoospermia in humans and mice. *Am. J. Hum. Genet.* 108, 1466–1477. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.06.010>
- Tu, C., Nie, H., Meng, L., Wang, W., Li, H., Yuan, S., Cheng, D., He, W., Liu, G., Du, J., Gong, F., Lu, G., Lin, G., Zhang, Q., Tan, Y.-Q., 2020a. Novel mutations in SPEF2 causing different defects between flagella and cilia bridge: the phenotypic link between MMAF and PCD. *Hum. Genet.* 139, 257–271. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02110-0>
- Tu, C., Wang, W., Hu, T., Lu, G., Lin, G., Tan, Y.-Q., 2020b. Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., Genetics of male infertility* 34, 101472. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101472>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F., 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Valdes-Socin, H., Salvi, R., Daly, A.F., Gaillard, R.C., Quatresooz, P., Tebeu, P.-M., Pralong, F.P., Beckers, A., 2004. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N. Engl. J. Med.* 351, 2619–2625. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040326>
- van der Bijl, N., Röpke, A., Biswas, U., Wöste, M., Jessberger, R., Kliesch, S., Friedrich, C., Tüttelmann, F., 2019. Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 34, 2112–2119. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez204>
- Vander Borgh, M., Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Vassal, M., Rebelo, S., Pereira, M. de L., 2021. Metal Oxide Nanoparticles: Evidence of Adverse Effects on the Male Reproductive System. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8061. <https://doi.org/10.3390/ijms22158061>
- Vetro, A., Dehghani, M.R., Kraoua, L., Giorda, R., Beri, S., Cardarelli, L., Merico, M., Manolakos, E., Parada-Bustamante, A., Castro, A., Radi, O., Camerino, G., Brusco, A., Sabaghian, M., Sofocleous, C., Forzano, F., Palumbo, P., Palumbo, O., Calvano, S., Zelante, L., Grammatico, P., Giglio, S., Basly, M., Chaabouni, M., Carella, M., Russo, G., Bonaglia, M.C., Zuffardi, O., 2015. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 23, 1025–1032. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.237>
- Virtanen, H.E., Toppari, J., 2015. Cryptorchidism and Fertility. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am., Reproductive Consequences of Pediatric Disease* 44, 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.07.013>
- Viswanadha, R., Sale, W.S., Porter, M.E., 2017. Ciliary Motility: Regulation of Axonemal Dynein Motors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a018325. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018325>
- Vogl, A.W., Young, J.S., Du, M., 2013. New insights into roles of tubulobulbar complexes in sperm release and turnover of blood-testis barrier. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 303, 319–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00008-8>
- Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Köhn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H.M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Gröne, H.J., Jung, A., Engel, W., Haidl, G., 1996. Human Y

- chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5, 933–943. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>
- Vozdova, M., Rybar, R., Kloudova, S., Prinosilova, P., Texl, P., Rubes, J., 2014. Total globozoospermia associated with increased frequency of immature spermatozoa with chromatin defects and aneuploidy: a case report. *Andrologia* 46, 831–836. <https://doi.org/10.1111/and.12156>
- Walters, E.M., Bauer, B.A., Franklin, C.L., Evans, T.J., Bryda, E.C., Riley, L.K., Critser, J.K., 2009. Mutational insertion of a ROSA26-EGFP transgene leads to defects in spermiogenesis and male infertility in mice. *Comp. Med.* 59, 545–552.
- Wambergue, C., Zouari, R., Fourati Ben Mustapha, S., Martinez, G., Devillard, F., Hennebicq, S., Satre, V., Brouillet, S., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Amblard, F., Arnoult, C., Ray, P.F., Coutton, C., 2016. Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella due to DNAH1 mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 31, 1164–1172. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew083>
- Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K., Garbers, D.L., 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* 5, 1117–1122. <https://doi.org/10.1038/ncb1072>
- Wang, J., Liu, X., Zhang, C., Xu, Y., Wang, W., Li, H., Yang, S., Zhao, J., 2022a. Patient with multiple morphological abnormalities of sperm flagella caused by a novel ARMC2 mutation has a favorable pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39, 1673–1681. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02516-x>
- Wang, J., Wang, W., Shen, L., Zheng, A., Meng, Q., Li, H., Yang, S., 2022b. Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella: A review of literature. *Front. Genet.* 13, 1034951. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1034951>
- Wang, J., Zhang, C., Tang, H., Zheng, A., Li, H., Yang, S., Xiang, J., 2022c. Successful Results of Intracytoplasmic Sperm Injection of a Chinese Patient With Multiple Morphological Abnormalities of Sperm Flagella Caused by a Novel Splicing Mutation in CFAP251. *Front. Genet.* 12, 783790. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.783790>
- Wang, J., Zhang, J., Sun, X., Lin, Y., Cai, L., Cui, Y., Liu, J., Liu, M., Yang, X., 2021. Novel bi-allelic variants in ACTL7A are associated with male infertility and total fertilization failure. *Hum. Reprod.* 36, 3161–3169. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab228>
- Wang, M., Yang, Q.-Y., Zhou, J.-P., Tan, H.-P., Hu, J., Jin, L., Zhu, L.-X., 2022. Novel compound heterozygous mutations in DNAH1 cause primary infertility in Han Chinese males with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Asian J. Androl.* <https://doi.org/10.4103/aja202292>
- Wang, X., Jiang, C., Dai, S., Shen, G., Yang, Y., Shen, Y., 2022. Identification of nonfunctional SPATA20 causing acephalic spermatozoa syndrome in humans. *Clin. Genet.* <https://doi.org/10.1111/cge.14268>
- Wang, X., Jin, H., Han, F., Cui, Y., Chen, J., Yang, C., Zhu, P., Wang, W., Jiao, G., Wang, W., Hao, C., Gao, Z., 2017. Homozygous DNAH1 frameshift mutation causes multiple morphological anomalies of the sperm flagella in Chinese. *Clin. Genet.* 91, 313–321. <https://doi.org/10.1111/cge.12857>
- Wang, X., Jin, H.-R., Cui, Y.-Q., Chen, J., Sha, Y.-W., Gao, Z.-L., 2018. Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. *Asian J. Androl.* 20, 101–102. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.194998>
- Wang, Y., Chen, Y., Chen, J., Wang, L., Nie, L., Long, J., Chang, H., Wu, J., Huang, C., Lei, M., 2019. The meiotic TERB1-TERB2-MAJIN complex tethers telomeres to the nuclear envelope. *Nat. Commun.* 10, 564. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08437-1>
- Wang, Y., Xiang, M.-F., Zheng, N., Cao, Y.-X., Zhu, F.-X., 2022. Genetic pathogenesis of acephalic spermatozoa syndrome: past, present, and future. *Asian J. Androl.* 24, 231–237. <https://doi.org/10.4103/aja202198>
- Wang, Y.-Y., Lin, Y.-H., Wu, Y.-N., Chen, Y.-L., Lin, Y.-C., Cheng, C.-Y., Chiang, H.-S., 2017. Loss of SLC9A3 decreases CFTR protein and causes obstructed azoospermia in mice. *PLoS Genet.* 13, e1006715. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006715>

- Watanabe, M., Sueoka, K., Sasagawa, I., Nakabayashi, A., Yoshimura, Y., Ogata, T., 2004. Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins. *Fertil. Steril.* 82 Suppl 3, 1067–1071. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.06.027>
- Wellard, S.R., Schindler, K., Jordan, P.W., 2020. Aurora B and C kinases regulate chromosome desynapsis and segregation during mouse and human spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 133, jcs248831. <https://doi.org/10.1242/jcs.248831>
- Weng, M., Sha, Y., Zeng, Y.U., Huang, N., Liu, W., Zhang, X., Zhou, H., 2021. Mutations in DNAH8 contribute to multiple morphological abnormalities of sperm flagella and male infertility. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 53, 472–480. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab013>
- Whitfield, M., Thomas, L., Bequignon, E., Schmitt, A., Stouvenel, L., Montantin, G., Tissier, S., Duquesnoy, P., Copin, B., Chantot, S., Dastot, F., Faucon, C., Barbotin, A.L., Loyens, A., Siffroi, J.-P., Papon, J.-F., Escudier, E., Amselem, S., Mitchell, V., Touré, A., Legendre, M., 2019. Mutations in DNAH17, Encoding a Sperm-Specific Axonemal Outer Dynein Arm Heavy Chain, Cause Isolated Male Infertility Due to Asthenozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 105, 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.015>
- Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P.N., Rogister, B., 2018. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Div.* 13, 7. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>
- Wong, J.C.Y., Alon, N., Mckerlie, C., Huang, J.R., Meyn, M.S., Buchwald, M., 2003. Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2063–2076. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg219>
- World Health Organization, 2021. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition.
- Wosnitzer, M.S., Goldstein, M., 2014. Obstructive Azoospermia. *Urol. Clin. North Am.*, Current Management of Male Infertility 41, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.013>
- Wu, H., Gao, Y., Ma, C., Shen, Q., Wang, J., Lv, M., Liu, C., Cheng, H., Zhu, F., Tian, S., Elshewy, N., Ni, X., Tan, Q., Xu, X., Zhou, P., Wei, Z., Zhang, F., He, X., Cao, Y., 2020. A novel hemizygous loss-of-function mutation in ADGRG2 causes male infertility with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J. Assist. Reprod. Genet.* 37, 1421–1429. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01779-6>
- Wu, H., Li, W., He, X., Liu, C., Fang, Y., Zhu, F., Jiang, H., Liu, W., Song, B., Wang, X., Zhou, P., Wei, Z., Zhang, F., Cao, Y., 2019. Novel CFAP43 and CFAP44 mutations cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Reprod. Biomed. Online* 38, 769–778. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.037>
- Wu, H., Sun, L., Wen, Y., Liu, Y., Yu, J., Mao, F., Wang, Y., Tong, C., Guo, X., Hu, Z., Sha, J., Liu, M., Xia, L., 2016. Major spliceosome defects cause male infertility and are associated with nonobstructive azoospermia in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4134–4139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513682113>
- Wu, H., Zhang, X., Hua, R., Li, Y., Cheng, L., Li, K., Liu, Y., Gao, Y., Shen, Q., Wang, G., Lv, M., Xu, Y., He, X., Cao, Y., Liu, M., 2022. Homozygous missense mutation in CCDC155 disrupts the transmembrane distribution of CCDC155 and SUN1, resulting in non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *Hum. Genet.* 141, 1795–1809. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02459-4>
- Wu, Y.-N., Chen, K.-C., Wu, C.-C., Lin, Y.-H., Chiang, H.-S., 2019. SLC9A3 Affects Vas Deferens Development and Associates with Taiwanese Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *BioMed Res. Int.* 2019, e3562719. <https://doi.org/10.1155/2019/3562719>
- Wyrwoll, M.J., Temel, Ş.G., Nagirnaja, L., Oud, M.S., Lopes, A.M., van der Heijden, G.W., Heald, J.S., Rotte, N., Wistuba, J., Wöste, M., Ledig, S., Krenz, H., Smits, R.M., Carvalho, F., Gonçalves, J., Fietz, D., Türkgenç, B., Ergören, M.C., Çetinkaya, M., Başar, M., Kahraman, S., McEleny, K., Xavier, M.J., Turner, H., Pilatz, A., Röpke, A., Dugas, M., Kliesch, S., Neuhaus, N., GEMINI

- Consortium, Aston, K.I., Conrad, D.F., Veltman, J.A., Friedrich, C., Tüttelmann, F., 2020. Bi-allelic Mutations in M1AP Are a Frequent Cause of Meiotic Arrest and Severely Impaired Spermatogenesis Leading to Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* 107, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.010>
- Wyrwoll, M.J., van Walree, E.S., Hamer, G., Rotte, N., Motazacker, M.M., Meijers-Heijboer, H., Alders, M., Meißner, A., Kaminsky, E., Wöste, M., Krallmann, C., Kliesch, S., Hunt, T.J., Clark, A.T., Silber, S., Stallmeyer, B., Friedrich, C., van Pelt, A.M.M., Mathijssen, I.B., Tüttelmann, F., 2021. Bi-allelic variants in DNA mismatch repair proteins MutS Homolog MSH4 and MSH5 cause infertility in both sexes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 37, 178–189. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab230>
- Xiang, M., Wang, Y., Wang, K., Kong, S., Lu, M., Zhang, J., Duan, Z., Zha, X., Shi, X., Wang, F., Cao, Y., Zhu, F., 2022a. Novel Mutation and Deletion in SUN5 Cause Male Infertility with Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 29, 646–651. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00665-5>
- Xiang, M., Wang, Y., Xu, W., Zheng, N., Deng, H., Zhang, J., Duan, Z., Zha, X., Zhang, W., Song, G., Shi, X., Wang, F., Cao, Y., Zhu, F., 2022b. A novel homozygous missense mutation in AK7 causes multiple morphological anomalies of the flagella and oligoasthenoteratozoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 39, 261–266. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02363-2>
- Xiang, M., Wang, Y., Xu, W., Zheng, N., Zhang, J., Duan, Z., Zha, X., Shi, X., Wang, F., Cao, Y., Zhu, F., 2021. Pathogenesis of acephalic spermatozoa syndrome caused by splicing mutation and de novo deletion in TSGA10. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38, 2791–2799. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02295-x>
- Xiao, N., Kam, C., Shen, C., Jin, W., Wang, J., Lee, K.M., Jiang, L., Xia, J., 2009. PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J. Clin. Invest.* 119, 802–812. <https://doi.org/10.1172/JCI36230>
- Xie, C., Wang, W., Tu, C., Meng, L., Lu, G., Lin, G., Lu, L.-Y., Tan, Y.-Q., 2022. Meiotic recombination: insights into its mechanisms and its role in human reproduction with a special focus on non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod. Update* 28, 763–797. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac024>
- Xie, X., Murtaza, G., Li, Y., Zhou, J., Ye, J., Khan, R., Jiang, L., Khan, I., Zubair, M., Yin, H., Jiang, H., Liu, W., Shi, B., Hou, X., Gong, C., Fan, S., Wang, Y., Jiang, X., Zhang, Y., Zhang, H., Ma, H., Shi, Q., 2022. Biallelic HFM1 variants cause non-obstructive azoospermia with meiotic arrest in humans by impairing crossover formation to varying degrees. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 37, 1664–1677. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac092>
- Xin, A., Qu, R., Chen, G., Zhang, L., Chen, J., Tao, C., Fu, J., Tang, J., Ru, Y., Chen, Y., Peng, X., Shi, H., Zhang, F., Sun, X., 2020. Disruption in ACTL7A causes acrosomal ultrastructural defects in human and mouse sperm as a novel male factor inducing early embryonic arrest. *Sci. Adv.* 6, eaaz4796. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4796>
- Xu, C., Tang, D., Shao, Z., Geng, H., Gao, Y., Li, K., Tan, Q., Wang, G., Wang, C., Wu, H., Li, G., Lv, M., He, X., Cao, Y., 2022. Homozygous SPAG6 variants can induce nonsyndromic asthenoteratozoospermia with severe MMAF. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 20, 41. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00916-3>
- Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van der Horst, G.T.J., McKay, M.J., 2005. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell* 8, 949–961. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.018>
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., Baltimore, D., 1996. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 10, 2411–2422. <https://doi.org/10.1101/gad.10.19.2411>
- Xu, Y., Yang, B., Lei, C., Yang, D., Ding, S., Lu, C., Wang, L., Guo, T., Wang, R., Luo, H., 2022. Novel Compound Heterozygous Variants in CCDC40 Associated with Primary Ciliary Dyskinesia and

- Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Pharmacogenomics Pers. Med.* 15, 341–350. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S359821>
- Xue, Y., Cheng, X., Xiong, Y., Li, K., 2022. Gene mutations associated with fertilization failure after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Front. Endocrinol.* 13, 1086883. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1086883>
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., Dyson, N.J., 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85, 537–548. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81254-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81254-4)
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., Matzuk, M.M., 2004. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7793–7798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308025101>
- Yan, W., Si, Y., Slaymaker, S., Li, J., Zheng, H., Young, D.L., Aslanian, A., Saunders, L., Verdin, E., Charo, I.F., 2010. Zmynd15 Encodes a Histone Deacetylase-dependent Transcriptional Repressor Essential for Spermiogenesis and Male Fertility. *J. Biol. Chem.* 285, 31418–31426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116418>
- Yan, Zheng, Fan, Y., Wang, F., Yan, Zhiguang, Li, M., Ouyang, J., Wu, L., Yin, M., Zhao, J., Kuang, Y., Li, B., Lyu, Q., 2020. Novel mutations in PLCZ1 cause male infertility due to fertilization failure or poor fertilization. *Hum. Reprod.* 35, 472–481. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez282>
- Yang, B., Wang, J., Zhang, W., Pan, H., Li, T., Liu, B., Li, H., Wang, B., 2017. Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology* 5, 954–957. <https://doi.org/10.1111/andr.12407>
- Yang, Y., Guo, J., Dai, L., Zhu, Y., Hu, H., Tan, L., Chen, W., Liang, D., He, J., Tu, M., Wang, K., Wu, L., 2018. XRCC2 mutation causes meiotic arrest, azoospermia and infertility. *J. Med. Genet.* 55, 628–636. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105145>
- Yang, Y., Jiang, C., Zhang, X., Liu, X., Li, J., Qiao, X., Liu, H., Shen, Y., 2020. Loss-of-function mutation in DNAH8 induces asthenoteratospermia associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin. Genet.* 98, 396–401. <https://doi.org/10.1111/cge.13815>
- Yassine, S., Escoffier, J., Nahed, R.A., Pierre, V., Karaouzene, T., Ray, P.F., Arnoult, C., 2015. Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and Dpy19l2 Knock-Out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope. *PLOS ONE* 10, e0118698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118698>
- Yatsenko, A.N., Georgiadis, A.P., Röpke, A., Berman, A.J., Jaffe, T., Olszewska, M., Westernströer, B., Sanfilippo, J., Kurpisz, M., Rajkovic, A., Yatsenko, S.A., Kliesch, S., Schlatt, S., Tüttelmann, F., 2015. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N. Engl. J. Med.* 372, 2097–2107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406192>
- Yatsenko, A.N., O’Neil, D.S., Roy, A., Arias-Mendoza, P.A., Chen, R., Murthy, L.J., Lamb, D.J., Matzuk, M.M., 2012. Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZPBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. *Mol. Hum. Reprod.* 18, 14–21. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar057>
- Ye, Y., Wei, X., Sha, Y., Li, N., Yan, X., Cheng, L., Qiao, D., Zhou, W., Wu, R., Liu, Q., Li, Y., 2020. Loss-of-function mutation in TSGA10 causes acephalic spermatozoa phenotype in human. *Mol. Genet. Genomic Med.* e1284. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1284>
- Yıldırım, Y., Ouriachi, T., Woehlbier, U., Ouahioune, W., Balkan, M., Malik, S., Tolun, A., 2018. Linked homozygous BMP1B and PDHA2 variants in a consanguineous family with complex digit malformation and male infertility. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 26, 876–885. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0121-7>
- Young, S.A.M., Miyata, H., Satouh, Y., Aitken, R.J., Baker, M.A., Ikawa, M., 2016. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. *J. Cell Sci.* 129, 4379–4387. <https://doi.org/10.1242/jcs.193151>
- Yu, J., Chen, Z., Ni, Y., Li, Z., 2012. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 25–35. <https://doi.org/10.1093/humrep/der377>

- Yu, W., An, M., Xu, Y., Gao, Q., Lu, M., Li, Y., Zhang, L., Wang, H., Xu, Z., 2021. Mutational landscape of DNAH1 in Chinese patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella: cohort study and literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38, 2031–2038. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02201-5>
- Yuan, P., Liang, Z.K., Liang, H., Zheng, L.Y., Li, D., Li, J., Zhang, J., Tian, J., Lai, L.H., Zhang, K., He, Z.Y., Zhang, Q.X., Wang, W.J., 2019. Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles. *Andrology* 7, 329–340. <https://doi.org/10.1111/andr.12592>
- Yuan, P., Yang, C., Ren, Y., Yan, J., Nie, Y., Yan, L., Qiao, J., 2020. A novel homozygous mutation of phospholipase C zeta leading to defective human oocyte activation and fertilization failure. *Hum. Reprod.* 35, 977–985. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez293>
- Yuan, Y., Xu, W., Chen, Z., Chen, Y., Zhang, L., Zheng, L., Luo, T., Chen, H., 2022. Successful outcomes of intracytoplasmic sperm injection–embryo transfer using ejaculated spermatozoa from two Chinese asthenoteratozoospermic brothers with a compound heterozygous FSIP2 mutation. *Andrologia* 54, e14351. <https://doi.org/10.1111/and.14351>
- Zaneveld, L., Polakoski, K., 1977. Collection and physical examination of the ejaculate., in: *Techniques of Human Andrology*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands., pp. 147–172.
- Zhang, B., Khan, I., Liu, C., Ma, A., Khan, A., Zhang, Y., Zhang, H., Kakakhel, M.B.S., Zhou, J., Zhang, W., Li, Y., Ali, A., Jiang, X., Murtaza, G., Khan, R., Zubair, M., Yuan, L., Khan, M., Wang, L., Zhang, F., Wang, X., Ma, H., Shi, Q., 2021. Novel loss-of-function variants in DNAH17 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice. *Clin. Genet.* 99, 176–186. <https://doi.org/10.1111/cge.13866>
- Zhang, D., Huang, W.-J., Chen, G.-Y., Dong, L.-H., Tang, Y., Zhang, H., Li, Q.-Q., Mei, X.-Y., Wang, Z.-H., Lan, F.-H., 2021. Pathogenesis of acephalic spermatozoa syndrome caused by SUN5 variant. *Mol. Hum. Reprod.* 27, gaab028. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab028>
- Zhang, G., Li, D., Tu, C., Meng, L., Tan, Y., Ji, Z., Cheng, J., Lu, G., Lin, G., Zhang, H., Sun, J., Wang, M., Du, J., Xu, W., 2021. Loss-of-function missense variant of AKAP4 induced male infertility through reduced interaction with QRICH2 during sperm flagella development. *Hum. Mol. Genet.* 31, 219–231. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab234>
- Zhang, J., He, X., Wu, H., Zhang, X., Yang, S., Liu, C., Liu, S., Hua, R., Zhou, S., Zhao, S., Hu, F., Zhang, Junqiang, Liu, W., Cheng, H., Gao, Y., Zhang, F., Cao, Y., Liu, M., 2021. Loss of DRC1 function leads to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and male infertility in human and mouse. *Hum. Mol. Genet.* 30, 1996–2011. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab171>
- Zhang, X., Shen, Y., Wang, X., Yuan, G., Zhang, C., Yang, Y., 2019. A novel homozygous CFAP65 mutation in humans causes male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin. Genet.* 96, 541–548. <https://doi.org/10.1111/cge.13644>
- Zhang, Yuxiang, Li, P., Liu, N., Jing, T., Ji, Z., Yang, C., Zhao, L., Tian, R., Chen, H., Huang, Y., Zhi, E., Ou, N., Bai, H., Zhou, Y., Li, Z., Yao, C., 2021. Novel Bi-Allelic Variants of FANCM Cause Sertoli Cell-Only Syndrome and Non-Obstructive Azoospermia. *Front. Genet.* 12, 799886. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.799886>
- Zhang, Y., Liu, C., Wu, B., Li, L., Li, W., Yuan, L., 2021. The missing linker between SUN5 and PMFBP1 in sperm head-tail coupling apparatus. *Nat. Commun.* 12, 4926. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25227-w>
- Zhang, Y., Malekpour, M., Al-Madani, N., Kahrizi, K., Zanganeh, M., Mohseni, M., Mojahedi, F., Daneshi, A., Najmabadi, H., Smith, R.J.H., 2009. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *BMJ Case Rep.* 2009, bcr08.2008.0645. <https://doi.org/10.1136/bcr.08.2008.0645>
- Zhang, Y., Song, B., Du, W.-D., He, X.-J., Ruan, J., Zhou, F.-S., Zuo, X.-B., Ye, L., Xie, X.-S., Cao, Y.-X., 2015. Genetic association study of RNF8 and BRDT variants with non-obstructive azoospermia in the Chinese Han population. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 61, 26–31. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.979513>

- Zhang, Y., Yang, L., Huang, L., Liu, G., Nie, X., Zhang, X., Xing, X., 2021. SUN5 Interacting With Nesprin3 Plays an Essential Role in Sperm Head-to-Tail Linkage: Research on Sun5 Gene Knockout Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 684826. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.684826>
- Zhang, Y.-X., Li, H.-Y., He, W.-B., Tu, C., Du, J., Li, W., Lu, G.-X., Lin, G., Yang, Y., Tan, Y.-Q., 2019. XRCC2 mutation causes premature ovarian insufficiency as well as non-obstructive azoospermia in humans. *Clin. Genet.* 95, 442–443. <https://doi.org/10.1111/cge.13475>
- Zhao, L., Hou, Y., Picariello, T., Craige, B., Witman, G.B., 2019. Proteome of the central apparatus of a ciliary axoneme. *J. Cell Biol.* 218, 2051–2070. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902017>
- Zhao, W., Li, Z., Ping, P., Wang, G., Yuan, X., Sun, F., 2018. Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 1755–1768. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13457>
- Zheng, R., Sun, Y., Jiang, C., Chen, D., Yang, Y., Shen, Y., 2021. A novel mutation in DNAH17 is present in a patient with multiple morphological abnormalities of the flagella. *Reprod. Biomed. Online* 43, 532–541. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.05.009>
- Zhu, F., Gong, F., Lin, G., Lu, G., 2013. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 395–404. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat018>
- Zhu, F., Liu, C., Wang, F., Yang, X., Zhang, J., Wu, H., Zhang, Zhiguo, He, X., Zhang, Zhou, Zhou, P., Wei, Z., Shang, Y., Wang, L., Zhang, R., Ouyang, Y.-C., Sun, Q.-Y., Cao, Y., Li, W., 2018. Mutations in PMFBP1 Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.06.010>
- Zhu, F., Wang, F., Yang, X., Zhang, J., Wu, H., Zhang, Zhou, Zhang, Zhiguo, He, X., Zhou, P., Wei, Z., Gecz, J., Cao, Y., 2016. Biallelic SUN5 Mutations Cause Autosomal-Recessive Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 1405. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.002>
- Zhu, Z.-J., Wang, Y.-Z., Wang, X.-B., Yao, C.-C., Zhao, L.-Y., Zhang, Z.-B., Wu, Y., Chen, W., Li, Z., 2022. Novel mutation in ODF2 causes multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in an infertile male. *Asian J. Androl.* 24, 463–472. <https://doi.org/10.4103/aja202183>
- Zhuang, B.-J., Xu, S.-Y., Dong, L., Zhang, P.-H., Zhuang, B.-L., Huang, X.-P., Li, G.-S., You, Y.-D., Chen, D., Yu, X.-J., Chang, D.-G., 2022. Novel DNAH1 Mutation Loci Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Literature Review. *World J. Mens Health* 40, 551–560. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210119>

