

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 :



**Université
Grenoble
Alpes**

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

Remerciements	1
Résumé	3
Abstract	5
Chapitre 1 : Introduction	7
1.1 La spermatogénèse	7
1.1.1 Rappels sur le testicule	7
1.1.2 La phase de multiplication	8
1.1.3 La méiose	10
1.1.4 La spermiogénèse	12
1.2 Structure et fonction du spermatozoïde	14
1.2.1 Anatomie du spermatozoïde	14
1.2.2 Fonction du spermatozoïde	19
1.3 L'infertilité masculine	19
1.3.1 Les différents phénotypes d'infertilité masculine	20
1.3.2 La génétique de l'infertilité	21
1.4 Les techniques d'analyses génétiques	22
1.4.1 Les puces	22
1.4.2 Le séquençage	22
1.5 L'analyse bioinformatique des données de NGS	22
1.5.1 L'analyse des données brut	23
1.5.2 L'annotation des variants	23
Chapitre 2 : Investigation génétique et physiologique de la globo- zoospermie	27
Conclusion	29
Annexe A : The First Appendix	31
Annexe B : The Second Appendix, for Fun	33
References	35

Liste des tableaux

1.1 Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines 7

Table des figures

1.1	Schéma anatomique du testicule humain :	8
1.2	Les différentes phases de la spermatogénèse (À CHANGER!!!!) . .	10
1.3	Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine	11
1.4	Les différentes phases de la division cellulaire	12
1.5	Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique	12
1.6	Principales étapes et modifications structurales lors de la spermiogénèse	14
1.7	Anatomie du spermatozoïde	15
1.8	Schéma de la compaction de l'ADN dans les cellules somatiques et dans les spermatozoïde	17
1.9	Structure simplifiée de l'axonème d'après Inaba (2003)	18
1.10	Structure du flagelle d'un spermatozoïde d'après Borg et al. (2010) . .	19
1.11	Diagramme de Venn des prédictions de pathogénicités de six logiciels d'après Salgado et al. (2016)	25

Remerciements

Je remercie . . .

- Les rapporteurs
- Les membres du jury
- Pierre
- Nicolas
- L'équipe BCM
- Kevin Keurcien Thomas Florient
- L'équipe GETI
- La BGM
- Mes amis
- Ma famille
- Dadette et Marco
- Simon
- Aurélien
- Mes parents
- Ma soeur
- Estelle
- Noham

Cette thèse est dédiée à Fabien le québécois

Résumé

Résumé de ma thèse
Second paragraph of abstract starts here.

Abstract

Même chose en anglais

Chapitre 1

Introduction

1.1 La spermatogénèse

La spermatogénèse des mammifères est un processus long et complexe contrôlé par plusieurs mécanismes étroitement liés ((Gnessi, Fabbri, & Spera, 1997, KIERSZENBAUM (1994)),**Sharpe1994 à trouver!!!**). C'est au cours de celle-ci qu'à partir de cellules germinales, seront produits les spermatozoïdes matures. Ce processus est divisé en trois phases principales : La phase de multiplication, la phase de division (appelée la méiose) et la phase de maturation. Chez les hommes, ces étapes se déroulent en continue dans la paroi des tubes séminifères du testicule depuis la puberté jusqu'à la mort et implique trois types de cellules germinales : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. Le temps nécessaire pour obtenir un spermatozoïde mature à partir de cellules germinales est de 74 jours et la production quotidienne de spermatozoïde est d'environ 45 million par testicules (JOHNSON, PETTY, & NEAVES, 1980). Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de différenciation d'une génération de cellules germinales (depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde). Chacune des étapes 35du cycle spermatogénétique a une durée fixe et constante selon les espèces

1.1.1 Rappels sur le testicule

Les testicules sont les organes sexuels masculins. Ils possèdent deux fonctions principales (plus ou moins exprimés selon les périodes de la vie de l'individu) :

Table 1.1 – Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines

Cellules germinales	Durée de vie moyenne (jours)
Spermatogonies Ap	16-18
Spermatogonie B	7.5-9
Spermatocytes primaires	23
Spermatocytes secondaires	1
Spermatides	1

une fonction endocrine caractérisée par la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles masculines (la stéroïdogénèse) et une fonction exocrine au cours de laquelle seront produits les gamètes masculins. Chez un individu adulte en bonne santé, le testicule présente une forme ovoïde ayant un volume moyen de 18 cm³. Chez l'homme, comme chez la plupart des mammifères terrestres, ils sont localisés sous le pénis dans une poche de peau appelée scrotum et reliés à l'abdomen par le cordon spermatique (**Figure : 1.1**). Cette externalisation des testicules permet leur maintien à une température plus basse que celle du reste du corps nécessaire à la spermatogénèse.

L'intérieur du testicule contient des tubes séminifères enroulés ainsi que du tissu entre les tubules appelé espace interstitiel. Les tubes séminifères sont de longs tubes compactés sous forme de boucles et dont les deux extrémités débouchent sur le *rete testis* (**Figure : 1.1**). C'est le long des parois du tube séminifère que se déroulera l'ensemble des étapes de la spermatogénèse.

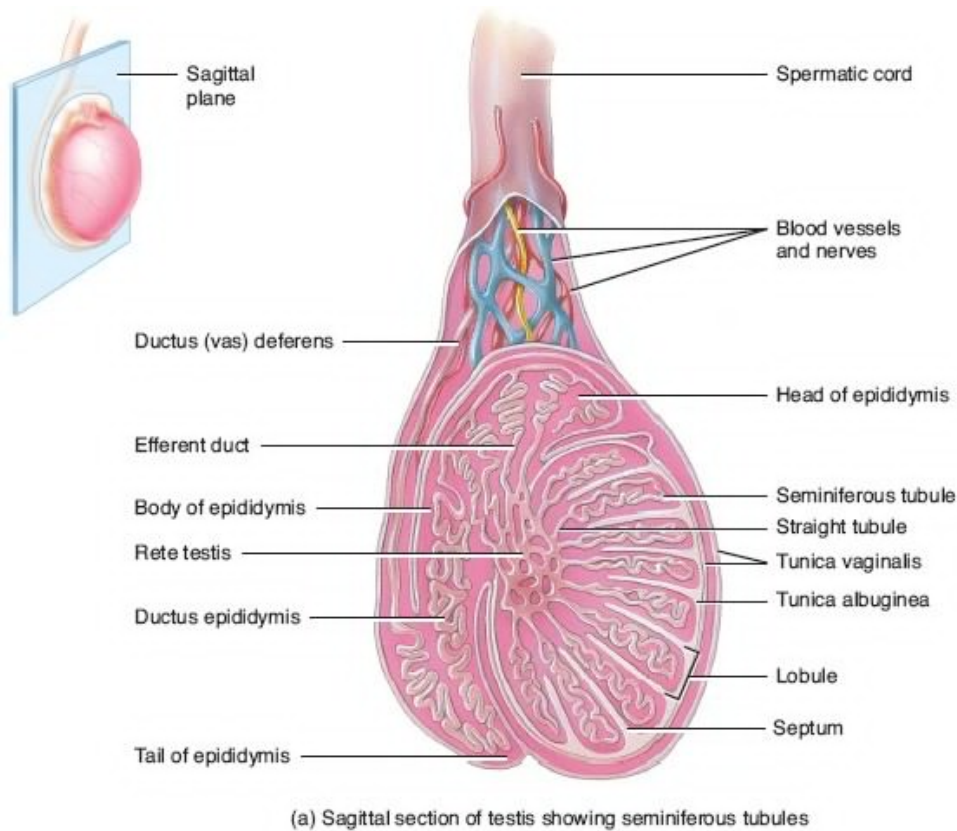


Figure 1.1 – Schéma anatomique du testicule humain :

1.1.2 La phase de multiplication

La phase de multiplication est la phase au cours de laquelle les spermatogonies se divisent par mitoses pour aboutir au stade de spermatocytes primaires. Les spermatogonies sont des cellules diploïdes à l'origine de l'ensemble des autres cellules germinales humaines. Pour cela, elles vont s'auto-renouveler par mitose successive afin

de maintenir une production continue de spermatozoïdes tout au long de la vie de l'individu. Ces cellules sont localisées dans le compartiment basal des tubes séminifères. Les analyses histologiques ont permis de distinguer trois types de spermatogonies en fonction de leur contenu en hétérochromatine ((Clermont, 1963, Clermont (1966), Goossens & Tournaye (2013))) :

1. Les spermatogonies de type A dark (ou Ad)
2. Les spermatogonies de type A pale (ou Ap)
3. Les spermatogonies de type B

Chez l'Homme, les spermatogonies Ad ont une activité mitotique au cours de la spermatogénèse et servent de réserve. Elles vont au cours d'une première mitose former une spermatogonie Ad et une spermatogonie Ap (**Figure : 1.2**). Cette propriété permet à la fois de se différencier en spermatocytes tout en constituant un compartiment de réserve de spermatogonies Ad pour la régénération de la population de cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère. L'entrée en division des spermatogonies Ap se fait par groupes cellulaires tous les 16 jours. Les cellules d'une même génération maintiennent entre elles des ponts cytoplasmiques jusqu'à la spermiogénèse ce qui permet la synchronisation parfaite du développement gamétique de toutes les cellules filles issues d'un groupe de spermatogonies Ap. Ce phénomène est appelé onde spermatogénétique. Chaque spermatogonie Ap va, lorsqu'elle se divise par mitose, former deux spermatogonies B qui elles-mêmes se diviseront en deux spermatocytes primaires diploïdes (**Figure : 1.2**).

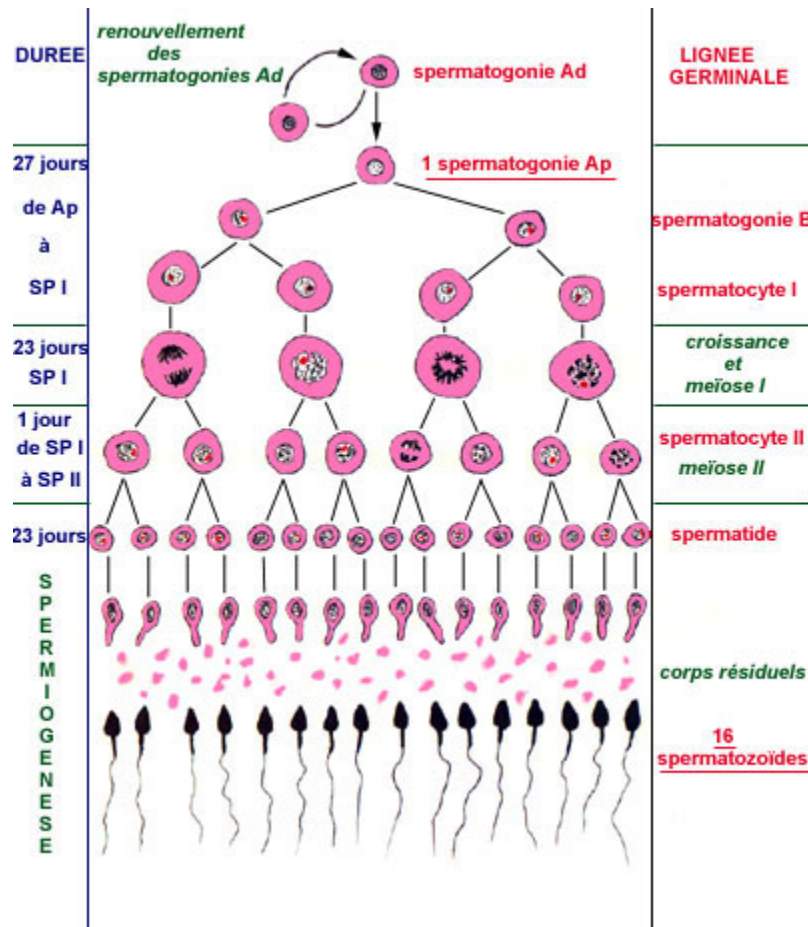


Figure 1.2 – Les différentes phases de la spermatogénèse (À CHANGER!!!!!!)

1.1.3 La méiose

La méiose, ou phase de maturation, est l'étape au cours de laquelle, à partir de cellules diploïdes (les spermatogonies B) vont se former des cellules haploïdes, les spermatocytes secondaire (spermatocytes II). Ce résultat est le fruit de deux divisions successives (**Figure** : @ref(fig :méiose)) appelée respectivement méiose réductionnelle ou méiose I (MI) et méiose équationnelle ou méiose II (MII). La MI va séparer les chromosomes homologues, produisant deux cellules et réduisant la ploïdie de diploïde à haploïde (d'où son nom *réductionnelle*). En plus de son rôle de division vu précédemment, la méiose joue un rôle clef dans le brassage génétique (mélange des gènes) et ce, grâce à deux mécanismes de brassage : le brassage inter-chromosomique, lorsque les chromosomes sont séparés et le brassage intra-chromosomique impliquant notamment des enjambements chromosomiques (crossing-over) (**Figure** : 1.5).

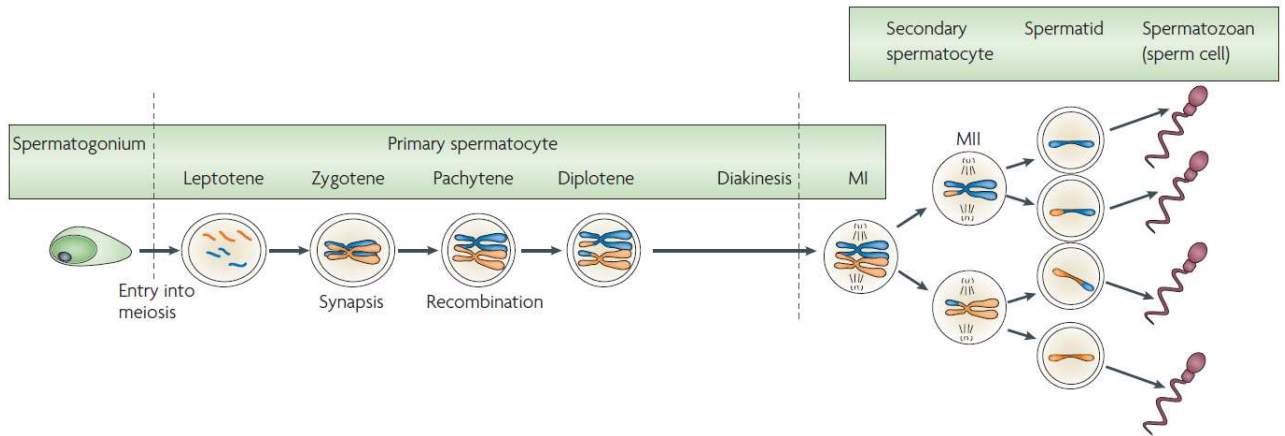


Figure 1.3 – Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine :
D'après Sasaki et Matsui, 2008

La méiose est initiée dès la fin de la phase de multiplication à partir des spermatocytes primaires issus de la division des spermatogonies de type B. Ces cellules nouvellement formées se situent dans le compartiment basal du tube séminifère. C'est là qu'ils vont tout d'abord subir une interphase (stade préleptotène) durant entre 2 à 4 jours. Au cours de cette phase a lieu la réplication de l'ADN. Cette réplication se fait lorsque l'ADN est à l'état de chromatine, pendant la phase S (pour synthèse) de l'interphase. À l'issue de cette phase, chaque chromosome sera composé de deux chromatides reliés entre eux par le centromère, le matériel génétique de chaque cellule ayant donc été multiplié par 2. Par la suite, ces cellules vont subir deux divisions méiotiques, chacune composée de 4 étapes distinctes (**Figure : (1.4)**) :

1. La prophase, caractérisée par la condensation de la chromatine formant ainsi les chromosomes.
2. La métaphase, phase au cours de laquelle les chromosomes vont s'aligner à l'équateur de la cellule pour former la plaque équatoriale.
3. L'anaphase, les chromatides sœurs (ou les chromosomes homologues en fonction de la phase méiotique) vont se séparer et migrer aux pôles opposés de la cellule.
4. La télophase, qui est l'étape finale, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme autour des chromosomes. La cellule mère se sépare alors en deux cellules filles.

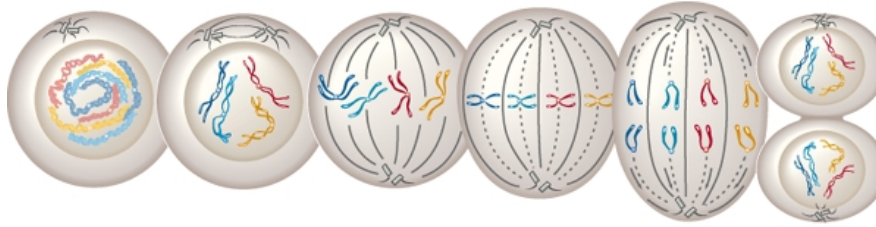


Figure 1.4 – Les différentes phases de la division cellulaire : De la prophase (à gauche) à la télophase (à droite)

La première division méiotique aboutit à la formation des spermatocytes secondaires (spermatocytes II). À ce stade, les cellules sont haploïdes et chaque chromosome est composé de deux chromatides sœurs. Après, cette brève étape (environ 1 jour) ainsi qu'une très courte interphase sans réplication de l'ADN, les spermatocytes II vont entrer en deuxième division méiotique. Cette deuxième division est très semblable à une division mitotique. La prophase II, à la différence de la prophase I, est très courte. Lors de cette étape, les chromosomes constitués de chromatides sœurs se dirigent vers la plaque équatoriale. En métaphase II, les chromosomes s'alignent au niveau de leurs centromères. En anaphase II, les chromatides sœurs se séparent l'une de l'autre et migrent vers les pôles opposés des spermatocytes II. Lors de la télophase II, on observe la formation de cellules filles haploïdes appelées spermatides, contenant chacune n chromosomes.

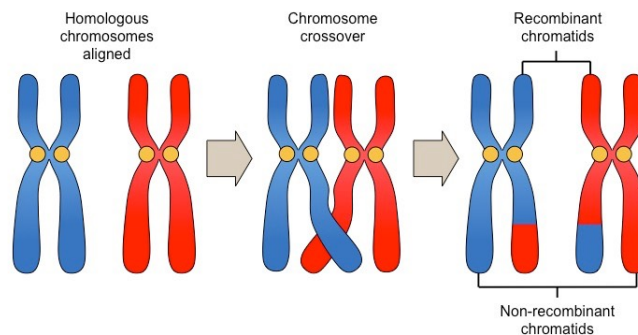


Figure 1.5 – Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique

1.1.4 La spermiogénèse

La spermiogénèse est la phase finale de la spermatogénèse. Elle dure environ 23 jours chez l'humain et peut être subdivisée en sept étapes (**Figure : (1.6)**). La spermiogénèse définit la cytodifférentiation des spermatides en spermatozoïdes. C'est au cours de cette phase que les caractéristiques morphologique et fonctionnelles du spermatozoïde seront déterminées (Clermont & Oko 1993 à trouver!!!). Elle est caractérisée par 3 événements majeurs : la formation de l'acrosome, la compaction

de l'ADN nucléaire et la formation du flagelle. Le développement de l'acrosome et la formation du flagelle commence au niveau des spermatides rondes (Escalier et al., 1991). pendant l'élongation de la spermatide, le noyau se condense et devient hautement polarisé (Hamilton, D. W., Waites, 1990).

Les spermatides sont situées dans le compartiment adluminal, à proximité de la lumière du tube séminifère. Ce sont de petites cellules (8 à 10 μm) que l'on peut schématiquement diviser en trois classes :

1. les spermatides rondes (**Figure : (1.6) 1-2**) : L'identification de ces cellules représente une difficulté technique. Elles ont cependant pu être décrites en détail par différentes techniques de coloration sous microscope optique ((Clermont, 1963), (Papic, Katona, & Skrabalo, 1988), (Schenck & Schill, n.d.), (Adelman & Cahill, 1989), (World Health Organization, 1992)). Plusieurs études animales ont pu démontrer le potentiel des spermatides rondes à donner la vie à des individus sains et fertiles, ((a Ogura, Matsuda, & Yanagimachi, 1994), (A. Ogura, Matsuda, Asano, Suzuki, & Yanagimachi, 1996), (Sasagawa & Yanagimachi, 1997)), la même chose ayant été également observée plus récemment chez l'homme ((A. Tanaka et al., 2015)) bien que le taux de fécondation et d'implantation soit extrêmement faible ((Asimakopoulos, 2003)). Ils possèdent un noyau rond avec une chromatine pâle et homogène. C'est à partir de ces étapes que démarre la biogenèse de l'acrosome avec la production par l'appareil de Golgi des vésicules pro-acrosomales (phase de Golgi). Les deux centrioles contenus dans le cytoplasme vont se déplacer au futur pôle caudal. Le centriole proximal est inactif alors que le centriole distal donne naissance à un ensemble de microtubules à l'origine de l'axonème du futur flagelle.
2. Les spermatides en élongation (**Figure : (1.6) 3-4**) :
peuvent aussi donner naissance avec un meilleur taux que les spermatides rondes et engendrerai théoriquement moins de risques d'anomalies génétiques ((Asimakopoulos, 2003)). **A compléter**
3. Les spermatides en condensation (**Figure : (1.6) 5-7**) : C'est le stade final de la différenciation du spermatide en spermatozoïde. À ce stade le noyau est très allongé, avec une partie caudale globulaire et une partie antérieure saillante. La chromatine est sombre et condensée. L'axonème va continuer à s'allonger pour former le flagelle mature. Les différentes organelles inutiles pour la physiologie spermatique et l'excès de cytoplasme vont former la gouttelette cytoplasmique qui va se détacher et donner le corps résiduel qui va ensuite être phagocyté par les cellules de Sertoli ((Hermo, Pelletier, Cyr, & Smith, 2010)).

Une fois ces étapes de différenciation finies, les spermatides sont relâchées en tant que spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. Ce procédé est appelé spermiation.

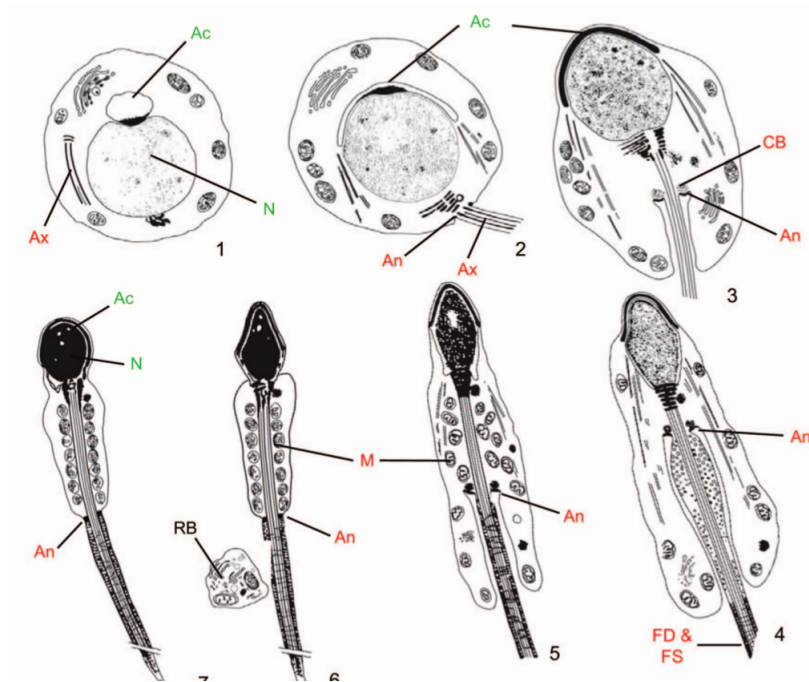


Figure 1.6 – Principales étapes et modifications structurales lors de la spermiogénèse : 1. La spermatide immature avec un gros noyau arrondi. La vésicule acrosomale est attachée au noyau, l'ébauche du flagelle n'atteint pas le noyau. 2. La vésicule acrosomale a augmenté de taille et apparaît aplatie au niveau du noyau. Le flagelle entre en contact avec le noyau. 3-7. Formation de l'acrosome, condensation du noyau et développement des structures flagellaires. Ac, acrosome ; Ax, axonème ; CC, corps chromatoides ; CR, corps résiduel ; FD, fibres denses ; GF, gaine fibreuse ; M, mitochondrie ; Ma, manchette. D'après Touré et al., 2011

1.2 Structure et fonction du spermatozoïde

1.2.1 Anatomie du spermatozoïde

Une fois Il est composé de deux parties principales : La tête et le flagelle (**Figure : (1.7)**).

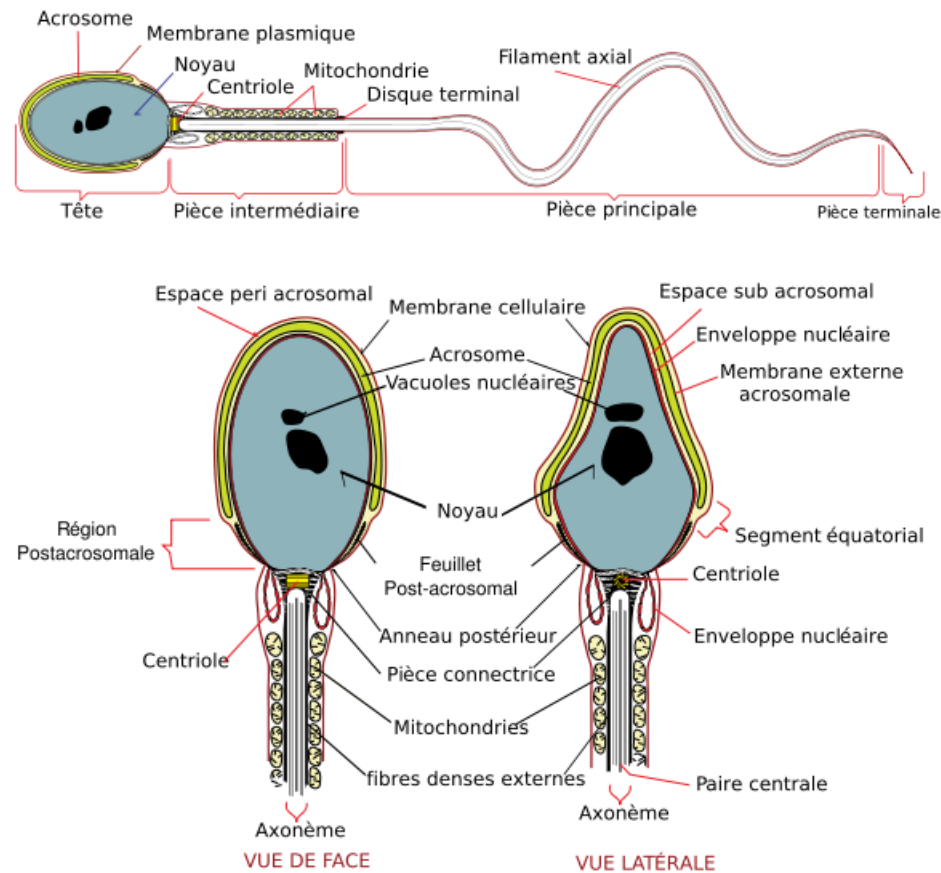


Figure 1.7 – Anatomie du spermatozoïde

La tête

1. L'acrosome : C'est une vésicule de sécrétion géante située dans la moitié supérieure de la tête du spermatozoïde. Elle se développe à partir de l'appareil de Golgi lors de la spermiogénèse. Au cours de sa formation, l'acrosome forme tout d'abord un granule sphérique qui se colle sur la partie apicale du noyau. En s'aplatissant contre celui-ci, l'acrosome va prendre une forme hémisphérique recouvrant la membrane nucléaire formant la coiffe céphalique... Le rôle de l'acrosome est fondamental dans le processus de fécondation puisqu'il permet d'excréter notamment l'acrosine, une enzyme de digestion permettant au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide qui entoure les ovocytes. Ce processus de relargage est appelé réaction acrosomal.
2. L'acroplaxome : **TODO!!!**
3. Le noyau : Le noyau est une structure cellulaire présente dans la majorité des cellules eucaryotes. Il contient l'essentiel du matériel génétique. Le noyau du

spermatozoïde est caractérisé par une compaction extrêmement importante de l'ADN. Dans les cellules somatiques l'ADN est enroulé par unité de 146 paires de bases autour d'un octamère d'histones dit de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) afin d'organiser les 3 milliards de paires de bases du génome humain dans un noyau de quelques microns (**Figure : (1.8)**). L'ADN des spermatides va subir une réorganisation chromatinienne plus importante au cours de la spermatogénèse afin d'augmenter sa compaction. Ainsi, les octamères d'histones présents dans les cellules somatiques sont remplacés par deux protéines riches en arginine et en cystéine PRM1 et PRMM2). Ces protéines sont appelées des protamines (**Figure : (1.8)**). L'intégrité des deux protéines composant ce dimère est nécessaire pour la procréation (Cho et al., 2001). Cette compaction extrême permet de réduire la taille du noyau, mais aussi de protéger l'ADN d'agents de dégradation comme l'oxydation des bases. Parallèlement à cette condensation chromatinienne se produit un arrêt des processus de transcription cellulaire ((Kierszenbaum & Tres, 1978)). Le noyau du spermatozoïde est donc un noyau au repos, transcriptionnellement inactif ((Ward, 1994))

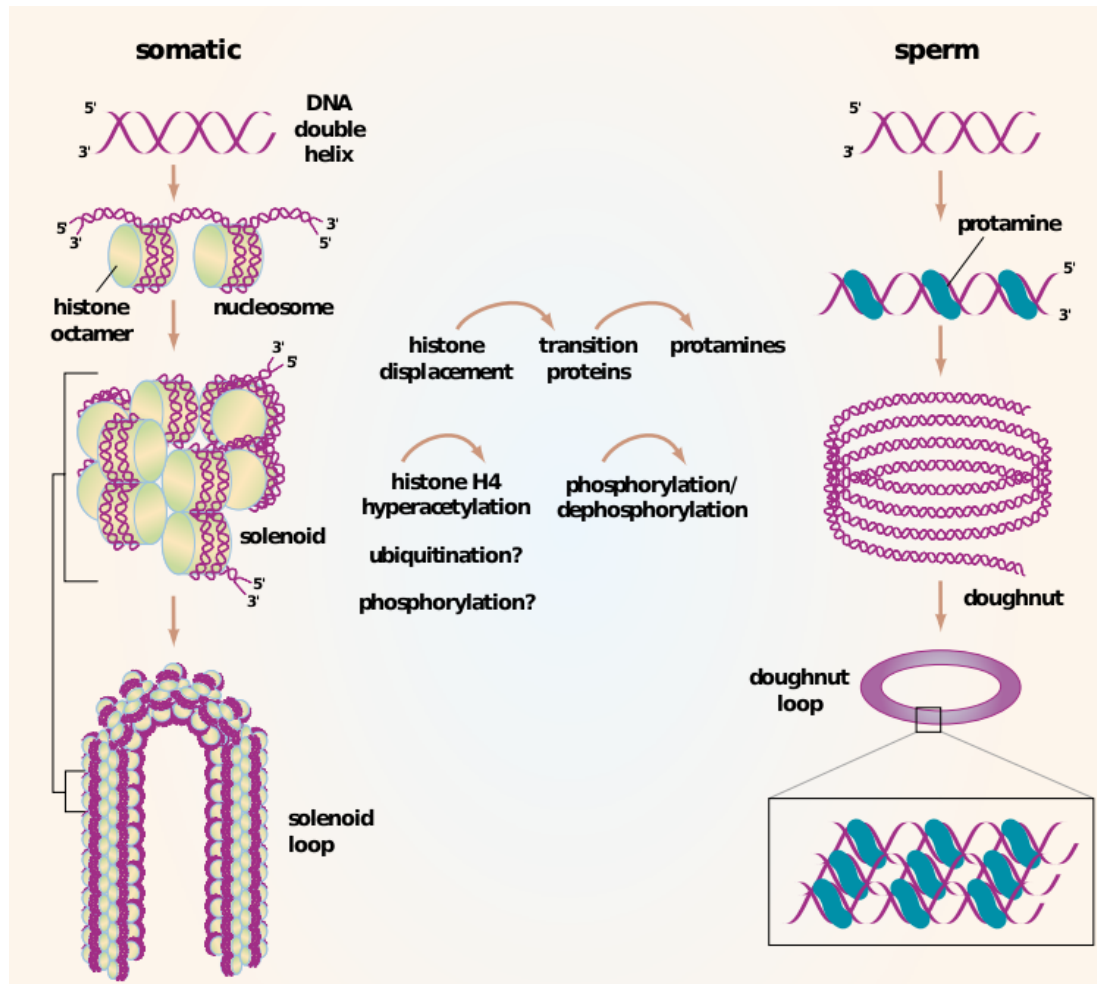


Figure 1.8 – Schéma de la compaction de l'ADN dans les cellules somatiques et dans les spermatozoïde : D'après Braun (2001)

Le flagelle

Le flagelle représente la queue du spermatozoïde. Celui-ci permet, par mouvement d'oscillation à haute vitesse, le déplacement du spermatozoïde. Cette mobilité est générée par un cytosquelette interne extrêmement conservé durant l'évolution appelée l'axonème. Celui-ci est composé de neuf doublets de microtubules périphériques et de deux doublets internes (Inaba, 2003) (**Figure : (1.9)**), on parle alors de structure "9 + 2". Les doublets externes sont reliés entre eux par des ponts de nexine et au doublet central par des ponts radiaires.

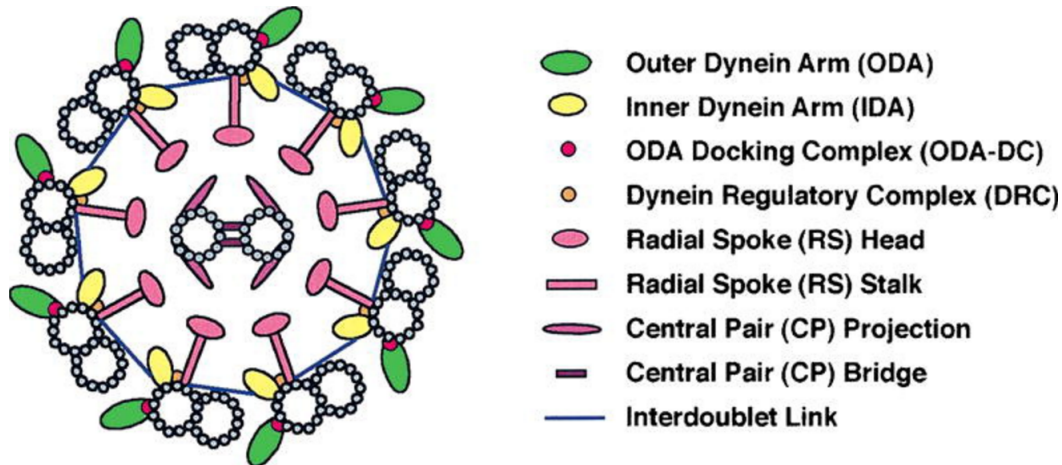


Figure 1.9 – L'axonème est constitué de neuf doublets de microtubules périphériques reliés entre eux par des liens de nexine d'un doublet central relié aux doublets périphériques par des ponts radiaires

Le flagelle du spermatozoïde peut être divisé en trois parties distinctes (**Figure : (1.10)**) :

1. La pièce intermédiaire : Elle fait jonction avec la tête du spermatozoïde et est composée de la gaine de mitochondrie qui fournira une partie de l'énergie nécessaire au battement flagellaire (grâce à la phosphorylation oxydative qui produit de l'ATP), l'axonème qui se prolonge dans la pièce principale et un ensemble de neuf faisceaux de fibres denses.
2. La pièce principale : Ici, la gaine de mitochondrie a disparue ainsi que deux des faisceaux de fibres denses présents dans la pièce intermédiaire. On note cependant la présence d'une structure supplémentaire, la gaine fibreuse. Cette gaine entoure l'axonème et comporte deux épaississements diamétralement opposés, appelés colonnes longitudinales sur lesquelles s'insèrent les fibres denses 3 et 8. C'est le long de la gaine fibreuse qu'est produite la majorité de l'énergie nécessaire au glissement des microtubules ((Eddy, 2007)).
3. La pièce terminale : Elle est située au niveau de l'extrémité distale du flagelle et ne contient que l'axonème (Inaba, 2003).

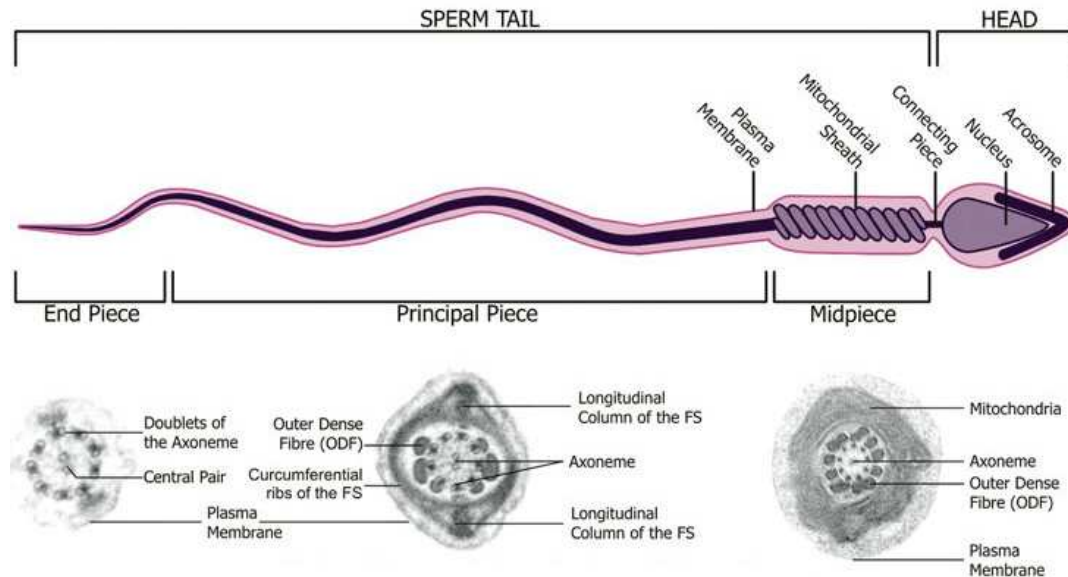


Figure 1.10 – Structure du flagelle d'un spermatozoïde d'après Borg et al. (2010) : Coupes transversales en microscopie électronique. Le flagelle se compose de trois parties : la pièce intermédiaire, contenant les mitochondries, la pièce principale et la pièce terminale. L'axonème, en position centrale, parcourt tout le flagelle. Des structures périaxonémales sont observables : les fibres denses dans la pièce intermédiaire et principale, et la gaine fibreuse dans la pièce principale seulement.

1.2.2 Fonction du spermatozoïde

En plus d'être unique dans sa morphologie, le spermatozoïde l'est aussi dans sa fonction puisque c'est la seule cellule produite de manière endogène et dont l'action est exercée de manière exogène.

1.3 L'infertilité masculine

L'organisation mondiale de la santé définit l'infertilité comme étant : *“une pathologie du système reproductif définie par l'échec d'une grossesse clinique après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers non protégés”* (Who.int. 2013-03-19. Retrieved 2013-06-17). Environ 10-15% des couples humains sont considérés infertiles. On estime que dans la moitié des cas, la cause sous-jacente est masculine. Les facteurs causaux sous-jacents de l'infertilité masculine peuvent être attribués à des toxines environnementales, des troubles systémiques tels que la maladie hypothalamo-hypophysaire, les cancers testiculaires et l'aplasie des cellules germinales. Les facteurs génétiques, y compris les aneuploïdies et les mutations de gènes uniques, contribuent également à l'infertilité masculine. Cependant, aucune cause n'est identifiée dans 10-20% des cas.

The entire process (of spermatogenesis) is tightly synchronized and integrated, so that pathological conditions which produce even very small deviations are likely to

lead to infertility (Barratt, 1995)

Barratt, C.L.R. (1995) Spermatogenesis. In Grudzinsky, J.G. and Yovich, J.L. (eds) Gametes : the spermatozoon. Cambridge University Press, Cambridge

1.3.1 Les différents phénotypes d'infertilité masculine

Liée à la quantité

Immature germ cells are present in ejaculates of subjects with a normal sperm count (Michael and Joel, 1937 ; Tomlinson et al., 1992), oligozoospermia (MacLeod, 1970 ; Tomlinson et al., 1993), or azoospermia (Kurilo et al., 1993) and the presence of immature germ cells increases as the sperm count decreases (Sperling and Kaden, 1971) Michael, M. and Joel, K. (1937) Zellformen in normalen und pathologischen Ejakulaten und ihre klinische Bedeutung. Schweiz. Med. Wsch., 33, 757.

Tomlinson, M.J., Barratt, C.L.R., Bolton, A.E. et al. (1992) Round cells and sperm fertilizing capacity : the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization. Fertil. Steril., 58, 1257–1259. MacLeod, J. (1970) The significance of deviations in human sperm morphology. In : Rosenberg, E. and Paulsen, C.A. (eds) The human testis. Plenum, New York, pp. 481–494.

Tomlinson, M.J., Barratt, C.L.R. and Cook, I.D. (1993) Prospective study of leukocytes and leukocyte populations in semen suggests they are not a cause of male infertility. Fertil. Steril., 60, 1069–1075

Kurilo, L.F., Liubashevskaja, I.A., Dubinskaia, V.P. and Gaeva, T.N. (1993) Karyological analysis of the count of immature germ cells in the ejaculate. Urol. Nefrol. (Mosk.), 2, 45–47.

Sperling, K. and Kaden, R. (1971) Meiotic studies of the ejaculated seminal fluids of humans with normal sperm count and oligospermia. Nature, 232, 481

In humans, spermatogenic arrest was considered a hopeless condition for couples desiring to conceive. However, the documented success of intracytoplasmic sperm injection (ICSI ; Palermo et al., 1992) has pointed to using this technique to inject spermatids into oocytes (Edwards et al. 1994 ; Ogura et al., 1994) Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 340, 17–18.

Edwards, R.G., Tarin, J.J., Dean, N. et al. (1994) Are spermatids injections into human oocytes now mandatory ? Hum. Reprod., 9, 2217–2219.

Ogura, A., Matsuda, J. and Yanagimachi, R. (1994) Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7460–7462

Spermatogenic arrest, the inability of spermatogenetic cells to develop into male gametes within the gonads, has been reported in 4–30% of testicular biopsies of patients with severe oligospermia or azoospermia (Wong et al., 1973 ; Levin, 1979 ; Colgan et al., 1980 ; Soderstrom and Suominen, 1980 ; Nomen et al., 1984) Wong,

T.W., Strauss, F.H. and Worne, N.E. (1973) Testicular biopsy in male infertility : I. Testicular causes of infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 95, 151–159.

Levin, H.S. (1979) Testicular biopsy in the study of male infertility. *Hum. Pathol.*, 10, 569–579

Colgan, T.J., Bedar, Y.C., Strawbridge, H.T.G. et al. (1980) Reappraisal of the value of the testicular biopsy in the investigation of infertility. *Fertil. Steril.*, 33, 56–60.

Soderstrom, K.O. and Suominen, J. (1980) Histopathology and ultrastructure of meiotic arrest in human spermatogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 104, 476–482.

Soderstrom, K.O. and Suominen, J. (1980) Histopathology and ultrastructure of meiotic arrest in human spermatogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 104, 476–482.

Spermatogenic arrest can occur at any stage of germ cell formation ; primary spermatocyte arrest is most prominent, followed by spermatid arrest, and least commonly, spermatogonial arrest. Arrest at primary spermatocyte stage can be incomplete, so that a few secondary spermatocytes or spermatids are observed (Girgis et al., 1969) Girgis, S.M., Etriby, A., Ibrahim, A.A. and Kahil, A. (1969) Testicular biopsy in azoospermia. A review of the last ten years' experience of over 800 cases. *Fertil. Steril.*, 20, 467–477.

liée à la forme

teratozoospermia

La globozoospermie La globozoospermie est une anomalies des spermatozoïdes caractérisé par une tête ronde dépourvue d'acrosome et d'une pièce intermédiaire désorganisée ((Singh, n.d.), (Pedersen & Rebbe, 1974))

liée à la mobilité

Sperm motility is necessary for the transport of male DNA to eggs in species with both external and internal fertilization.

1.3.2 La génétique de l'infertilité

Les causes fréquentes

Les microdélétions du chromosome Y

Anomalies chromosomiques

Mutations CFTR

Les nouveaux gènes

1.4 Les techniques d'analyses génétiques

1.4.1 Les puces

1.4.2 Le séquençage

Le Sanger

Le NGS

Le séquençage nouvelle génération (NGS) a apporté avec lui des opportunités sans précédent dans le domaine de la recherche en génomique. Il a pu être appliqué à une grande variété de contexte avec notamment le séquençage de génome entier, ou *Whole Genome Sequencing* (WGS) ou encore le séquençage exonique, le *Whole Exome Sequencing* (WES).

1. 454 sequencing technology : pyrosequencing
 2. Illumina
 3. ABI/SOLiD
-

1.5 L'analyse bioinformatique des données de NGS

Les progrès techniques des dernières décennies ont rendu possible le séquençage de plusieurs millions des *reads* d'ADN en un temps relativement court et à coûts raisonnable. Ainsi, l'émergence du WGS et du WES a permis de réunir une quantité jusqu'à présent inégalé d'information sur les variations génétiques, et d'une manière plus générale, sur les gènes et leurs fonctions ((Mardis, 2008), (Bentley, 2006)). Cependant, de par leur nature et leur quantité, l'acquisition de ces nouvelles données a engendré de nouvelles problématiques notamment

The number of research projects dealing with whole-genome sequencing data has been emerging in humans [3, 4, 5, 6], 3 Goldstein DB, Allen A, Keebler J, Margulies EH, Petrou S, Petrovski S, et al. Sequencing studies in human genetics : design and interpretation

4 Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage : key considerations in genomic analyses. Nat Rev Genet

5 Lam HYK, Clark MJ, Chen R, Chen R, Natsoulis G, O'Huallachain M, et al.

Performance comparison of whole-genome sequencing platforms. Nat Biotechnol 6 Morozova O, Marra M. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics

Les récentes avancées technologies dans le domaine du séquençage haut débit ont permis une augmentation considérable de la quantité de données de séquençage brutes. Cependant cette masse de données a ouvert la porte à de nouveaux défis informatiques et bio-informatique notamment dans le prétraitement des données

In fact, in less than 10 years, these NGS technologies have moved from gene panel sequencing (100 Mb for the Roche GS FLX system) to whole genome sequencing (1,500 Gb for the Illumina HiSeq4000) and from research context only to clinical practice. The limitation is no longer the sequencing of one, many, or all genes, but rather the sequence analysis and interpretation.

1.5.1 L'analyse des données brut

L'alignement

L'appel des variants

De nombreux logiciels d'appel des variants basés sur des algorithmes différents ont émergés. Parmi les plus connus on note SAMtools (Li et al., 2009), GATK (McKenna et al., 2010)... De même que pour l'aligneur, le choix du logiciel d'appel est crucial car il existe de nombreuses différences dans les variants appelés par différents logiciels se basant sur les mêmes données brutes (Baes et al., 2014, O'Rawe et al. (2013))

Several variant callers based on different algorithms have emerged using single or multiple samples simultaneously, e.g. SAMtools [15] or GATK [16]. Recently, some studies have shown that there is significant difference in the set of variants called by different variant callers [7, 17, 18].

17 Rosenfeld J, Mason CE, Smith TM. Limitations of the human reference genome for personalized genomics

1.5.2 L'annotation des variants

The main objective of this process is to gather substantial information at the variant and the gene levels. This will include the variants' data quality, their localization at the genomic, gene and transcripts levels, their genotype, their frequency in the general population, their impact at the mRNA and protein levels, the conservation among species of the affected protein residues, the variant pathogenicity prediction, and reported associations with diseases. At the gene level, they include the gene function, its spatiotemporal expression pattern, its involvement in various pathways, and its involvement in various phenotypes/diseases.

L'annotation des variants a pour but de replacer l'ensemble des variants identifiés lors de l'étape d'appel dans leur contexte biologique. Cette phase est une des clefs de

l'analyse puisqu'elle permet de prioriser des variants d'intérêt...

L'objectif principal de cette étape est de réunir l'ensemble des informations disponibles sur un variant...

Ces informations regroupent la fréquence, sa localisation et son impact...

Cependant, cette quantité de données produites crée de nouvelles problématiques pour les généticiens qui se retrouvent désormais face au "déluge de données génétiques" (Schatz & Langmead, 2013) ce qui se traduit être un frein dans la compréhension et l'interprétation des réseaux de gènes et leurs implications dans des pathologies.

This step is a requirement for the identification of variants of interest based upon a combined filtration of the collected data from one or multiple samples.

the annotation step must be considered carefully, and that a conscious choice should be made to select transcript set and software for annotation [McCarthy et al., 2014].

par la fréquence : (ExAC)

Large consortia (e.g. the human genome project [12, 13]) have been established to accumulate available resources, detect new variants in genomes, better understand genetic architecture of different traits and find or narrow down positions of potential causal loci

12 International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome

13 International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome

Par l'impact :

VEP SNPEFF...

SIFT, polyPhen CADD

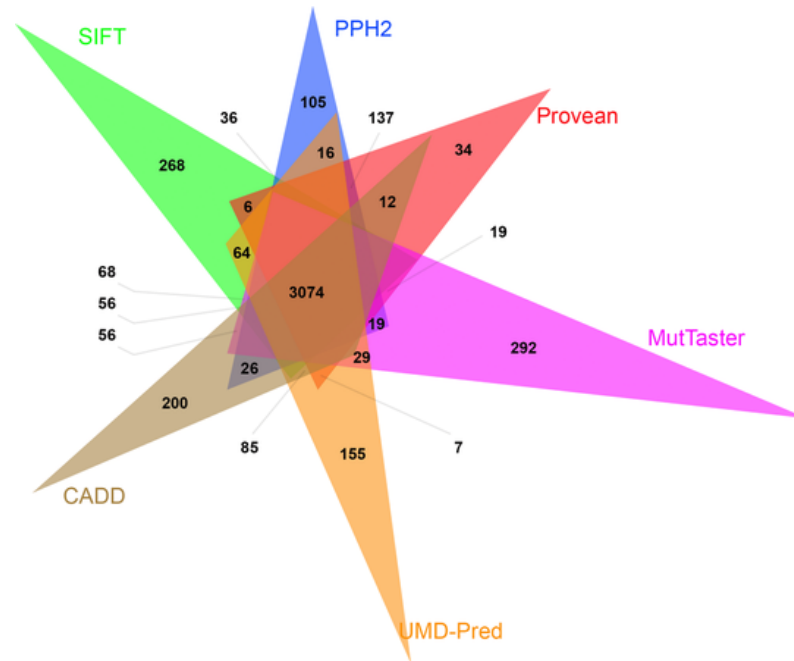


Figure 1.11 – Diagramme de Venn des prédictions de pathogénicités de six logiciels d'après Salgado et al. (2016) : aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Au niveau du gène

L'annotation au niveau du gène (ou du transcrit) consiste à récupérer l'ensemble des informations disponibles sur le gène (impacté par le variant) et non plus sur le variant directement. L'ensemble de ces informations est donc extrêmement dépendante du jeu de gènes utilisé et peuvent donc varier en fonction de celui-ci (McCarthy et al., 2014, Zhao & Zhang (2015)) même si les gènes CCDS sont bien représentés à la fois par le NCBI, Ensembl et UCSC (Pruitt et al., 2009)

Panther
HPO, OMIM
RVIS, pLI

Chapitre 2

Investigation génétique et physiologique de la globozoospermie

- >
- >
- >
- >

Conclusion

Annexe A

The First Appendix

In the main Rmd file
In Chapter ?? :

```
# This chunk ensures that the thesisdown package is  
# installed and loaded. This thesisdown package includes  
# the template files for the thesis and also two functions  
# used for labeling and referencing  
if(!require(devtools))  
  install.packages("devtools", repos = "http://cran.rstudio.com")  
if(!require(dplyr))  
  install.packages("dplyr", repos = "http://cran.rstudio.com")  
if(!require(ggplot2))  
  install.packages("ggplot2", repos = "http://cran.rstudio.com")  
if(!require(ggplot2))  
  install.packages("bookdown", repos = "http://cran.rstudio.com")  
if(!require(thesisdown)){  
  library(devtools)  
  devtools::install_github("ismayc/thesisdown")  
}  
library(thesisdown)  
flights <- read.csv("data/flights.csv")
```


Annexe B

The Second Appendix, for Fun

References

- Adelman, M. M., & Cahill, E. M. (1989). *Atlas of sperm morphology* (p. 123). ASCP Press.
- Asimakopoulos, B. (2003). Is There a Place for Round and Elongated Spermatids Injection in, *1*(1), 1–6.
- Baes, C. F., Dolezal, M. A., Koltes, J. E., Bapst, B., Fritz-Waters, E., Jansen, S., ... Gredler, B. (2014). Evaluation of variant identification methods for whole genome sequencing data in dairy cattle. *BMC Genomics*, *15*(1), 948. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-948>
- Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics and Development*, *16*(6), 545–552. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.009>
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y. C., Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genetics*, *28*(1), 82–6. <http://doi.org/10.1038/88313>
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, *112*(1), 35–51. <http://doi.org/10.1002/aja.1001120103>
- Clermont, Y. (1966). Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*, *118*(2), 509–524. <http://doi.org/10.1002/aja.1001180211>
- Eddy, E. M. (2007). The scaffold role of the fibrous sheath. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *65*, 45–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644954>
- Escalier, D., Gallo, J. M., Albert, M., Meduri, G., Bermudez, D., David, G., & Schrevel, J. (1991). Human acrosome biogenesis : immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development (Cambridge, England)*, *113*(3), 779–788. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/113/3/779.full.pdf>
- Gnessi, L., Fabbri, A., & Spera, G. (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis : An integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews*, *18*(4), 541–609. [http://doi.org/10.1016/S0898-6566\(97\)00041-9](http://doi.org/10.1016/S0898-6566(97)00041-9)

1210/er.18.4.541

- Goossens, E., & Tournaye, H. (2013). Adult stem cells in the human testis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 31(1), 39–48. <http://doi.org/10.1055/s-0032-1331796>
- Hamilton, D. W., Waites, G. M. H. (1990). *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis* (p. 334). Cambridge University Press. Retrieved from <http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/medicine/obstetrics-and-gynecology-reproductive-medicine/cellular-and-molecular-events-spermiogenesis>
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., & Smith, C. E. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3 : Developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microscopy Research and Technique*, 73(4), 320–363. <http://doi.org/10.1002/jemt.20784>
- Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella : Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*, 20(9), 1043–1056. <http://doi.org/10.2108/zsj.20.1043>
- JOHNSON, L., PETTY, C. S., & NEAVES, W. B. (1980). A Comparative Study of Daily Sperm Production and Testicular Composition in Humans and Rats. *Biol Reprod*, 22(5), 1233–1243. Retrieved from <http://www.biolreprod.org/content/22/5/1233.short>
- KIERSZENBAUM, A. L. (1994). Mammalian Spermatogenesis *<i>in Vivo</i>* and *<i>in Vitro</i>* : A Partnership of Spermatogenic and Somatic Cell Lineages*. *Endocrine Reviews*, 15(1), 116–134. <http://doi.org/10.1210/edrv-15-1-116>
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (1978). RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. *Federation Proceedings*, 37(11), 2512–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/357185>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24(3), 133–141. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- McCarthy, D. J., Humburg, P., Kanapin, A., Rivas, M. a, Gaulton, K., Cazier, J.-B., & Donnelly, P. (2014). Choice of transcripts and software has a large effect on variant annotation. *Genome Medicine*, 6(3), 26. <http://doi.org/10.1186/gm543>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit : a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9),

- 1297–303. <http://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Ogura, a, Matsuda, J., & Yanagimachi, R. (1994). Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7460–7462. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7460>
- Ogura, A., Matsuda, J., Asano, T., Suzuki, O., & Yanagimachi, R. (1996). Mouse oocytes injected with cryopreserved round spermatids can develop into normal offspring. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(5), 431–434. <http://doi.org/10.1007/BF02066177>
- O’Rawe, J., Jiang, T., Sun, G., Wu, Y., Wang, W., Hu, J., ... Lyon, G. J. (2013). Low concordance of multiple variant-calling pipelines : practical implications for exome and genome sequencing. *Genome Medicine*, 5(3), 28. <http://doi.org/10.1186/gm432>
- Papic, Z., Katona, G., & Skrabalo, Z. (1988). The cytologic identification and quantification of testicular cell subtypes. Reproducibility and relation to histologic findings in the diagnosis of male infertility. *Acta Cytologica*, 32(5), 697–706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3421018>
- Pedersen, H., & Rebbe, H. (1974). Fine structure of round-headed human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 37(1), 51–4. <http://doi.org/10.1530/JRF.0.0370051>
- Pruitt, K. D., Harrow, J., Harte, R. A., Wallin, C., Diekhans, M., Maglott, D. R., ... Lipman, D. (2009). The consensus coding sequence (CCDS) project : Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Research*, 19(7), 1316–1323. <http://doi.org/10.1101/gr.080531.108>
- Sasagawa, I., & Yanagimachi, R. (1997). Spermatids from mice after cryptorchid and reversal operations can initiate normal embryo development. *Journal of Andrology*, 18(2), 203–209. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9154515>
- Schatz, M. C., & Langmead, B. (2013). The DNA Data Deluge : Fast, efficient genome sequencing machines are spewing out more data than geneticists can analyze. *IEEE Spectrum*, 50(7), 26–33. <http://doi.org/10.1109/MSPEC.2013.6545119>
- Schenck, U., & Schill, W. B. (n.d.). Cytology of the human seminiferous epithelium. *Acta Cytologica*, 32(5), 689–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3421017>
- Singh, G. (n.d.). Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *International Journal of Fertility*, 37(2), 99–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349598>
- Tanaka, A., Nagayoshi, M., Takemoto, Y., Tanaka, I., Kusunoki, H., Watanabe, S., ... Yanagimachi, R. (2015). Fourteen babies born after round spermatid injection

- into human oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(March 2014), 201517466. <http://doi.org/10.1073/pnas.1517466112>
- Ward, W. S. (1994). The structure of the sleeping genome : implications of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(1), 77–82. <http://doi.org/10.1002/jcb.240550109>
- World Health Organization. (1992). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. (3th ed, p. 128). Cambridge University Press.
- Zhao, S., & Zhang, B. (2015). A comprehensive evaluation of ensembl, RefSeq, and UCSC annotations in the context of RNA-seq read mapping and gene quantification. *BMC Genomics*, 16(1), 97. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1308-8>