

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	9
1.1.4 La spermiogénèse	11
1.2 Structure et fonction du spermatozoïde	13
1.2.1 Anatomie du spermatozoïde	13
1.2.2 Fonction du spermatozoïde	15
1.3 L'infertilité masculine	15
1.3.1 Les différents phénotypes d'infertilité masculine	15
1.3.2 La génétique de l'infertilité	17
1.4 Les techniques d'analyses génétiques	17
1.4.1 Les puces	17
1.4.2 Le séquençage	17
1.5 L'analyse bioinformatique	17
1.5.1 L'analyse des données brut	17
1.5.2 La priorisation des variants	17
Chapitre 2 : Investigation génétique et physiologique de la globo- zoospermie	19
Conclusion	21
Annexe A : The First Appendix	23
Annexe B : The Second Appendix, for Fun	25
References	27

Liste des tableaux

Table des figures

1.1	Schéma anatomique du testicule humain :	8
1.2	Les différentes phases de la spermatogénèse	9
1.3	Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine	10
1.4	Les différentes phases de la division cellulaire	11
1.5	Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique	11
1.6	Principales étapes et modifications structurales lors de la spermiogénèse	13
1.7	Anatomie du spermatozoïde	14

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 que, 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 tapes se déroulent en continue dans la paroi des tubes séminifères du testicules depuis la pubertés 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).

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 période de la vie de l'individu : une fonction endocrine caractérisé 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, celui-ci présente une forme ovoïde ayant un volume moyen de 18 cm^3 par testicule. Comme chez la plupart des mammifères terrestres, ils sont sous le pénis dans 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 dérouleront

l'ensemble des étapes de la spermatogenèse.

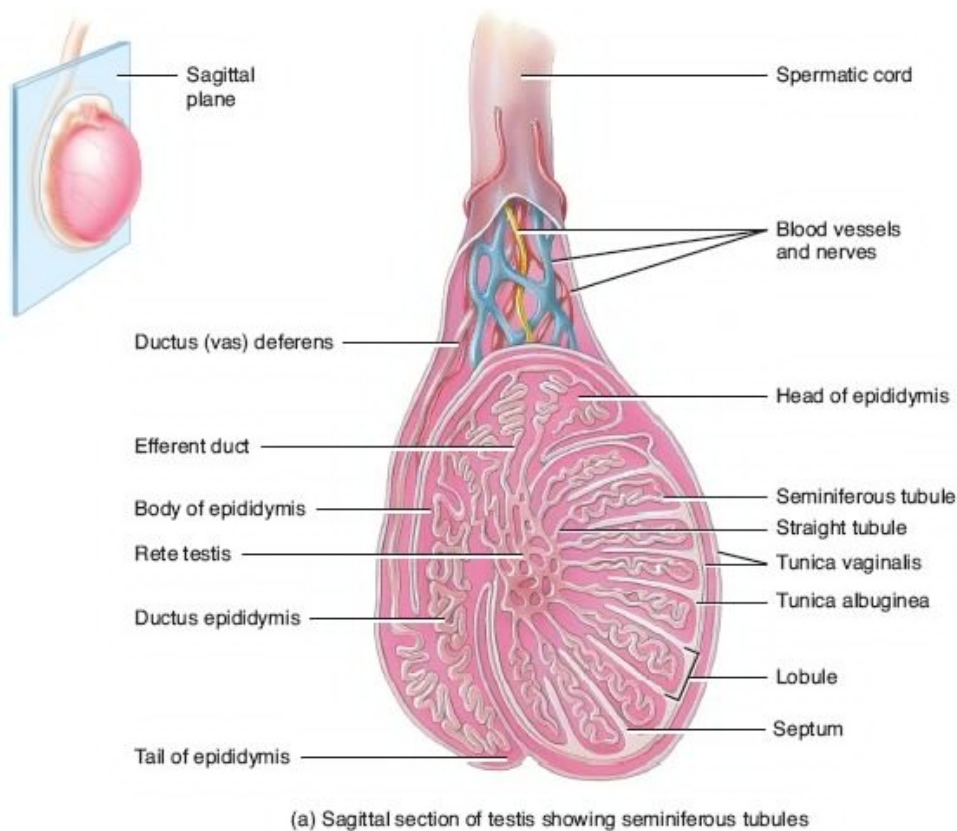


Figure 1.1 – Schéma anatomique du testicule humain :

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. Elles présentent un noyau ovoïde ainsi qu'un cytoplasme dense contenant un petit appareil de Golgi, quelques mitochondries ainsi que plusieurs ribosomes libres. 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 un spermatogonie Ad et un spermatogonie Ap (**Figure : @ref(fig :spermatogénèse)**). 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 cellulaire tout les 16 jours. Les Cellules d'une même génération maintiennent entre elles des ponts cytoplasmiques jusqu'à la spermatogénèse 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'ils se divise par mitose, former deux spermatogonies B qui eux-mêmes se diviseront en deux spermatocytes primaires diploïdes (**Figure : @ref(fig :spermatogénèse)**).

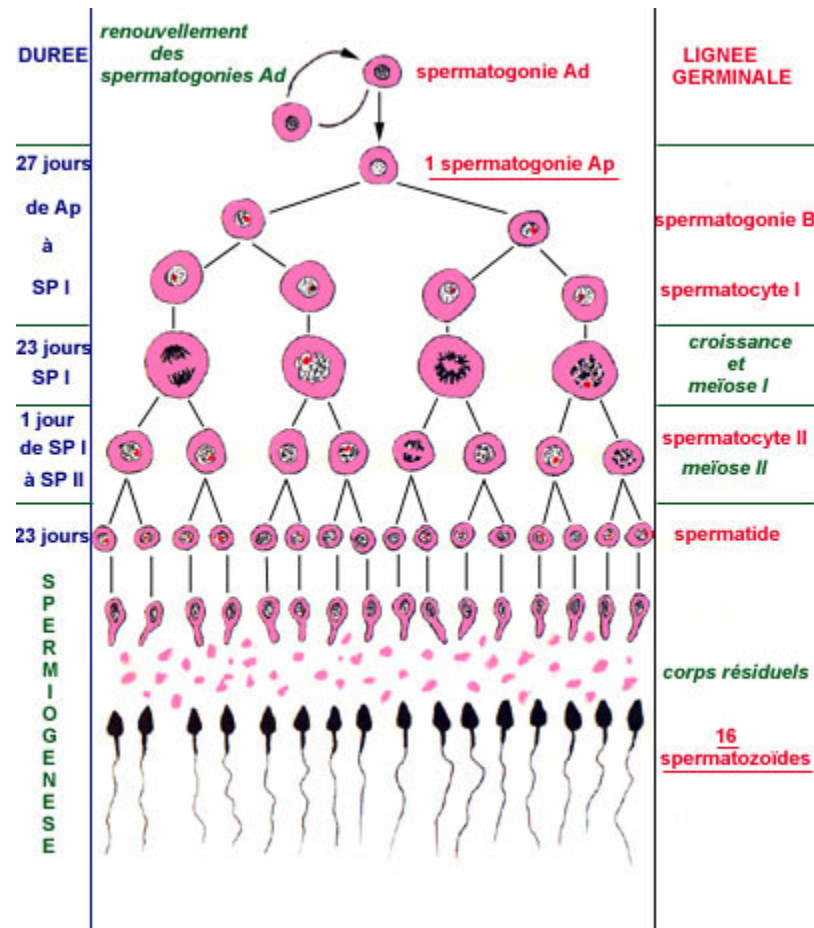


Figure 1.2 – Les différentes phases de la spermatogénèse

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**).

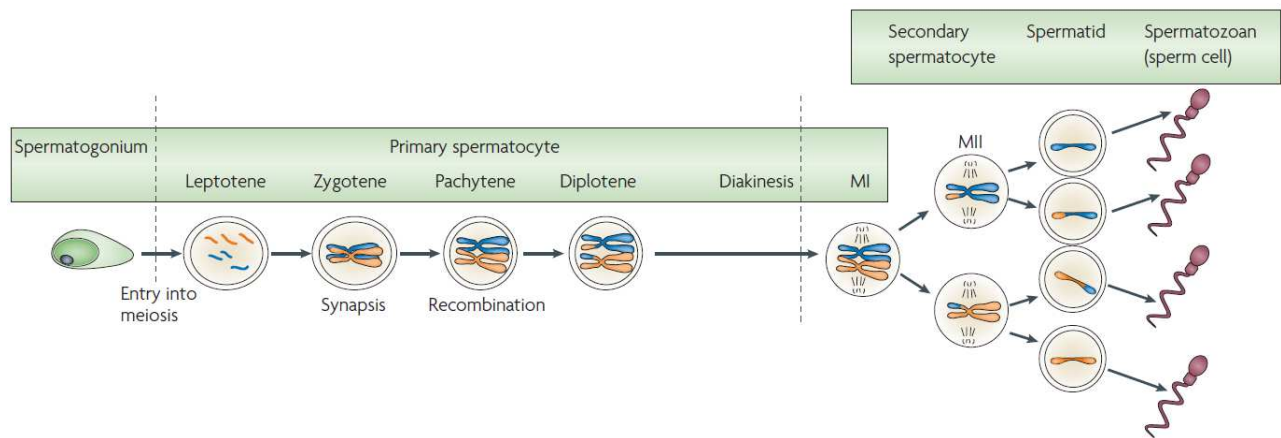


Figure 1.3 – Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine :
D'après Sasaki et Matsui, 2008

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'elles 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 elles 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

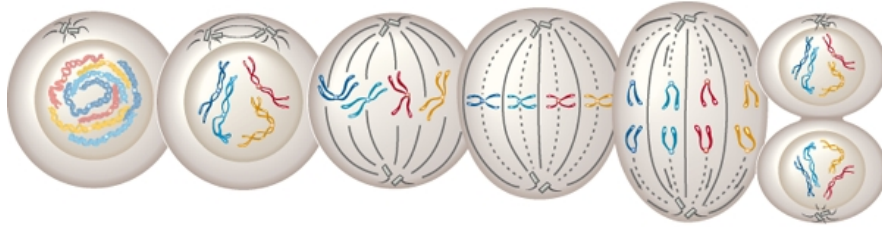


Figure 1.4 – Les différentes phases de la division cellulaire : De la prophase (à gauche) à la télophase (à droite)

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, le centromère de chaque chromosome se rompt séparant les chromatides sœurs l'une de l'autre et permettant leur déplacement 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.

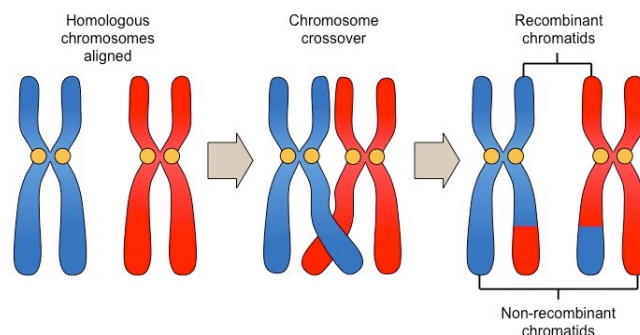


Figure 1.5 – Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique

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 plusieurs 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, la formation de l'acrosome 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 du spermatide, le noyau se condense et devient hautement polarisé (Hamilton, D. W., Waite, 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((Asimakopoulou, 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 ((Asimakopoulou, 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.

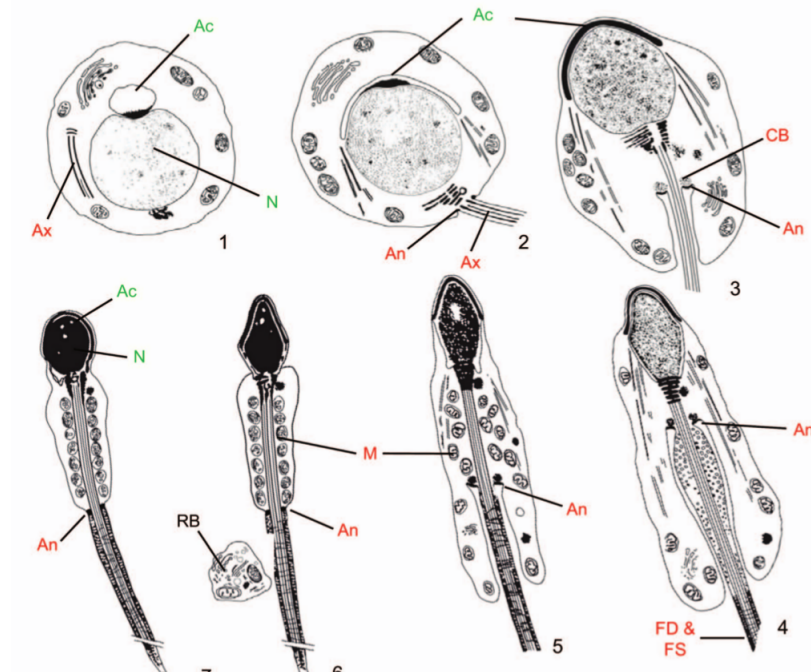


Figure 1.6 – Principales étapes et modifications structurales lors de la spermiogénèse : 1. La spermatide immature avec un gros noyau arrondi. La vésicule acrosomale est attachée au noyau, l'ébauche du flagelle n'atteint pas le noyau. 2. La vésicule acrosomale a augmenté de taille et apparaît aplatie 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)**).

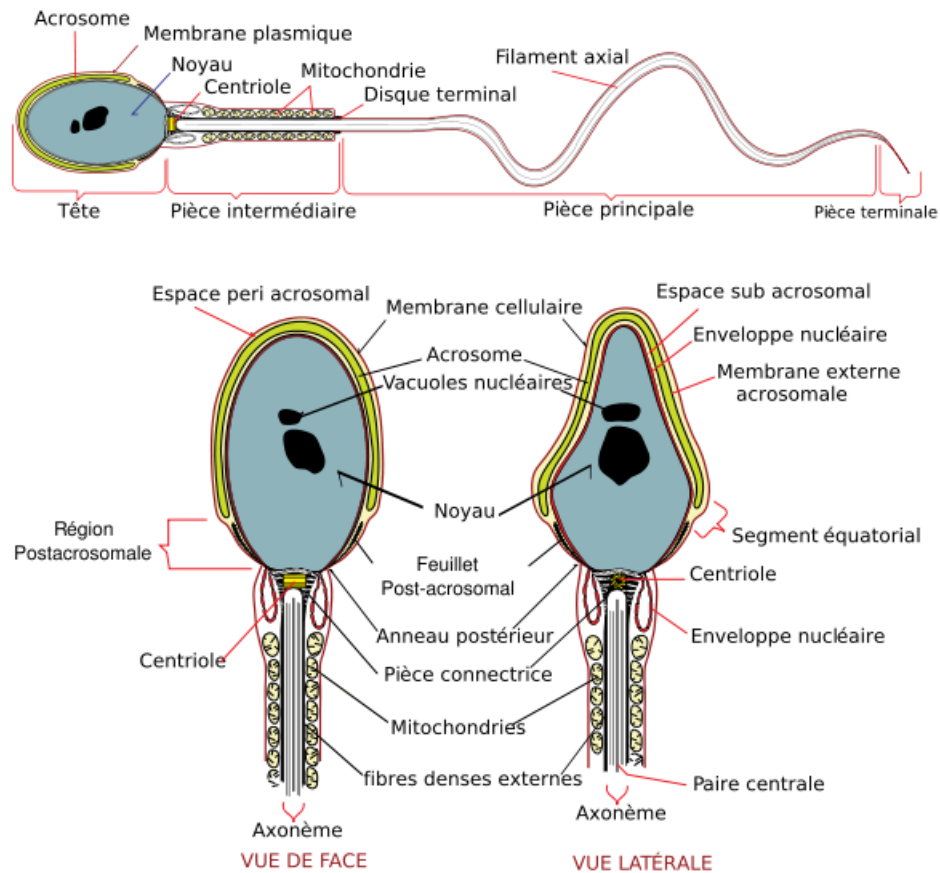


Figure 1.7 – Anatomie du spermatozoïde

La tête

1. L'acrosome : C'est un organe qui se développe dans la moitié supérieure de la tête du spermatozoïde. It is a cap-like structure derived from the Golgi apparatus.
2. L'acroplaxome
3. Le noyau

Le flagelle

1. La pièce intermédiaire
2. La pièce principale
3. La pièce terminale

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.

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

Soderstro m, 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.

li  e    la forme

li  e    la mobilit  e

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

1.5 L'analyse bioinformatique

1.5.1 L'analyse des données brut

L'alignement

L'appel des variants

1.5.2 La priorisation des variants

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.
- 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>
- 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/10.1210/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>
- 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 *in Vivo* and *in Vitro* : A Partnership of Spermatogenic and Somatic Cell Lineages*. *Endocrine Reviews*, 15(1), 116–134. <http://doi.org/10.1210/edrv-15-1-116>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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.