

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

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	13
1.3 L'infertilité masculine	13
1.3.1 Les différents phénotypes d'infertilité masculine	14
1.3.2 La génétique de l'infertilité	14
1.4 Les techniques d'analyses génétiques	14
1.4.1 Les puces	14
1.4.2 Le séquençage	14
1.5 L'analyse bioinformatique	15
1.5.1 L'analyse des données brut	15
1.5.2 La priorisation des variants	15
Chapitre 2 : Investigation génétique et physiologique de la globo- zoospermie	17
Conclusion	19
Annexe A : The First Appendix	21
Annexe B : The Second Appendix, for Fun	23
References	25

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. D'après Sasaki et Matsui, 2008	10
1.4	Les différentes phases de la division cellulaire : De la prophase (à gauche) à la télophase (à droite)	11
1.5	Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique	11
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	12
1.7	Anatomie du spermatozoïde	13

Remerciements

Je remercie ...

Cette thèse est dédiée à ...

Résumé

The preface pretty much says it all.
Second paragraph of abstract starts here.

Abstract

The preface pretty much says it all.
Second paragraph of abstract starts here.

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 étapes se déroulent en continu dans la paroi des tubes séminifères du testicules 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).

1.1.1 Rappels sur le testicule

Les testicules sont les organes sexuels masculins. Ils possèdent deux fonctions principales plus ou moins exprimées selon les périodes de la vie de l'individu : 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, celui-ci présente une forme ovoïde ayant un volume moyen de 18 cm³ par testicule. Comme chez la plupart des mammifères terrestres, ils sont 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 dérouleront l'ensemble des étapes de la spermatogénèse.

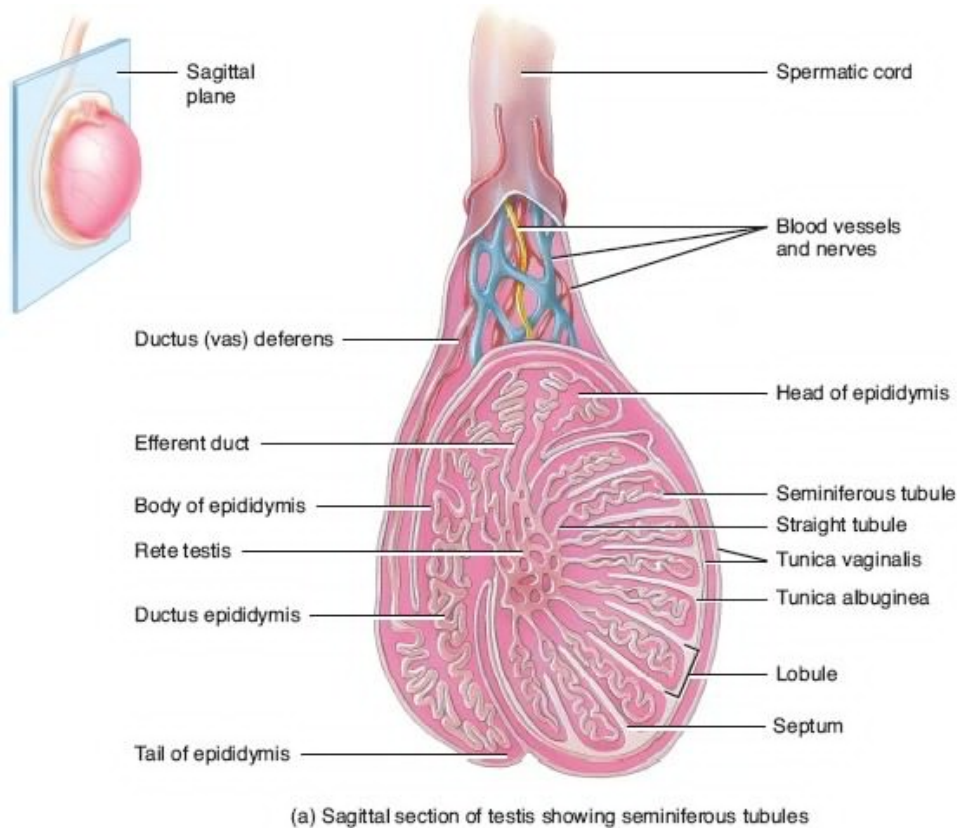


FIGURE 1.1 – Schéma anatomique du testicule humain :

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. 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 : 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 cellulaire tout 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'ils se divisent par mitose, former deux spermatogonies B qui eux-mêmes se diviseront en deux spermatocytes primaires diploïdes (**Figure : 1.2**).

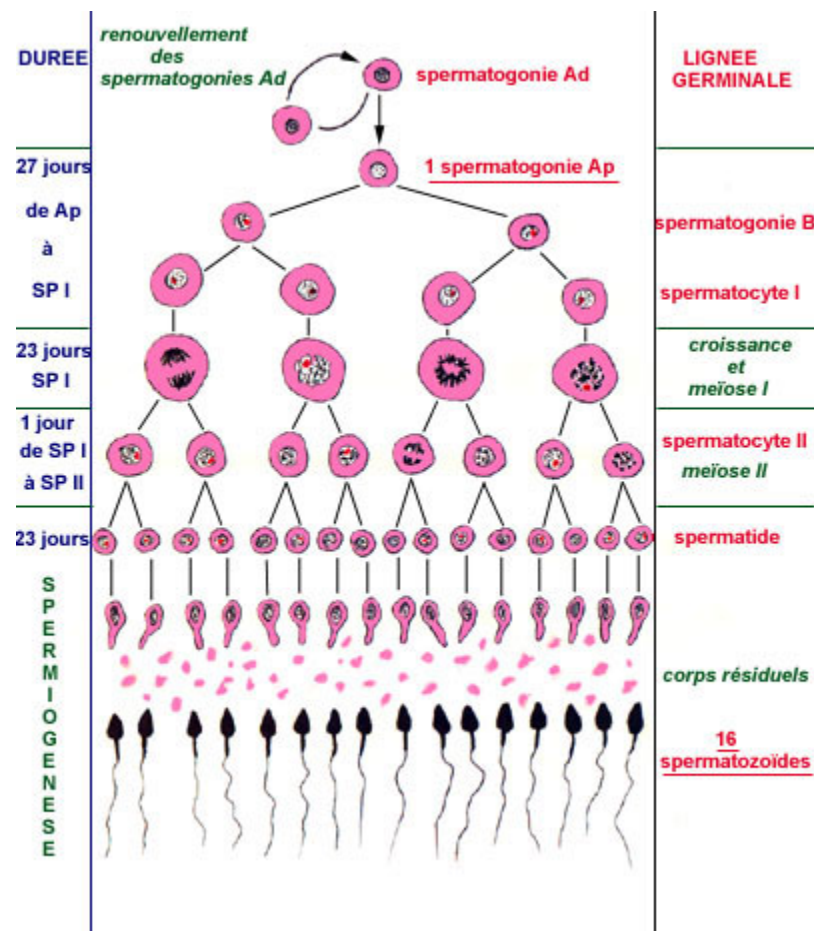


FIGURE 1.2 – Les différentes phases de la spermatogénèse

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 secondaires (spermatocytes II). Ce résultat est le fruit de deux divisions successives (**Figure : 1.3**) 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 interchromosomique, lorsque les chromosomes sont séparés et le brassage intrachromosomique impliquant notamment des enjambements chromosomiques (crossing-over) (**Figure : 1.5**).

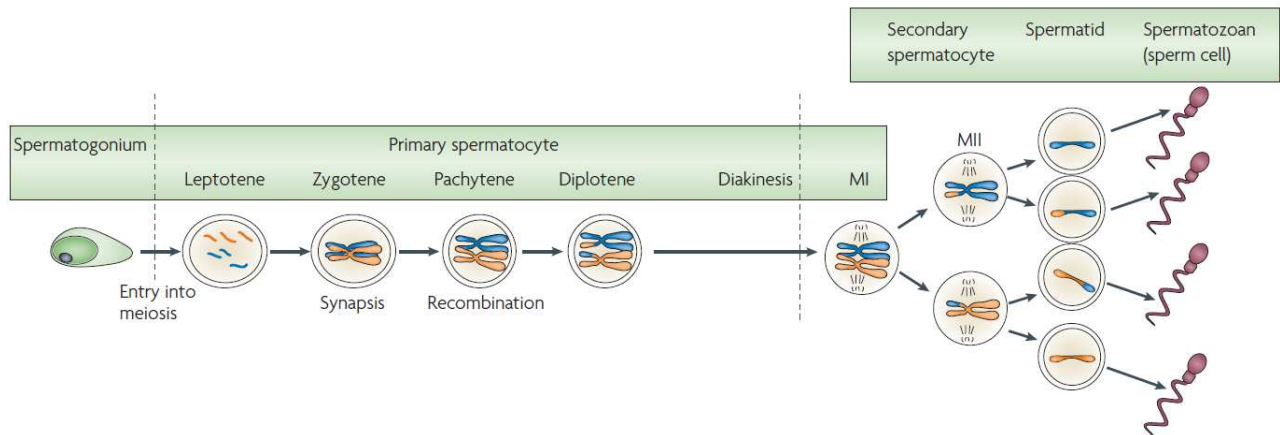


FIGURE 1.3 – Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine.
D'après Sasaki et Matsui, 2008

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 centomère, 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

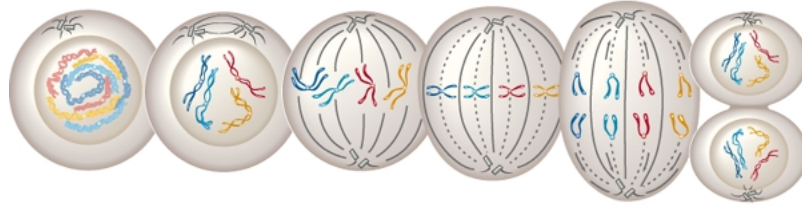


FIGURE 1.4 – Les différentes phases de la division cellulaire : De la prophase (à gauche) à la télophase (à droite)

La première division méiotique abouti à la formation des spermatocytes secondaires (spermatocytes II). À ce states, les cellules sont haploïdes et chaque chromosome est composé de deux chromatides soeurs. Après, cette brèves 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 prophaseII, à la différence de la prophase I, est très courte. Lors de cette étape, les chromosomes constitués de chromatides soeurs 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 soeurs 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.

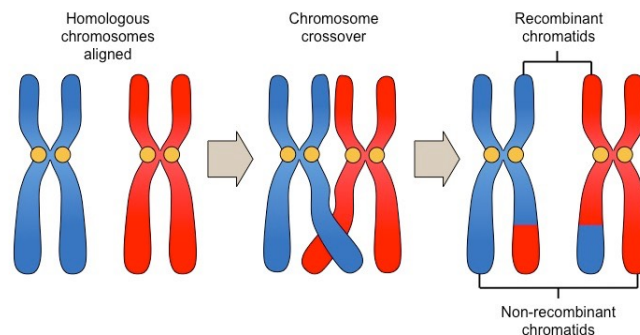


FIGURE 1.5 – Schéma simplifié d'un enjambement chromosomique

1.1.4 La spermiogénèse

La spermiogénèse est la phase finale de la spermatogénèse. Elle dure environs 23 jours chez l'humain et peut être subdivisée en plusieurs étapes (**Figure :** (^ref(fig :spermiogénèse))). La spermiogénèse définit la cytodifférentiation des spermatides en spermatozoïdes. C'est au cours de cette phase que les caractéristiques morphologique et fonctionnelles du spermatozoïdes 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, Waites, Special Programme of Research, Family Health International (Organization), & World Health Organization., 1987).

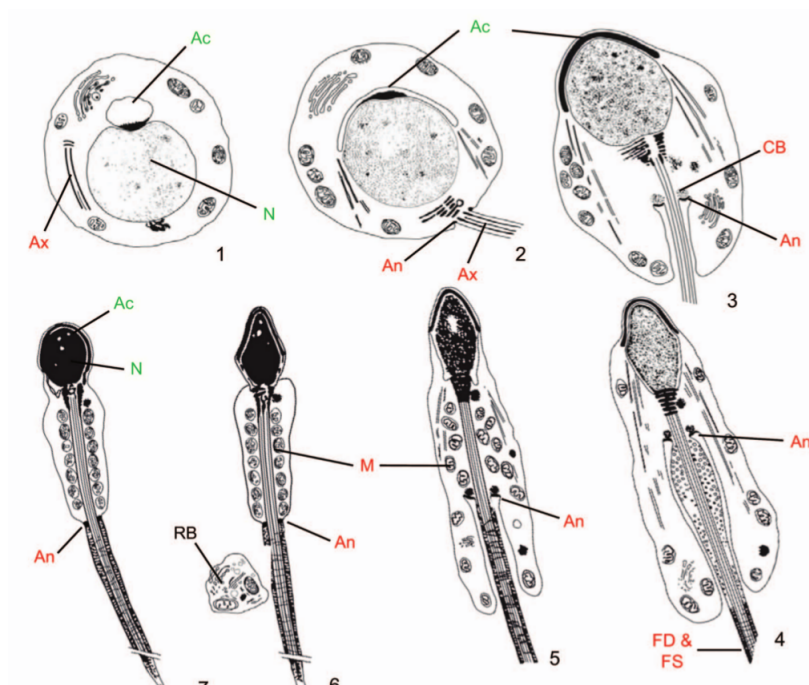


FIGURE 1.6 – Principales étapes et modifications structurales lors de la spermiogénèse. 1. La spermatide immature avec un gros noyau arrondi. La vésicule acrosomale est attachée au noyau, l'ébauche du flagelle n'atteint pas le noyau. 2. La vésicule acrosomale a augmenté de taille et apparaît aplatie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

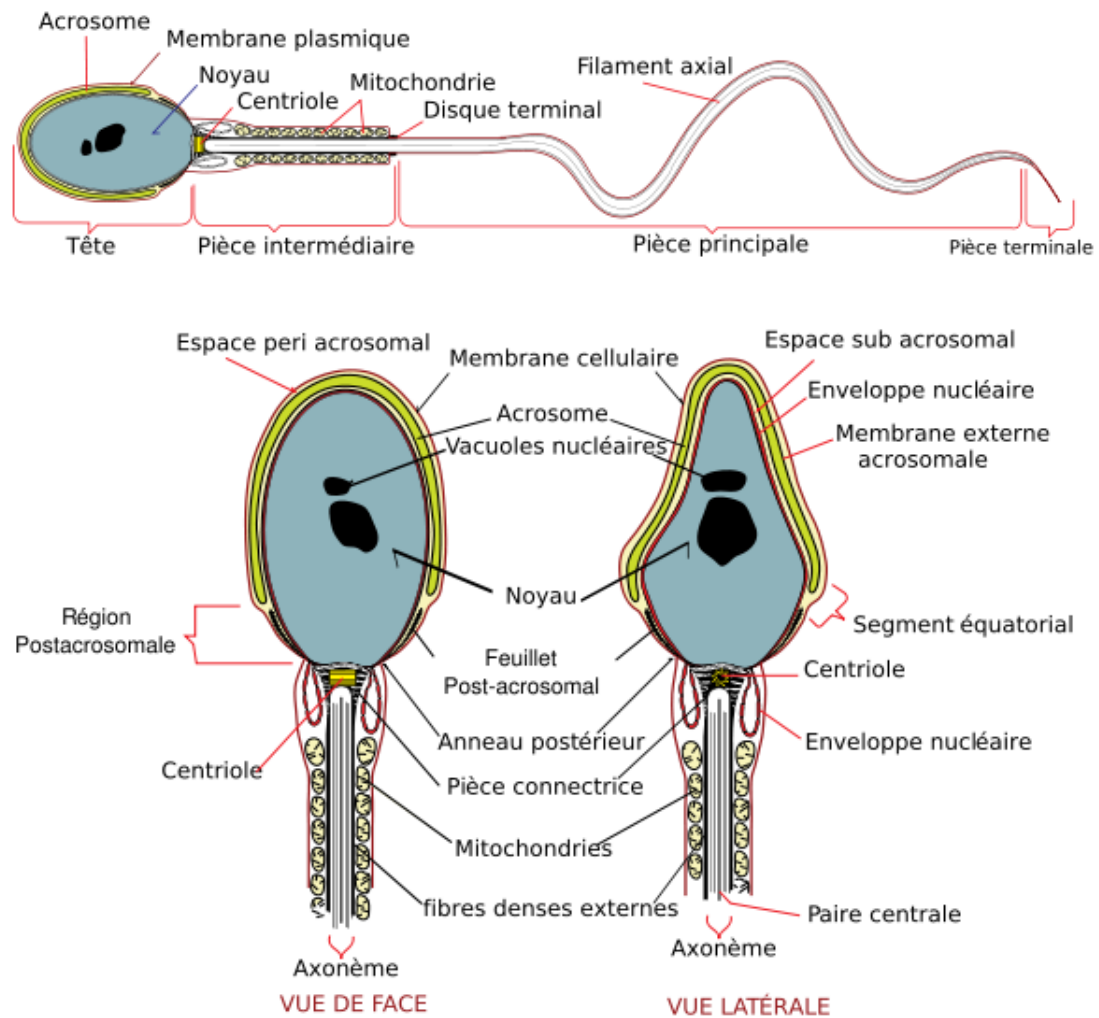


FIGURE 1.7 – Anatomie du spermatozoïde

La tête

Le flagelle

1.2.2 Fonction du spermatozoïde

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.

1.3.1 Les différents phénotypes d’infertilité masculine

Liée à la quantité

liée à la forme

liée à la mobilité

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

This first appendix includes all of the R chunks of code that were hidden throughout the document (using the `include = FALSE` chunk tag) to help with readability and/or setup.

In the main Rmd file

In Chapter ?? :

```
# This chunk ensures that the thesishdown package is  
# installed and loaded. This thesishdown 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(thesishdown)){  
  library(devtools)  
  devtools::install_github("ismayc/thesishdown")  
}  
library(thesishdown)  
flights <- read.csv("data/flights.csv")
```


Annexe B

The Second Appendix, for Fun

References

- 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*, 113, 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 ¹. *Endocrine Reviews*, 18(4), 541–609. <http://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0310>
- Goossens, E., & Tournaye, H. (2013). Adult Stem Cells in the Human Testis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 31(01), 039–048. <http://doi.org/10.1055/s-0032-1331796>
- Hamilton, D., Waites, G. M. H., Special Programme of Research, D., Family Health International (Organization), & World Health Organization. (1987). *Cellular and molecular events in spermiogenesis* (p. 334). Cambridge University Press.
- Johnson, L., Petty, C. S., & Neaves, W. B. (1980). A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biology of Reproduction*, 22(5), 1233–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7417656>
- 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>