

# UNIVERSITÉ GRENOBLE-ALPES

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE-ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement**

Arrêté ministériel : ?

Présentée par

**Thomas Karaouzene**

Thèse dirigée par **Pierre Ray**

Thèse co-dirigée par **Nicolas Thierry-Mieg**

préparée au sein du laboratoire  
et de l'école doctorale "**Ingénierie de la Santé, de la Cognition et Environnement**" (EDISCE)

**Écrire le titre de la thèse ici**

Thèse soutenue publiquement le 31 octobre 2017,  
devant le jury composé de :



# Préface

This is an example of a thesis setup to use the reed thesis document class (for LaTeX) and the R bookdown package, in general.



# Table des matières

<b>Chapitre 1 : Delete line 6 if you only have one advisor . . . . .</b>	<b>1</b>
<b>Remerciements . . . . .</b>	<b>3</b>
<b>Résumé . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre 2 : Introduction . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre 3 : Investigation génétique et physiologique de la globo- zoospermie . . . . .</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre 4 : Mise en place d’une stratégie pour l’analyse des données exomiques – application en recherche clinique . . . . .</b>	<b>11</b>
4.1 Intro . . . . .	11
4.2 Résultats . . . . .	11
4.2.1 Description de la pipeline . . . . .	11
4.2.2 utilisations de la pipeline pour l’identifications de variants pathogènes et l’identification de nouveaux gènes impliqués dans l’infertilité . . . . .	11
Etude familiale MMAF -> DNAH1 . . . . .	11
Etude familiale echec de fécondation -> PLCzeta . . . . .	11
Etude familiale azoospermie : SPINK2 . . . . .	11
Etude d’une large cohorte de patients MMAF . . . . .	15
<b>Chapitre 5 : MutaScript . . . . .</b>	<b>17</b>
<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre 6 : The First Appendix . . . . .</b>	<b>21</b>
<b>References . . . . .</b>	<b>23</b>



# Liste des tableaux





# Table des figures

4.1	Arbre généalogique des deux frères azoospermes B1 et B2 . . . . .	12
4.2	Comptage des variants retrouvés sur les frères B1 et B2 avec leur génotypes associés . . . . .	13
4.3	Expression du gène *SPINK2* dans plusieurs tissus . . . . .	14
4.4	Représentation du gène *SPINK2* . . . . .	14
4.5	Mise en évidence de l'azoospermie des souris *Spink2* <sup>-/-</sup> . . . . .	15



## Chapitre 1

Delete line 6 if you only have one advisor



# Remerciements



# Résumé





# Chapitre 2

## Introduction



## Chapitre 3

### Investigation génétique et physiologique de la globozoospermie



# Chapitre 4

## Mise en place d'une stratégie pour l'analyse des données exomiques – application en recherche clinique

### 4.1 Intro

### 4.2 Résultats

#### 4.2.1 Description de la pipeline

#### 4.2.2 utilisations de la pipeline pour l'identification de variants pathogènes et l'identification de nouveaux gènes impliqués dans l'infertilité

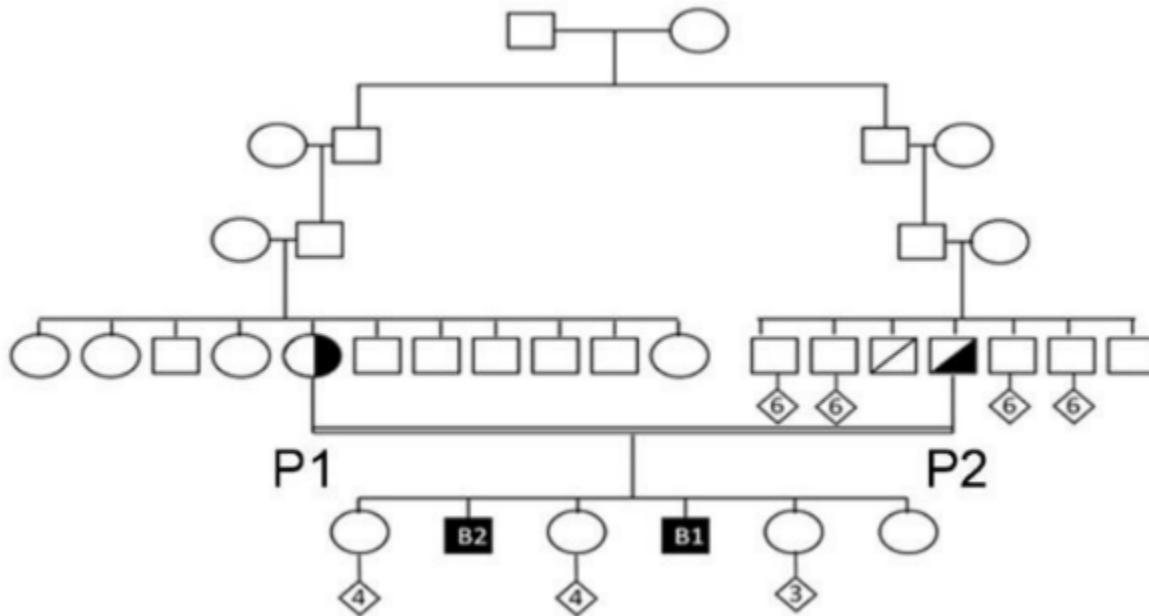
Etude familiale MMAF -> DNAH1

Etude familiale echec de fécondation -> PLCzeta

Etude familiale azoospermie : SPINK2

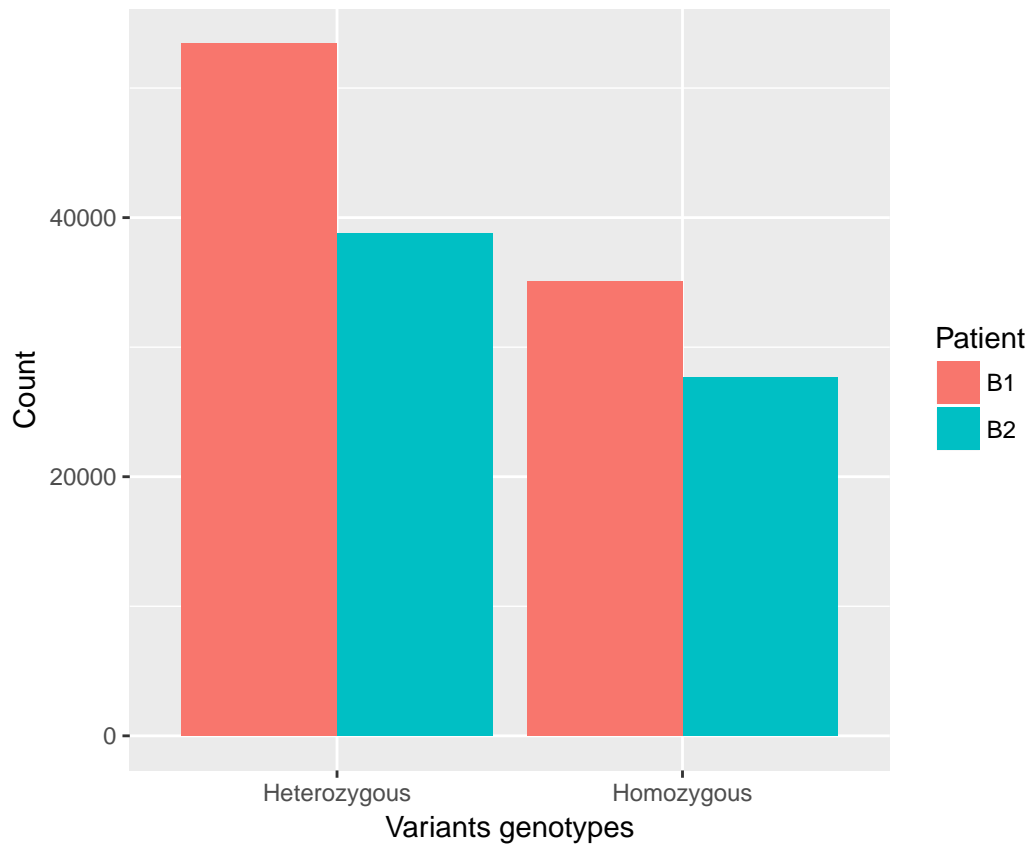
**Description de la cohorte familiale** Comme nous avons pu le voir, l'azoospermie est un phénotype d'infertilité masculine caractérisé par l'absence de spermatozoïde dans l'éjaculat. En 2017, notre équipe a publiée des résultats liant une mutation du

gène *SPINK2* à ce phénotype. Pour cette étude, nous avons effectué un séquençage exomique de deux frères azoospermes (B1 et B2) issus d'un union consanguin puisque leurs parents sont cousin au deuxième degré (**Figure : 4.1**). Étant donné l'historique consanguin de cette famille nous avons emis l'hypothèse d'un phénotype à transmission autosomique recessif.



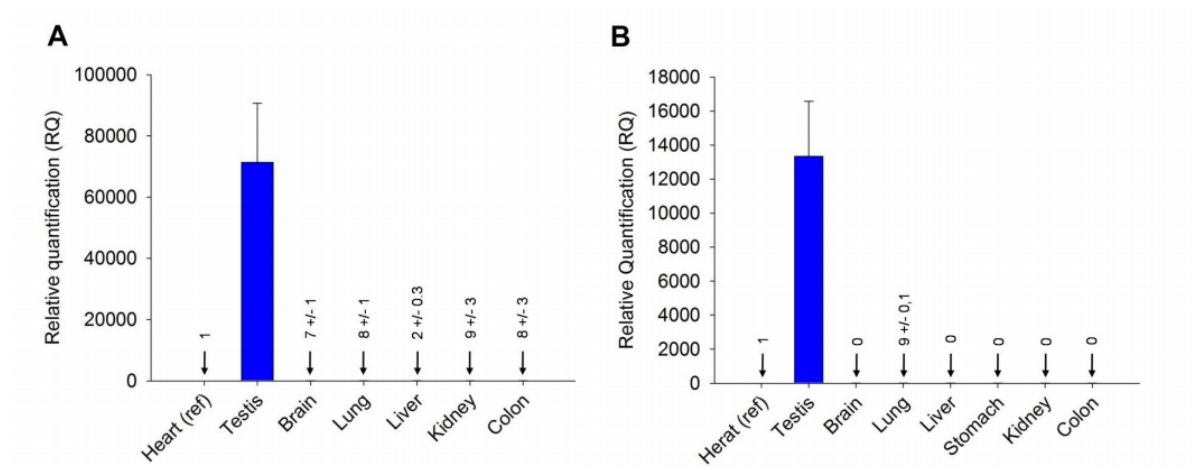
**Figure 4.1** – Arbre généalogique des deux frères azoospermes B1 et B2 : Sur cet arbre nous pouvons observer la parenté des parents (P1 et P2), cousins au deuxième degré

**Séquençage WES et analyse bioinformatique** Ainsi, comme pour les études précédentes nous avons appliqué notre pipeline d'analyse nous permettant de recenser un total de 88546 variants différents pour B1 et 66521 différents pour B2 (**Figure : 4.2**). Ayant émis l'hypothèse d'une cause génétique commune expliquant le phénotype de B1 et B2, nous nous sommes concentrés uniquement sur les variants homozygotes communs aux deux frères réduisant ainsi notre liste de variant à un total de 27604 variants (... SNVs et ... indels). À partir de cette liste, nous avons soustrait l'ensemble des variants prédit par VEP comme n'impactant pas un transcrit codant pour une protéine. De même, nous avons filtré l'ensemble des variants présents dans les séquences UTRs, causant une substitution synonyme ou une substitution faux-sens prédite "benign" par PolyPhen2 et "tolerated" par SIFT. Suite à cela, nous avons filtré les variants fréquents dans la population générale en filtrant l'ensemble des variants ayant une  $MAF \geq 0.01$ , de même, nous avons confrontés les variants restant à une base de données interne recensant les variants de 83 individus non atteints d'azoospermie afin de filtrer les variants homozygotes retrouvés dans cette base de données de contrôle.

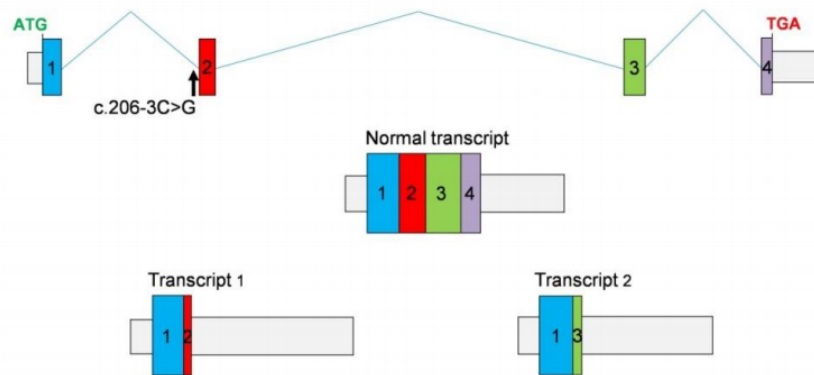


**Figure 4.2** – Comptage des variants retrouvés sur les frères B1 et B2 avec leur génotypes associés

Après avoir appliqué l'ensemble de ces filtres, nous sommes arrivés à une liste de 2 variants impactant 2 gènes différents : *SPINK2* et *GUF1*. Parmi ces deux gènes, seul *SPINK2* était décrit comme fortement exprimé dans le testicule [INS2RER FIGURE ACEVIEW]. Nous avons d'ailleurs pu confirmer cette forte expression par RT-PCR quantitative en temps réel forte à la fois chez l'Homme (**Figure : 4.3 - A**) et chez la souris (**Figure : 4.3 - B**). Ces données ont donc fait de *SPINK2* le seul candidat évident pouvant expliquer ce phénotype. Le variant partagé par les deux frères : Chr4 :57686748G>C n'a été recensé dans aucune des bases de données que sont ExAC, 1000Genomes et ESP6500. Le gène *SPINK2* est localisé sur le chromosome 4 et contient 4 exons (**Figure : 4.3**). Sa localisation intronique à 3 pb du 2<sup>ème</sup> exon indique que ce variant pourrait avoir un effet sur l'épissage de l'ARNm



**Figure 4.3** – Expression du gène *\*SPINK2\** dans plusieurs tissus : On peut constater que chez l'humain (\*\*A\*\*) comme chez la souris (\*\*B\*\*), le gène *\*SPINK2\** a non seulement une forte expression exclusive au testicule

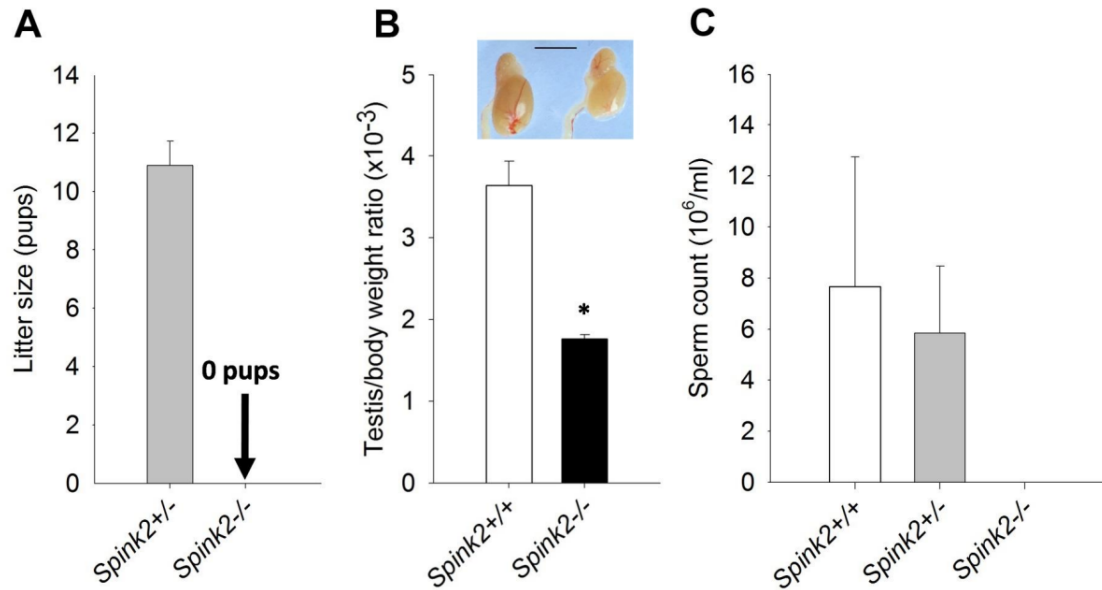


**Figure 4.4** – Représentation du gène *\*SPINK2\** : L'épissage du gène *\*SPINK2\** crée un transcrit de 4 exons (Transcrit normal). Cependant, le variant c.206-3C>G observé chez les frères B1 et B2 crée un nouveau site accepteur d'épissage ajoutant 2 nucléotides à l'exon 2 induisant un décalage du cadre de lecture menant à un codon stop 3 nucléotides plus loin (Transcrit 1) et / ou causant le saut de l'exon 2 menant à un codon stop prématuré (Transcrit 2)

**Analyse du phénotypoe murin de souris *Spink2*<sup>-/-</sup>** Afin de confirmer que l'absence de la protéine SPINK2 entraîne un phénotype d'infertilité, nous avons étudié les caractéristiques reproductive de souris KO *Spink2*<sup>-/-</sup>. L'absence d'ARNm testiculaire chez les souris KO a été confirmé par qRT-PCR montrant aucune amplification du gène *Spink2*, contrairement aux souris sauvages. Les analyses de ces souris



a permis de mettre en évidence l'infertilité des souris KO (**Figure : 4.5 - A**) due à l'absence de spermatozoïdes dans leur éjaculat (**Figure : 4.5 - B**). De même, nous avons pu observer une diminution significative de la taille des testicules chez les souris *Spink2*<sup>-/-</sup> (**Figure : 4.5 - B**).



**Figure 4.5** – Mise en évidence de l'azoospermie des souris *\*Spink2*<sup>-/-</sup> : **\*\*A\*\*** : Taille des portées de souris mâles *\*Spink2*<sup>+/+</sup> et *\*Spink2*<sup>-/-</sup> avec des souris femelles sauvages (n=5). **\*\*B\*\*** : Ratio (poids du testicule) / (poids du corps) des souris sauvages et *\*Spink2*<sup>-/-</sup>. **\*\*C\*\*** : Concentration spermatique au sein de l'épididyme chez des souris sauvages, *\*Spink2*<sup>+/+</sup> et *\*Spink2*<sup>-/-</sup> (n=10)

Estimation de l'incidence du gène *SPINK2* chez des patients azoospermes  
Afin

Etude d'une large cohorte de patients MMAF



# Chapitre 5

## MutaScript



## Conclusion



## Chapitre 6

### The First Appendix





## References