



Infertilité masculine : des anomalies moléculaires aux possibilités thérapeutiques

► Les progrès récents des techniques d'aide médicale à la procréation, notamment l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), ont bouleversé le pronostic de l'infertilité masculine. Des hommes, considérés auparavant comme définitivement stériles, peuvent maintenant avoir une descendance, ce qui soulève le problème de la transmission éventuelle des anomalies génétiques responsables de leur infertilité. Parmi celles-ci, les anomalies chromosomiques sont les plus fréquentes et imposent l'étude du caryotype des patients présentant une azoospermie ou une oligozoospermie non obstructive.

Grâce aux avancées de la biologie moléculaire, des anomalies génétiques plus fines ont été décrites : les microdélétions du chromosome Y ont permis d'identifier une partie des gènes, situés sur le bras long de ce chromosome, jouant un rôle dans la spermatogenèse. L'étude de modèles animaux a également abouti à l'implication d'autres gènes qui, chez l'homme, sont à l'origine de stérilité.

Le conseil génétique représente aujourd'hui une étape indispensable du bilan d'une infertilité. ◀

Environ 15 % des couples consultent pour des difficultés à procréer. Dans la moitié des cas, l'homme est seul responsable de cette infertilité qui touche près de 10% de la population masculine. Depuis quelques années, une technique très performante de fécondation *in vitro*, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde ou ICSI (*intra-cytoplasmic sperm injection*), permet à des hommes, auparavant considérés comme stériles, d'avoir une descendance. Les indications d'une telle méthode ne se cantonnent pas aux patients présentant une oligozoospermie extrême ou une azoospermie, mais peuvent aussi s'étendre aux hommes dont les spermatozoïdes ne peuvent féconder un ovocyte (immaturité épидидymaire, auto-immunisation antispermatozoïde, dyskinésie flagellaire). Son efficacité soulève de fait le délicat problème de l'origine même de l'infertilité des hommes qui y ont recours. En effet, hormis les cas fréquents de stérilité masculine liée à une obstruction des voies génitales d'origine infectieuse, ou ceux pour lesquels une raison évidente, vasculaire

Jean-Pierre Siffroi
Corine Le Bourhis
Csilla Krausz
Jean-Pierre Dadoune
Marc Fellous

J.P. Siffroi, C. Le Bourhis, J.P. Dadoune : Service d'histologie, biologie de la reproduction et cytogénétique, Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France. C. Krausz, M. Fellous : Inserm U.527, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

ou endocrinienne, est retrouvée, des causes génétiques peuvent être suspectées pour expliquer l'infertilité des autres. Parmi ces dernières, certaines entraînent une stérilité par un processus malformatif, comme les mutations du gène *CFTR* responsables à la fois de la mucoviscidose et de l'absence congénitale des canaux déférents, alors que d'autres ont un effet sur la production ou la maturation des cellules germinales. S'il convient de rechercher autant que possible toutes ces causes génétiques de façon à pouvoir donner un conseil éclairé aux couples et, surtout, à prévoir les risques éventuels pour la descendance, les secondes revêtent un intérêt scientifique particulier car elles permettent de mieux comprendre le contrôle génétique de la spermatogenèse, et en particulier celui de la méiose, contrôle qui se révèle largement multigénique.

Du caryotype à la biologie moléculaire

Les données les plus anciennes concernant les rapports entre les anomalies génétiques et l'infertilité mas-

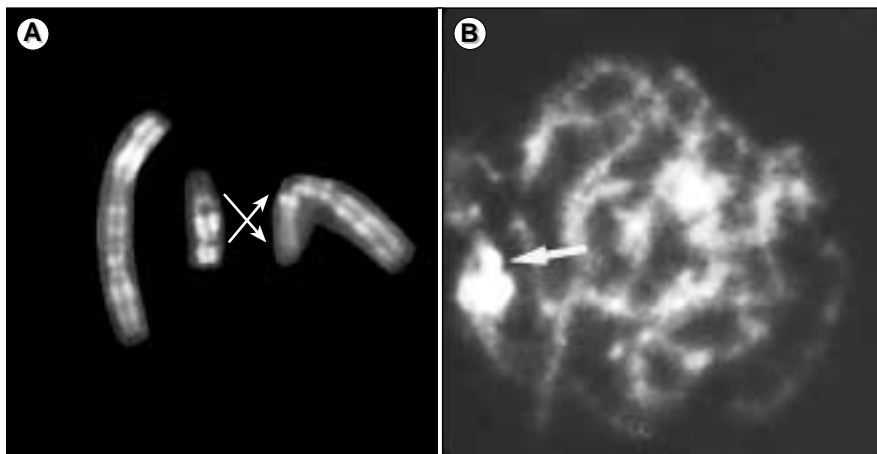


Figure 1. **Exemple d'une translocation chromosomique t (Y;6) chez un patient infertile.** **A.** Après incorporation du BrdU, par rapport au chromosome 6 normal, on voit nettement que les bras long du chromosome Y et court du 6 sont interchangeés. **B.** Après coloration par la moutarde de quina-crine, le chromosome 6 transloqué, repérable par la fluorescence caractéristique du chromosome Y, est observé au contact de la vésicule sexuelle dans un spermatocyte au stade pachytène. Ce type d'association entraîne soit un défaut d'inactivation des gonosomes, soit une inactivation anormale d'un fragment autosomique et un blocage de la méiose (photographie Dr F. Viguié).

culine ont trait aux anomalies du caryotype. Cet aspect de l'infertilité masculine a déjà été traité en détail dans un précédent article [1]. Globalement, la fréquence des anomalies chromosomiques dans la population des hommes présentant des chiffres du spermogramme inférieurs à 10 millions de spermatozoïdes/ml est multipliée par dix. Cette donnée est importante dans la mesure où elle impose une proposition de diagnostic prénatal en cas de grossesse évolutive après technique d'aide médicale à la procréation. Si le risque pour la descendance semble ne pas être très élevé chez les hommes atteints de syndrome de Klinefelter (47,XXY), en mosaïque ou homogène, il n'en est pas de même de ceux qui sont porteurs d'une translocation Robertsonienne (fusion centrique entre chromosomes acrocentriques) ou réciproque, pour lesquels le risque de voir naître un enfant présentant un syndrome chromosomique malformatif avec retard mental, par transmission déséquilibrée de la translocation, peut dépasser 30%.

Les raisons qui font qu'un homme porteur d'une translocation chromosomique est infertile ne sont pas encore claires puisque, dans une même famille, deux sujets atteints

peuvent présenter des atteintes très variables de leur spermatogenèse. Le caractère aléatoire des points de cassure observés sur les chromosomes plaide plus en faveur d'une altération mécanique de la différenciation des cellules germinales que de l'inactivation éventuelle d'un gène impliqué dans la spermatogenèse. En effet, les chromosomes transloqués s'associent fréquemment, pendant la méiose, à la vésicule sexuelle qui contient les chromosomes X et Y inactivés [2] (figure 1). Une telle association aboutirait soit à un défaut d'inactivation des gonosomes avec, notamment, l'absence d'extension du produit du gène *XIST* (*X inactivation specific transcripts*) du chromosome X sur l'Y, soit au contraire à une inactivation des segments autosomiques transloqués [3]. Le déséquilibre génique entrainerait alors un blocage de la spermatogenèse au stade pachytène de la méiose. Selon le pourcentage de cellules germinales dans lequel une telle association survient, l'homme porteur du remaniement chromosomique développera une infertilité plus ou moins sévère. D'autres anomalies équilibrées du caryotype, comme certaines inversions, peuvent également conduire à une oligozoospermie.

Ce sont également des anomalies cytogénétiques visibles au microscope qui ont permis d'établir le rôle prépondérant du chromosome Y dans la fertilité masculine (figure 2). De petite taille (2% à 3% du génome), ce chromosome se compose de plusieurs régions impliquées respectivement dans l'appariement au chromosome X pendant la méiose (régions PAR1 et PAR2: *pseudo autosomal region*), dans le déterminisme du sexe et dans le bon déroulement de la spermatogenèse (figure 2). En effet, malgré cette petite taille et une faible colorabilité par les techniques cytogénétiques classiques, le chromosome Y peut être le siège d'anomalies de structure visibles au microscope: délétions (Yq-), anneaux [r(Y)], isochromosomes Yp (Y anormal formé de deux bras courts en miroir de part et d'autre du centromère), translocations Y-autosome (figure 3). Observées le plus souvent chez des hommes infertiles, ces anomalies ont en commun la perte d'une partie plus ou moins importante de la région euchromatique du bras long. Il revient à Tiepolo et Zuffardi [4] d'avoir les premiers supposé la présence d'un facteur de contrôle de la spermatogenèse dans cette région critique de l'Y à partir de 6 patients présentant une délétion dont le point de cassure était situé en Yq11. Ce facteur prendra ensuite l'appellation générique d'AZF (*azoospermia factor*) et il faudra attendre le développement des techniques de biologie moléculaire pour commencer à en comprendre la nature.

L'analyse moléculaire du chromosome Y

Grâce à l'utilisation de sondes moléculaires, le chromosome Y a pu être subdivisé en 7 intervalles [5] et l'observation de patients présentant des délétions du bras long a permis d'assigner à la région Yq11 (intervalles 5 et 6), située au-dessus de la portion hétérochromatique (intervalle 7), un rôle majeur dans le maintien de la spermatogenèse. Grâce à ces outils, des délétions interstitielles ont été décrites dans cette région du chromosome Y chez des patients infertiles [6]. Les progrès récents dans la cartographie physique du génome humain ont rendu possible la multiplication des

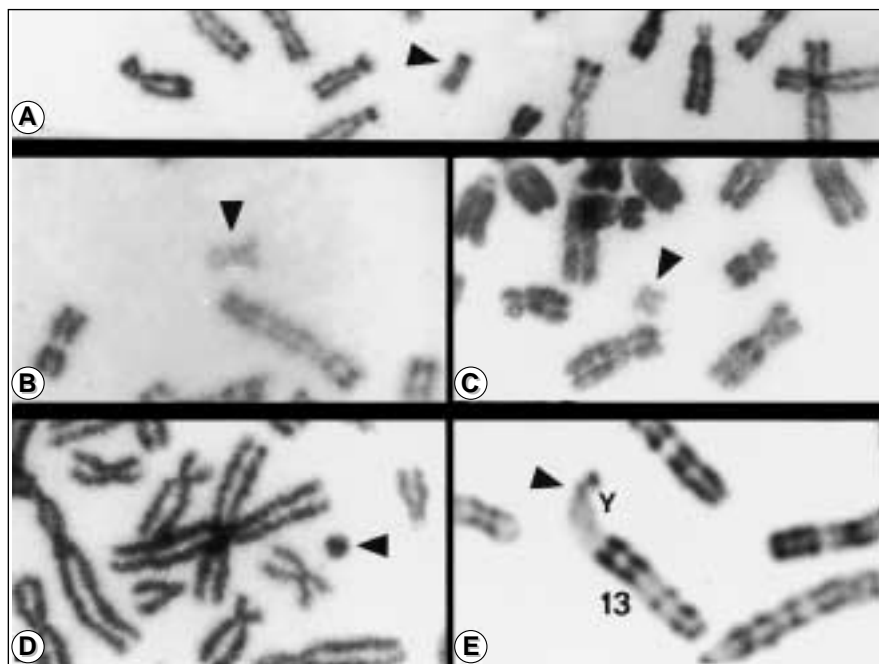


Figure 2. **Anomalies cytogénétiques du chromosome Y.** A. Chromosome Y normal. B. Inversion péricentrique du chromosome Y. C. Délétion terminale du bras long. D. Anneau du chromosome Y. E. Translocation Y-13.

marqueurs anonymes disponibles le long du chromosome Y (STS: *sequence tagged sites*) [7, 8]. Ces derniers, dont la taille varie de quelques dizaines à quelques centaines de paires de bases, sont facilement amplifiables par PCR à partir de l'ADN extrait d'une prise de sang, rendant ainsi détectable leur présence ou leur absence chez un individu. L'utilisation de ces outils a permis d'observer un certain nombre de patients infertiles dont les délétions n'étaient pas chevauchantes ce qui a conduit à subdiviser le facteur AZF en trois locus différents, AZFa dans l'intervalle 5, AZFb à cheval sur les intervalles 5 et 6 et AZFc dans l'intervalle 6 [9].

Dès lors, un ensemble de travaux a abouti à la publication de séries importantes d'hommes infertiles présentant des azoospermies ou des oligozoospermies sévères de nature sécrétoire [9-20] (Tableau I). Selon les études, différant quant à la gravité de l'atteinte spermatique prise en compte pour l'inclusion des patients et au caractère idiopathique ou non de celle-ci, l'incidence des microdélétions du chromosome Y dans ces populations d'hommes infertiles a été estimée entre 3 % et 28 %. Pour autant que les STS aient été correcte-

ment choisis, il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre de marqueurs testés et la fréquence des délétions [21]. En revanche, une étude récente a montré que l'association de microdélétions de l'Y avec d'autres pathologies affectant la spermatogenèse, comme une varicocèle ou des antécédents de cryptorchidie, pouvait être possible, ce qui n'est pas étonnant étant donnée la fréquence de ces dernières chez les hommes [22]. Il n'est pas impossible enfin que les variations dans la fréquence des microdélétions traduisent des différences ethniques ou géographiques en relation avec des haplotypes particuliers de l'Y ou avec des facteurs environnementaux. Ce type d'hypothèse est en cours d'étude dans le cadre d'analyses de populations.

Corrélations génotype-phénotype

Les délétions moléculaires de la région Yq11 sont constamment associées à une infertilité masculine, puisqu'elles ne sont jamais retrouvées dans des populations témoins d'hommes fertiles, sauf exception [14] pour lesquelles les marqueurs délétés sont polymorphes. La gravité

de l'atteinte testiculaire peut, en revanche, varier selon les cas. En général, les délétions d'AZFa s'accompagnent d'une azoospermie par absence totale de cellules germinales dans les tubes séminifères (syndrome SCO: *sertoli cell only*) [9] alors que celles d'AZFb sont plutôt associées à un arrêt de maturation de celles-ci à un niveau variable de la spermatogenèse. Les microdélétions du locus AZFc sont rencontrées chez des patients présentant une azoospermie ou une oligozoospermie sévère, inférieure à 1 ou 2 millions spermatozoïdes/ml. De plus, chez ces derniers, l'histologie testiculaire peut montrer d'importantes variations d'un tube séminifère à un autre avec un aspect de SCO sur certaines sections et une spermatogenèse plus ou moins conservée sur d'autres. Un dernier facteur susceptible de modifier le phénotype associé à une microdélétion est l'âge des patients puisqu'il a pu être montré une aggravation de l'atteinte testiculaire au cours des années chez certains hommes délétés [23]. Ce dernier point est à prendre en compte dans le conseil génétique et la prise en charge thérapeutique par ICSI de tels patients.

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

Gènes ubiquitaires et gènes testiculaires sur le chromosome Y

La mise en évidence de délétions chez des patients infertiles a conduit à rechercher les gènes candidats du locus AZF, c'est-à-dire ceux dont la perte est responsable d'une atteinte sévère de la spermatogenèse. Plusieurs gènes ou familles de gènes ont été identifiés et peuvent être divisés entre ceux qui s'expriment de façon ubiquitaire dans l'organisme (gènes de ménage), et qui possèdent généra-

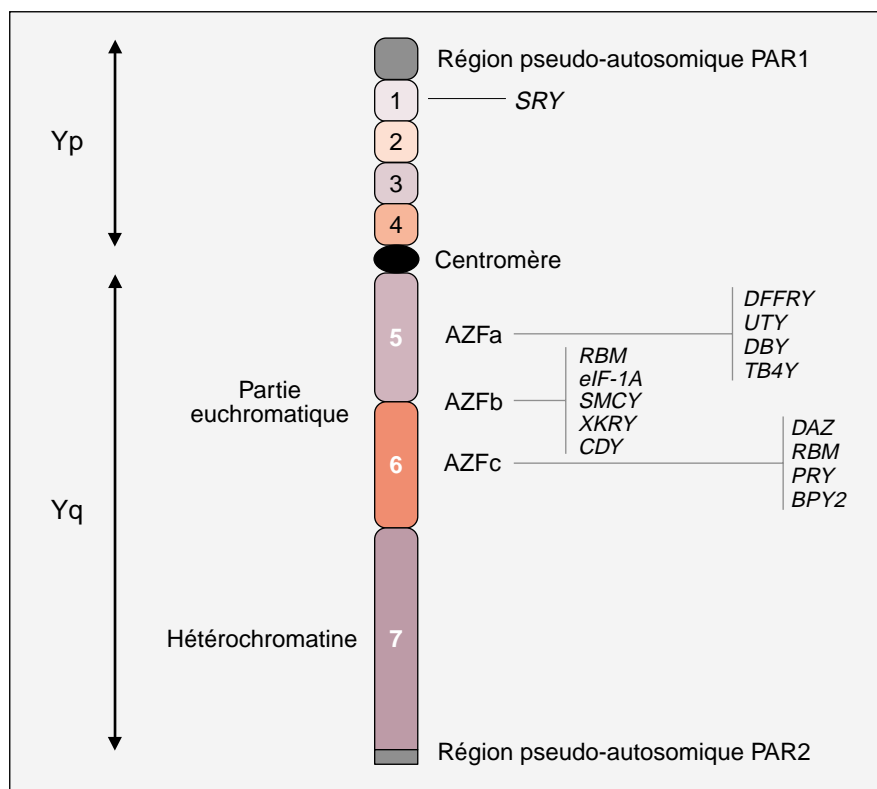


Figure 3. Schéma du chromosome Y représentant les 7 intervalles de délétions.

lement un homologue sur l'X échappant à l'inactivation, et ceux dont l'expression est limitée au testicule. Les premiers sont en copie unique et incluent les gènes *Drosophila fats facets related Y (DFFRY/USP9Y)*, *dead box Y (DBY)*, *ubiquitous tetratricopeptide repeat (TPR) motif Y (UTY)*, *eukaryotic translation-initiation-factor 1A Y-isoform (eIF-1AY)*, *selected mouse cDNA-Y (SMCY)* et *thymosin β 4-Y isoform (T β 4Y)*. Les seconds sont généralement présents en multiples copies, et, en général, sans homologue sur l'X, et comportent les gènes de la famille *RBM* (*RNA binding motif-Y*), le gène *DAZ (deleted in azoospermia)*, les gènes *chromodomain-Y (CDY)*, *XK-related Y (XKRY)*, *protein-tyrosine phosphatase BAS-like (PTB-BL)-related Y (PRY)* et les gènes codant pour les protéines basiques Y1 et Y2 (*BPY1*, *BPY2*).

La position des ces différents gènes dans le bras long de l'Y, par rapport aux locus AZF, est indiquée sur la figure 3. Leur intérêt vient évidemment de leur fonction respective mais surtout de leur implication dans le phénotype de stérilité. Ainsi, le gène

DFFRY, qui code pour une protéine de désubiquitination, joue probablement un rôle important dans la gamétogenèse si l'on en croit les mutations décrites chez la drosophile [24] et dans le gène homologue *USP9Y* chez l'homme [25] bien que, dans ce dernier cas, une mutation ponctuelle d'*USP9Y* ne semble donner qu'un arrêt de la maturation en méiose dans la majorité des cellules germinales. Les délétions d'AZFa n'entraîneraient un SCO qu'à travers la perte d'*USP9Y* mais également du gène *DBY* voisin. La famille de gènes *RBM* qui comporte au moins 30 membres répartis sur toute la longueur de l'Y, est en fait principalement constituée de pseudo-gènes et seule(s) la (ou les) copie(s) située(s) dans le locus AZFb est (sont) exprimée(s) sous la forme d'une protéine nucléaire de liaison à l'ARN, retrouvée dans le noyau des spermatogonies et des spermatoocytes primaires [26]. Les délétions de cette région sont en effet associées à l'absence de la protéine reconnue par un anticorps spécifique [27]. Quant au gène *DAZ*, longtemps considéré comme un élément majeur du facteur

AZF en raison des mutations de son homologue chez la drosophile, le gène *boule* [28], il dérive, par transposition sur l'Y et modifications ultérieures, d'un gène ancestral porté par le chromosome 3 humain, le gène *DAZLA 1 (DAZ like-autosomal 1)* [29]. L'équivalent murin de ce gène, *Dazla 1*, est porté par le chromosome 17 [30]. Les délétions du locus AZFc qui contient le gène *DAZ* sont associées à des atteintes testiculaires très variables. Bien que certaines délétions de ce locus, décrites chez des hommes infertiles, épargnent *DAZ* [31] et qu'aucune mutation ponctuelle de ce gène n'ait été retrouvée chez des patients azoospermiques [32], il semble cependant que le gène *DAZ* possède une fonction importante dans la spermatogenèse. La réintroduction par transgénése du gène *DAZ* humain chez des souris *Dazl^{-/-}*, qui présentent une atteinte méiotique et une déplétion sévère en cellules germinales, restaure – mais très partiellement – un phénotype testiculaire normal [33].

En revanche, la description récente d'une famille dans laquelle un père a pu transmettre une délétion d'AZFc, incluant le gène *DAZ* mais épargnant le locus *RBM*, à quatre fils tous infertiles soulève de nombreuses questions [34] : les rapports entre l'existence d'une délétion sur l'Y et le génome particulier d'un individu, ses antécédents cliniques ou certains facteurs environnementaux pourraient en effet moduler l'impact de l'anomalie génétique sur la spermatogenèse. De plus, l'âge, auquel certains patients présentant une délétion et ayant une oligospermie modérée voire sévère, voient leurs chiffres de spermogramme s'effondrer, peut varier d'un sujet à l'autre. Cela explique que certains d'entre eux puissent quand même être féconds à un moment donné lorsque leur conjointe est particulièrement fertile. Ce dernier point peut conduire les médecins à conseiller une conservation de sperme des patients lorsque ceux-ci souhaitent différer leur paternité. Enfin, le diagnostic de l'atteinte testiculaire chez un patient doit tenir compte de l'extrême variabilité qui peut exister entre des régions différentes d'un même testicule, voire entre des tubes séminifères voisins (figure 4). Si cette hétérogénéité a pu être montrée chez certains patients

Tableau I
RÉSUMÉ DES MICRODÉLÉTIONS RAPPORTÉES DE 1995 À 1999

Références	Nombre de délétions/nombre total de patients	%	Nombre de délétions/nombre d'azoospermies	%	Nombre de délétions/nombre d'oligospermies	%	Nombre de délétions/nombre de patients fertiles	Nombre STS* utilisés
Études de patients sélectionnés								
[10]	12/89	13	12/89	13			0/90	84
[12]	6/33	18	4/19	21	2/14	14	0/10	14
[11]	2/35	5,7			2/35	5,7		118
[9]	12/370	3,2					0/200	76
[31]	11/38	28	6/16	37	5/22	22	0/10	15
[15]	5/168	2,9	3/74	4	2/94	2,1	0/86	4
[16]	2/152	1,3	0/10	0	1/137	0,7	0/50	30
[23]	8/156	5,1	6/105	5,7	2/41	4,8	0/6	36
[17]	40/140	28	19/55	34,5	21/85	24,7	0/180	38
[18]	8/40	20	8/40	20			0/14	37
[20]	6/53	11	3/21	14	3/32	9,3	0/35	12
Études de patients non sélectionnés								
[14]	14/200	7	6/26	23	7/72	9,7**	4/200	85
[13]	7/164	4,2	0/19	0	7/111	6,3	0/100	8
[19]	3/134	2,2	1/22	4,5	2/95	2,1	0/10	10
[22]	21/131	16	15/83	18	6/46	13	0/40	21

* STS: sequence tagged sites ; ** Délétions SY 207 et SY 272 polymorphes.

délétés [10], elle est également fréquente chez les hommes présentant une altération idiopathique de leur spermatogénèse. Dans ces cas, elle pourrait être due à des facteurs génétiques difficiles à diagnostiquer (mosaïques 47,XXY ou 45,XO confinées au testicule) ou à des causes extérieures (perturbations vasculaires locales).

L'utilité des modèles animaux

Les données actuelles ne permettent pas de dire si le chromosome Y

contient des gènes fonctionnels impliqués directement dans le processus spermatogénétique ou indirectement comme par exemple des gènes de régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. En effet, l'étude des modèles animaux, et principalement celle des mutants murins obtenus par transgénèse, montre que l'inactivation d'un grand nombre de gènes, gonosomiques ou autosomiques, ou leur surexpression aboutit à un phénotype de stérilité ou d'hypofertilité chez les mâles et parfois chez les femelles [35] (Tableau II). L'intérêt de ces modèles

est double puisque d'une part ils déterminent la responsabilité d'un gène particulier dans une stérilité et que d'autre part ils permettent de localiser le niveau de l'atteinte dans la spermatogénèse par l'étude histologique du testicule. Il est ainsi possible de différencier les gènes agissant sur la multiplication des spermatogonies, la méiose et les mécanismes de réparation de l'ADN ou encore la maturation des spermatides et des spermatozoïdes. Une corrélation avec la pathologie humaine peut ensuite être établie, tout en sachant qu'un examen spermatique normal ne signifie

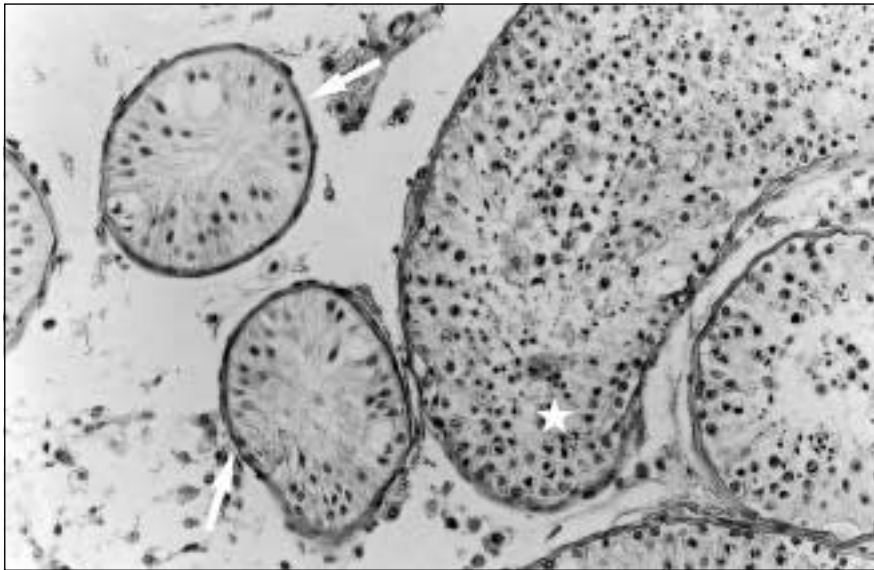


Figure 4. **Coupe de testicule montrant la variabilité de l'atteinte testiculaire chez certains patients.** Des tubes séminifères voisins peuvent montrer des phénotypes totalement différents allant d'un syndrome des cellules de Sertoli seules (flèches) à une spermatogenèse relativement conservée (étoile).

pas forcément une absence de défaut génétique. En effet, une mutation à l'état hétérozygote d'un gène à expression postméiotique ou une haplo-insuffisance n'entraîne pas obligatoirement de perturbation de la spermatogenèse en raison de ponts cytoplasmiques existant entre les cellules germinales et permettant la libre circulation des transcrits [36].

Le recul des limites de la stérilité masculine

Selon les normes de l'OMS, l'oligozoospermie est définie par une concentration de spermatozoïdes inférieure à 20 millions/ml. En-dessous de cette valeur, la probabilité de survenue d'une grossesse naturelle diminue fortement sans que l'on puisse réellement établir une limite inférieure à partir de laquelle elle devient nulle. Néanmoins, lorsque l'atteinte de la spermatogenèse paraît trop sévère ou lorsque des tentatives d'insémination avec le sperme du conjoint (IAC) ont échoué, il est légitime de proposer une aide médicale à la procréation (AMP) et notamment la technique d'ICSI (figure 5). En effet, autant la fécondation *in vitro* classique a complètement modifié le traitement de l'infertilité féminine d'origine tubaire, autant l'ICSI a révolutionné celui de la stérilité mas-

culine puisque cette méthode s'adresse même à des patients azoospermiques dans l'éjaculat, mais dont le testicule produit néanmoins quelques rares spermatozoïdes susceptibles d'être récupérés par biopsie et micro-injectés. L'ICSI vient également en aide aux hommes présentant une obstruction congénitale ou acquise des voies génitales, pour lesquels une ponction épидидymaire ou une biopsie testiculaire permet d'obtenir suffisamment de spermatozoïdes vivants. Mieux encore, après quelques tentatives réussies chez la souris, l'utilisation de cellules germinales immatures, c'est-à-dire de spermatides à des degrés variables de leur différenciation, a été tentée avec succès chez des hommes atteints d'azoospermie par blocage dans le processus de la spermiogenèse [37, 38].

Dès lors, la question se pose de savoir où s'arrêteront les possibilités thérapeutiques dans le traitement de l'infertilité masculine puisque chez la souris, certaines équipes sont même parvenues à utiliser des spermatocytes II dans des expériences de micro-injection et à obtenir ainsi des portées [39]. Outre l'aspect cognitif que présente l'observation d'une fin de méiose se déroulant à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire, avec expulsion d'un pseudoglobule polaire d'origine mâle, ces expériences posent évidemment le

problème de leur innocuité dans l'éventualité de leur utilisation future chez l'homme. En effet, rien ne permet de dire que ces cellules germinales jeunes ont acquis une maturité nucléaire suffisante pour participer sans risque pour le développement embryonnaire ou fœtal ultérieur au processus de fécondation, même si certains mécanismes comme ceux liés à la mise en place d'une empreinte génomique paternelle semblent être achevés assez tôt dans la spermatogenèse.

Appliquée d'emblée à l'espèce humaine sans expérimentation animale préalable, l'ICSI avait fait naître certaines craintes quant à la santé des enfants conçus par sa pratique. Portant sur les risques de malformations et d'anomalies chromosomiques, ces craintes ne semblent pas être fondées au vu des séries de plus en plus importantes qui sont publiées sur ce sujet [40, 41] (voir l'article de F. Olivennes *et al.*, p. 316 de ce numéro). Seule une augmentation de la fréquence des anomalies des chromosomes sexuels a pu être notée chez les enfants à la naissance (caryotypes 47,XXY ; 47,XXX), probablement en rapport avec le fait qu'un certain nombre de patients traités sont eux mêmes porteurs d'une anomalie chromosomique en mosaïque du type 47,XXY/46,XY, non détectable par le caryotype réalisé sur cellules sanguines mais présente au niveau germinale.

Si l'ICSI permet de traiter des hommes dont la spermatogenèse est profondément altérée, elle nécessite cependant l'obtention d'ovocytes matures après stimulation ovarienne chez la femme et recueil par ponction échoguidée, autant d'étapes difficiles à supporter et non dénuées de risques. L'idéal serait donc de pouvoir restaurer une spermatogenèse efficace chez les hommes infertiles de façon à leur permettre d'obtenir des grossesses naturelles. En dehors de l'approche chirurgicale visant à corriger une anomalie physique, comme une cure de varicocèle ou la dérivation d'un obstacle sur les voies génitales, les possibilités thérapeutiques sont peu nombreuses. Les tentatives variées de traitements médicamenteux de suppléance n'ont en effet jamais fait preuve de leur efficacité sur la stimulation d'une spermatogenèse déficiente. Dès lors, le recours à des techniques nouvelles, comme la transplantation de cellules germinales

Tableau II

ÉTUDE DES MODÈLES ANIMAUX : PRINCIPAUX GÈNES DONT LA MUTATION, LE *KNOCK-OUT* OU LA SUREXPRESSION ENTRAÎNENT UNE STÉRILITÉ MÂLE CHEZ LA SOURIS

Expression dans les cellules germinales primordiales (PGC) et/ou dans les spermatogonies		
Gène	Fonctions de la protéine	Phénotype mutant
<i>W</i> (dominant white spotting) <i>Sl</i>	Proto-oncogène c-Kit. Récepteur tyrosine kinase	Défaut de migration des PGC Anomalies des spermatogonies
<i>Tiar</i>	<i>steel factor</i> : ligand de c-Kit	Défaut de migration des PGC Blocage au stade des spermatogonies
<i>mTR</i>	Liaison à des particules ribo-nucléoprotéiques Activité télomérase	Réduction du nombre puis disparition des PGC. Absence de spermatogonies Diminution de la prolifération des spermatogonies au cours des générations puis disparition de la spermatogenèse
<i>Zfx</i> <i>Dazla</i>	Facteur de transcription Liaison à l'ARN	Diminution du nombre des PGC Diminution du nombre puis disparition des cellules germinales. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes chez les hétérozygotes
<i>c-myc</i> (exogène)	Proto-oncogène. Facteur de prolifération et de différenciation cellulaire	Mauvaise différenciation des spermatocytes et spermatogonies en cas d'hyperexpression
<i>Bcl-2</i> (exogène) <i>Bax</i>	Prévention de la mort cellulaire programmée (apoptose) Apoptose	Accumulation transitoire des spermatogonies en cas d'hyperexpression Accumulation des spermatogonies et des spermatocytes préleptotènes. Augmentation du nombre de cellules apoptotiques
Expression en prophase de méiose I		
<i>Dmc 1</i>	Réparation de l'ADN Recombinaison méiotique	Blocage de la méiose au stade zygotène. Apoptose
<i>Mlh 1</i>	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN	Blocage de la méiose au stade pachytène. Instabilité des microsattellites
<i>Pms 2</i>	Correction des défauts d'appariement dans l'ADN	Anomalies synaptiques au stade pachytène. Instabilité des microsattellites
<i>Atm</i> (mutation dans l'ataxie télangiectasie) <i>c-Abl</i>	Détection des cassures double-brin de l'ADN. Recombinaison méiotique	Blocage de la méiose aux stades zygotène-pachytène. Fragmentation Apoptose des chromosomes.
<i>Hsp 70-2</i> <i>A-myb</i> <i>p53</i>	Association avec la protéine kinase dépendante de l'ADN, ADN-PK Désynapsis Régulation de la transcription Surveillance de l'intégrité du génome	Défaut de progression en méiose après le stade pachytène Apoptose en fin de stade pachytène Blocage de la méiose au stade pachytène. Apoptose Dégénérescence des cellules pré-méiotiques et méiotiques. Présence de cellules géantes multinucléées
Expression aux stades méiotiques et postméiotiques		
<i>Bmp8b</i> (bone morphogenetic proteins) <i>Bsg</i>	Protéine sécrétée de la famille du <i>transforming growth factor</i> β (TGF β) Protéine transmembranaire de la superfamille des Ig	Défaut d'initiation de la méiose à la puberté. Augmentation de l'apoptose au stade pachytène chez l'adulte. Diminution du nombre des spermatozoïdes Dégénérescence des cellules germinales au stade métaphase I
Expression au stade haploïde		
<i>CREM</i>	Activateur de la transcription	Blocage en début de spermiogenèse Oligozoospermie et tératozoospermie chez l'hétérozygote
<i>mHR6B</i>	Ubiquitinylation des histones 2A et 2B <i>in vitro</i>	Absence quasi complète des spermatozoïdes Tératozoospermie
<i>Bclw</i> <i>Prpb</i> <i>Acr</i>	Prévention de l'apoptose Régulation traductionnelle Acrosine. Protéase	Blocage au stade des spermatozoïdes Défaut de mise en place des protamines Retard dans la pénétration de la zone pellucide mais fertilité
<i>Ace</i> <i>Calmégine</i>	Enzyme de conversion de l'angiotensine Chaperone liée au Ca ²⁺	Défaut de fixation à la zone pellucide Défaut de fixation à la zone pellucide

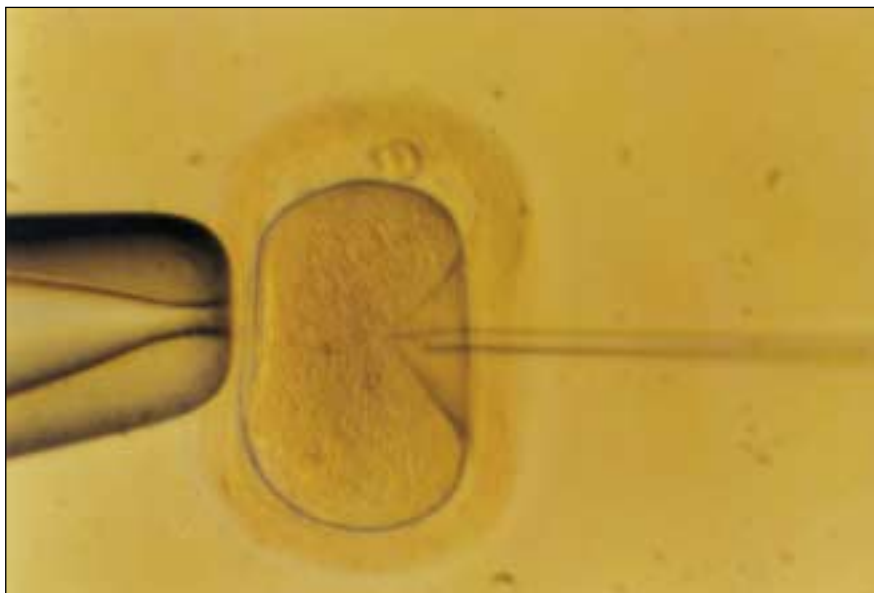


Figure 5. **Micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte (ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection)** (photographie Dr J. Mandelbaum).

dans le testicule, peut être envisagé dans l'avenir. Cette méthode, mise au point chez les rongeurs [42], consiste à injecter des spermatogonies ayant les propriétés de cellules souches dans un testicule pour qu'elles s'y fixent et qu'elles y développent une spermatogenèse normale. Elle a ensuite été élargie à d'autres espèces y compris aux primates [43]. Différentes variantes ont été essayées, fondées sur la cryoconservation des cellules germinales avant greffe, la transplantation de celles-ci chez le même animal dans un autre organe (autogreffe hétérotopique), voire chez un animal d'une autre espèce (greffe xénogénique), ou encore l'injection d'un mélange de cellules testiculaires [43]. Une étude récente a également permis de démontrer que la greffe de spermatogonies de souris mutantes Steel chez d'autres souris porteuses de la mutation *dominant white spotting*, souches toutes deux infertiles, permettait de corriger le défaut génétique initial et de restaurer une spermatogenèse efficace, réalisant ainsi un véritable test de complémentation *in vivo* [44]. L'application de ces techniques à l'homme ne pourrait concerner que la préservation des capacités reproductives de patients devant subir des traitements stérilisants comme des chimiothérapies anticancéreuses. Par rapport à la pratique actuelle de l'autoconservation de spermatozoïdes, cette méthode permettrait

de traiter les enfants dont la spermatogenèse n'est pas encore développée ou les adultes malades dont le mauvais état général fait qu'ils sont souvent oligozoospermiques au moment du recueil de sperme. La greffe de cellules germinales serait donc la seule alternative à l'adoption ou à l'insémination avec donneur pour ces hommes désirant assurer leur propre paternité. Il n'appartient pas qu'aux scientifiques d'intervenir dans le débat sur le rôle du père, biologique ou affectif, mais d'offrir les possibilités techniques permettant le choix dans leur manière de donner la vie. A cet égard, il convient de rappeler que le don de gamètes n'est autorisé que lorsque toutes les solutions de procréation naturelle ont été explorées, ce qui justifie *a priori* toutes les recherches visant à traiter l'infertilité, quelle soit féminine ou masculine. Cependant, les possibilités de maintien en culture des spermatogonies prélevées dans un testicule [45] ouvrent la voie de leur manipulation par génie génétique. De telles pratiques soulèvent des questions éthiques encore non résolues, puisqu'elles touchent au tabou de la manipulation des cellules germinales ■

Remerciements

Ce sujet a bénéficié de l'aide financière de l'AP-HP (PHRC AOM 96142 et CRC 96053).

RÉFÉRENCES

1. Bourgeron T, Barbaux S, McElreavey K, Fellous M. La génétique de la stérilité masculine. *Med Sci* 1996; 12: I-VIII.
2. Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carre-Pigeon F, Rumpler Y. Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46, XY, t(19;22) and 46, XY, t(17;21). *Cytogenet Cell Genet* 1986; 43: 154-60.
3. Ayoub N, Richler C, Wahrman J. *Xist* RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis. *Chromosoma* 1997; 106: 1-10.
4. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-24.
5. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 109-24.
6. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89: 491-6.
7. Vollrath D, Foote S, Hilton A, et al. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-9.
8. Foote S, Vollrath D, Hilton A, et al. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 1992; 258: 60-5.
9. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.
10. Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in human caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383-93.
11. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996; 347: 1290-3.
12. Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- and azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72: 155-8.
13. Kremer JAM, Tuerlings JHAM, Meuleman EJM, et al. Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod* 1997; 12: 687-91.
14. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-9.
15. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (deleted in azoospermia) gene in azoospermia and severe oligospermia. *Fertil Steril* 1997; 67: 542-7.

RÉFÉRENCES

16. Van der Ven K, Montag M, Peshka B, *et al.* Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intra cytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 699-704.
17. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 1999; 14: 1710-6.
18. Kim SW, Kim KD, Paick JS. Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril* 1999; 72: 349-53.
19. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, McElreavey K, Scarselli G, Forti G. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1717-21.
20. Seifer I, Amat S, Delgado-Viscogliosi, Boucher D, Bignon YJ. Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men. *Int J Androl* 1999; 22: 148-54.
21. Simoni M, Kamishke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in the work up of male fertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 1764-8.
22. Krausz C, Quintina-Murci L, Barbaux S, *et al.* A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3606-12.
23. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12: 1635-41.
24. Brown GH, Funlong RA, Sargent CA. Characterization of the coding sequence and fine mapping of the DFFRY gene and comparative Dffry gene. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 97-107.
25. Sun C, Skaletsky H, Birren B, *et al.* An azoospermic man with a *de novo* point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet* 1999; 23: 429-32.
26. Chandley AC, Cooke AJ. Human male fertility-Y linked genes and spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1449-52.
27. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, *et al.* Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3848-53.
28. Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 1996; 381: 783-5.
29. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, *et al.* The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 14: 292-9.
30. Cook HJ, Lee M, Kerr S, Ruggiu M. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 513-6.
31. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, *et al.* Y chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997; 82: 1075-80.
32. Vereb M, Agulnik AI, Houston JT, *et al.* Absence of DAZ gene mutations in cases of non-obstructed azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 55-9.
33. Slee R, Grimes B, Speed RM, *et al.* A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl null phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8040-5.
34. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 1999; 14: 2689-94.
35. Escalier D. Mammalian spermatogenesis investigated by genetic engineering. *Histol Histopathol* 1999; 14: 945-58.
36. Escalier D. What are the germ cell phenotypes from infertile men telling us about spermatogenesis? *Histol Histopathol* 1999; 14: 959-71.
37. Fishel S, Green S, Bishop M, *et al.* Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* 1995; 345: 1641-2.
38. Tesarik J, Rolet F, Biami C, *et al.* Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 780-3.
39. Sasagawa I, Kuretake S, Eppig JJ, Yanagimachi R. Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol Reprod* 1998; 58: 248-54.
40. Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998; 351: 1529-34.
41. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, *et al.* A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13: suppl 1: 196-207.
42. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
43. Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod* 1999; 14: 144-50.
44. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 2000; 6: 29-34.
45. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 1998; 30: 389-97.

MS2000

Summary

Male infertility :
molecular pathologies
and new therapeutic approaches

Recent progress in assisted reproductive technology, and particularly intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), have dramatically modified the prognosis of human male infertility. Men who would have been considered as definitively sterile a few years ago can now have a progeny. However, this technical progress raises the question of the transmission to the offspring of genetic defects responsible for the patient's infertility. The association between non-obstructive male infertility and chromosomal abnormalities is well known and imposes paternal chromosome analysis because of a potential risk of unbalanced karyotype in children born from affected fathers. Microdeletions of the Y chromosome long arm have been described in more than 10% of men carrying idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. These deletions map into three different subregions making up the azoospermia factor (AZF). Molecular analysis of non-overlapping deletions has led to the discovery of a number of Y-linked genes or gene families potentially involved in germ cell multiplication and/or differentiation. These genes probably act with autosomal genes, thus reflecting the multigenic control of spermatogenesis. Study of mutant animals represents a promising way for determining new genes involved in this process. On account of the close association between genetic defects and male infertility, genetic counselling is now an obligatory step in investigations in infertile men before any attempt at ICSI.

TIRÉS À PART

M. Fellous.