



HAL
open science

Anomalies Morphologiques Multiples des Flagelles chez des patients infertiles : évaluation du pronostic de l'ICSI chez les patients mutés dans le gène DNAH1 et caractérisation de nouveaux gènes

Clémentine Wambergue Legrand

► **To cite this version:**

Clémentine Wambergue Legrand. Anomalies Morphologiques Multiples des Flagelles chez des patients infertiles : évaluation du pronostic de l'ICSI chez les patients mutés dans le gène DNAH1 et caractérisation de nouveaux gènes. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01526332

HAL Id: dumas-01526332

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01526332>

Submitted on 23 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2016

N°

Anomalies Morphologiques Multiples des Flagelles chez des patients infertiles: Evaluation du pronostic de l'ICSI chez les patients mutés dans le gène *DNAH1* et caractérisation de nouveaux gènes.

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE
Conformément aux dispositions du décret N°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

Clémentine WAMBERGUE LEGRAND

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*

Le 4 Avril 2016

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : **M. le Professeur JOUK Pierre-Simon**

Membres : **Mme le Professeur LEROUX Dominique**
Mme le Professeur HENNEBICQ Sylviane

M. le Docteur RAY Pierre

M. le Docteur COUTTON Charles, Directeur de thèse

*La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Affaire suivie par Kristina PENAUD

sp-medecine-pharmacie@ujf-grenoble.fr

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Jean Paul ROMANET**

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie

PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé

PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie

PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	Chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie

PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophtalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire

PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jouk,

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites de présider le jury de cette thèse. Je vous adresse mon respect et ma plus grande reconnaissance.

A Madame le Professeur Leroux,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour votre accueil au sein du service de Génétique Onco-Hématologique et pour votre soutien au cours de ces derniers mois. Je vous suis reconnaissante de me donner l'occasion de concilier des activités de laboratoire et de consultation.

A Madame le Professeur Hennebicq,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, et aussi pour l'expertise que vous pourrez apporter en tant que spécialiste en procréation médicale assistée.

A Monsieur le Docteur Ray,

Je vous remercie de participer à ce jury. Merci pour votre accueil au sein de l'équipe GETI lors de mon Master 2. Je vous suis reconnaissante pour les nombreuses opportunités que vous m'avez offertes : congrès, communications orales, publication, (presque) prix de Master... Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et vos conseils.

A Monsieur le Docteur Coutton,

Je te remercie d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Merci pour ta disponibilité depuis le début de mon Master 2, tes nombreux conseils, ton coaching intensif... Je te suis reconnaissante de m'avoir convaincue de me spécialiser en génétique, je suis aujourd'hui pleinement satisfaite de ce choix !

Au Docteur Christine Lefebvre,

Pour ton accueil en Cytogénétique Onco-Hématologique. Merci pour le temps que tu passes à me transmettre tes connaissances, toujours avec dynamisme. C'est un réel plaisir de travailler à tes côtés. Merci pour ta bienveillance, en particulier ces dernières semaines !

Aux Docteurs Amblard, Devillard et Satre,

Pour leur accueil à l'Hôpital Couple Enfant, et pour m'avoir permis de renouer avec une activité de consultation. Merci pour votre confiance, vos conseils et votre gentillesse.

A tous les **biologistes et techniciens** qui ont participé à ma formation au cours de ces 4 années dans les services d'Hématologie, Biochimie et Génétique Moléculaire, Génétique Chromosomique, Immunologie, Parasitologie/Mycologie, Bactériologie/Virologie et au Laboratoire de garde.

A **Nathalie** (and David !), **Anne, Sarah et Emilie**. Merci pour votre patience, votre gentillesse et votre bonne humeur, ainsi que pour votre soutien ces dernières semaines. J'espère pouvoir travailler à vos côtés encore un petit moment...

A toute l'équipe GETI,

Merci au Dr Christophe Arnoux pour son accueil à Jean Roget et son encadrement (surtout durant les heures passées au confocal). Je tiens également à remercier Guillaume, Sandra, Roland, Thomas, Marie et Zine-Eddine pour leur aide, ainsi que Julien pour ses remarques avisées.

A tous mes collègues internes, spécialement Carine, Céline, Maëlle, Aurélie, Caroline, Elena, Gladys, Arnaud...

Aux amis de Marseille... déjà 10 ans depuis la P2 !

A Jérôme et Carole B ainsi que Jean-François K, pour m'avoir confortée dans le choix de faire ces études.

A mes parents et grands-parents, merci pour votre affection et votre dévouement sans limite. Sans votre soutien, le chemin parcouru depuis septembre 2004 n'aurait pas été le même...

Olivia, c'est à ton tour maintenant, courage pour la dernière ligne droite... **Damien**, j'espère ne jamais avoir besoin de tes talents professionnels !

A ma belle-famille, merci pour votre accueil dans cette contrée au climat hostile... je m'y fais peu à peu. Merci pour votre aide au quotidien !

Bruno, avec un peu de chance 2016 nous verra diplômés tous les deux... Merci pour ton soutien inconditionnel, ces derniers mois particulièrement.

Et à **Clara** qui illumine chaque jour de ma vie (et parfois mes nuits aussi... !)

Papy, j'aurais aimé pouvoir t'entendre dire une dernière fois « *J'en étais sûr !!!* »

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	8
TABLE DES MATIERES.....	10
TABLE DES FIGURES	12
TABLEAUX	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
AVANT-PROPOS.....	14
INTRODUCTION / RAPPELS GENERAUX.....	15
A. Le spermatozoïde	15
a. La spermatogénèse.....	15
i. Phase de multiplication	17
ii. Méiose ou phase de Maturation.....	17
iii. Phase de différenciation ou spermiogénèse.....	18
iv. Spermiation	19
b. Anatomie du spermatozoïde.....	19
i. Structure générale.....	19
ii. Structure axonémale.....	22
B. Infertilité masculine	24
1. Les différents types d'infertilité.....	25
2. Etiologies	26
a. Pathologie multifactorielle	26
b. Causes non génétiques	26
c. Causes génétiques de l'infertilité masculine.....	27
i. Anomalies chromosomiques.....	27
1. Anomalies des chromosomes sexuels	28
a. Syndrome de Klinefelter	28
b. Autres anomalies des chromosomes sexuels.....	29
2. Remaniements chromosomiques : translocations, inversions.	29
ii. Anomalies moléculaires	31
1. Microdélétions du chromosome Y	31
2. Mutations du gène CFTR.....	32
3. Mutations dans des gènes impliqués au niveau de la spermatogénèse.....	32
d. Ciliopathies : notions	35
3. Exploration médicale de l'infertilité	35
a. Stratégie générale.....	35
b. Spermogramme avec spermocytogramme	36

c. Explorations génétiques	37
i. Caryotype	37
ii. FISH sur spermatozoïdes	38
iii. Analyses moléculaires	40
4. Prise en charge médicale de l'infertilité masculine	40
a. Techniques de PMA	40
b. Efficacité de la technique	41
c. Risques sur le développement embryonnaire	41
C. Nouvelles approches pour l'identification des gènes impliqués dans l'infertilité : exemples.	42
1. Cartographie par homozygotie : exemple de la découverte du gène <i>DNAH1</i> ..	42
2. Séquençage haut débit	44
ARTICLE 1	47
PATIENTS WITH MULTIPLE MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE SPERM FLAGELLA (MMAF) DUE TO <i>DNAH1</i> MUTATIONS HAVE A GOOD PROGNOSIS FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)	47
A. Contexte et Objectifs	47
B. Article original.....	48
C. Conclusion et perspectives	75
ARTICLE 2	76
IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF <i>CFAP43</i> , A GENE INVOLVED IN MALE INFERTILITY CHARACTERIZED BY MULTIPLE MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES OF SPERM FLAGELLA	76
A- Contexte et Objectifs	76
B- Article original.....	76
C- Conclusion et perspectives	104
CONCLUSION GENERALE	106
BIBLIOGRAPHIE	108
SERMENT D'HIPPOCRATE	113

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma simplifié d'une portion transversale de tube séminifère montrant les différentes étapes de la spermatogenèse	16
Figure 2. Les différentes phases de la spermatogénèse.....	17
Figure 3. Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine.. ..	18
Figure 4. Représentation schématique d'un spermatozoïde humain	19
Figure 5. Schéma représentant une coupe transversale du flagelle spermatique.....	20
Figure 6. Coupes transversales et 3D du flagelle du spermatozoïde, sur 3 niveaux.	21
Figure 7. Organisation de l'unité fondamentale de 96 nm de l'axonème du flagelle du sperme d'oursin..	23
Figure 8. Caryotype d'un individu présentant un syndrome de Klinefelter, montrant un chromosome X surnuméraire.....	28
Figure 9. Représentation schématique du chromosome Y, d'après (32).....	29
Figure 10. A. Représentation schématique du mécanisme de translocation réciproque B. Représentation schématique du mécanisme de translocation Robertsonienne.....	30
Figure 11. Les différentes anomalies morphologiques spermatiques.....	37
Figure 12. Prise en charge en cas de caryotype anormal chez l'homme oligospermique.	38
Figure 13 : FISH sur spermatozoides.....	39
Figure 14. Stratégie de localisation d'un gène pathogène par cartographie d'homozygotie.....	43
Figure 15 Principe schématique de la technologie NGS ILLUMINA®	45
Figure 16. Principe schématique de la technologie NGS ILLUMINA® suite.....	46

TABLEAUX

Tableau 1 Récapitulatif des gènes identifiés dans l'infertilité masculine.....	34
Tableau 2. Valeurs seuils des paramètres spermatiques (WHO, 5eme édition).....	36

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
AZF	Azoospermia Factor
CECOS	Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme
CFAP43	Cilia and Flagella Associated Protein 43
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CRISPR/Cas9	Clustured Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DCP	Dyskinésie Ciliaire Primitive
DNAH1	DyNein Axonemal Heavy chain1
DPN	Diagnostic Pré Natal
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FIV	Fécondation <i>In Vitro</i>
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
KO	Knock Out
MMAF	Multiple Morphological Abnormalities of sperm flagella
NGS	Next Generation Sequencing
OATS	Oligo Asthéro Terato Spermie
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Procréation Médicalement Assistée
SNP	Single Nucléotide Polymorphisms
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
TESE	TEsticular Sperm Extraction

AVANT-PROPOS

En 2012, l'Inserm et l'Agence de la biomédecine se penchaient sur la question de l'infertilité masculine : « Les conséquences, pour la santé des enfants, de l'utilisation de spermatozoïdes pathologiques pour procréer par ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), ainsi que les conséquences de la transmission aux générations futures de modifications géniques non présentes auparavant du fait de la stérilité naturelle montrent l'importance de développer des recherches sur la stérilité testiculaire, ses causes et ses conséquences ». Mon travail de thèse, réalisé au sein de l'équipe « Génétique, Epigénétique et Thérapies de l'Infertilité » (Institut Albert Bonniot, INSERM 1209, CNRS UMR 5309, Grenoble) a consisté à aborder ces aspects pour un phénotype précis d'infertilité masculine : les « Malformations Multiples des Flagelles » (MMAF). Ce phénotype est caractérisé par une mosaïque de plusieurs anomalies morphologiques au niveau spermatique : absence totale du flagelle, ou bien présence d'un flagelle court, courbé, enroulé et/ou de diamètre irrégulier. Les patients atteints présentent en général un tableau d'oligoasthénotérazoospermie.

Cette thèse s'articule autour de 2 articles, suivant ce plan :

- Introduction/Rappels généraux
- Article 1
- Article 2
- Conclusion générale

Le premier article présenté dans cette thèse a été écrit durant mon stage dans le laboratoire de Génétique Chromosomique au sein du Département de Génétique et Procréation de l'Hôpital Couple Enfant. Ce laboratoire reçoit les demandes de caryotypes pour bilan d'infertilité et réalise l'hybridation in situ fluorescente (FISH) sur spermatozoïdes avant PMA. Le second article a été rédigé durant mon Master 2 Recherche, parallèlement à mon stage en Biochimie Génétique et Moléculaire, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie. Ce laboratoire réalise notamment les recherches de microdélétions du Chromosome Y, des principales mutations du gène *CFTR*, et le séquençage des gènes *DPY19L2* et *AURKC* impliqués dans des phénotypes variés d'infertilité masculine.

INTRODUCTION / RAPPELS GENERAUX

L'infertilité est l'incapacité pour un couple de concevoir un enfant après au moins une année sans contraception. En France, on estime qu'environ 15% des couples seront confrontés à cette problématique au cours de leur vie procréative. Au niveau mondial, plus de 70 millions de couples sont concernés par des problèmes de fertilité (1). En 1991, une étude française a montré que l'infertilité était d'origine féminine dans 33 % des cas, d'origine masculine dans 20 % des cas et d'origine mixte dans 39 % des cas (2). L'infertilité masculine est donc impliquée dans plus de la moitié des cas et constitue aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique. Des efforts doivent être entrepris et poursuivis, tant sur le versant de l'identification des causes de cette pathologie dont la moitié reste encore inconnue (3), que sur le versant de l'optimisation de la prise en charge des couples en centre de procréation médicalement assistée.

A. Le spermatozoïde

a. La spermatogénèse

Dans ce chapitre, nous allons aborder de manière très générale, les principales étapes du processus de production des gamètes mâles.

La spermatogénèse se déroule au niveau des testicules et plus précisément au sein des tubes séminifères, où la cellule germinale va se différencier en spermatozoïdes durant 74 jours chez l'homme. Plusieurs stades de différenciation gamétique vont se dérouler partant du pôle basal de l'épithélium séminifère jusqu'au pôle luminal qui verra la libération des spermatozoïdes matures (figure 1). On va distinguer :

- Les cellules souches : spermatogonies de type A puis de type B
- spermatocytes primaires
- spermatocytes secondaires
- spermatides rondes

- spermatides allongées
- spermatozoïdes

Les cellules de Sertoli sont intriquées entre ces différentes cellules sur toute la hauteur de l'épithélium et jouent un véritable rôle de soutien et de régulation du processus de spermatogénèse.

[Illustration sous droit]



Figure 1. Schéma simplifié d'une portion transversale de tube séminifère montrant les différentes étapes de la spermatogénèse, d'après Rato *et al*, 2012.

La production des spermatozoïdes à partir des cellules primaires germinales se déroule en 3 phases : la multiplication, la méiose (appelée aussi phase de maturation nucléaire) et la spermiogénèse (appelée aussi phase de différenciation) (figure 2).

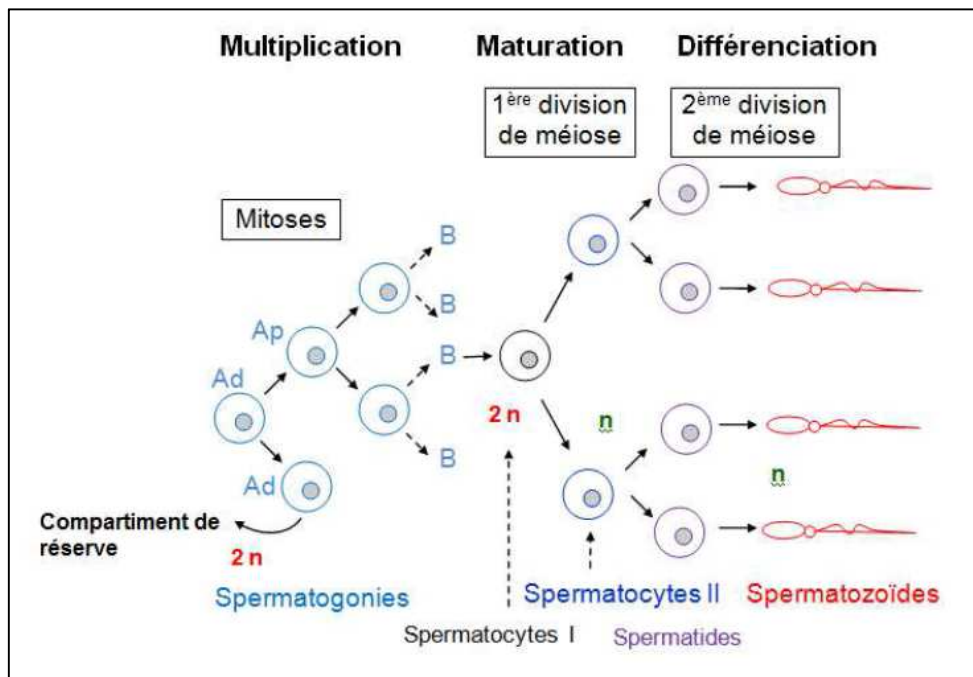


Figure 2. Les différentes phases de la spermatogénèse. Ad : spermatogonies avec noyau sombre ; Ap : spermatogonies avec noyau pâle. B : spermatogonies de type B ; n : lot haploïde de chromosomes.

i. Phase de multiplication

Au cours de cette première phase, les spermatogonies se divisent par mitose pour aboutir au stade de spermatocytes primaires. Les spermatogonies Ad se divisent en une spermatogonie Ap (qui évoluera en spermatogonie B), et en une spermatogonie Ad (qui permettra de reconstituer continuellement le stock de cellules souches).

ii. Méiose ou phase de Maturation

La méiose a lieu au stade des spermatocytes. La méiose permet de passer du stade diploïde (spermatocytes I) au stade haploïde (spermatocytes II). Une cellule diploïde comporte 23 paires de chromosomes (« 2n »). Un lot haploïde est constitué de 23 chromosomes (« n »). Le rôle de la méiose est d'assurer la réduction chromatique et le brassage de l'information génétique. Elle consiste en deux étapes successives (figure 3) :

- La méiose réductionnelle : durant cette étape, a lieu le mécanisme de crossing-over (c'est à dire des échanges de matériel chromosomique entre les chromatides

non sœurs des paires de chromosomes) permettant le brassage génétique. Ensuite a lieu la séparation de chaque paire de chromosomes. On obtient donc 2 cellules filles contenant un seul exemplaire de chaque chromosome. Les chromosomes sont constitués de 2 chromatides à ce stade.

- La méiose équationnelle : chaque chromatide sœur va migrer à un pôle de la cellule, aboutissant ainsi à la formation des spermatides contenant chacune une quantité « n » de matériel génétique.

[Illustration sous droit]

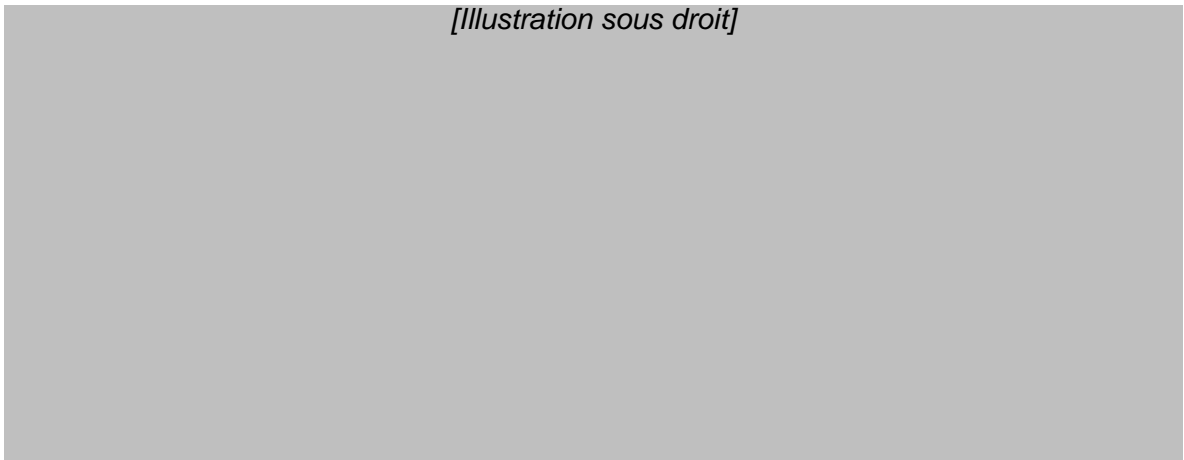


Figure 3. Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine. D'après Sasaki et Matsui, 2008.

iii. Phase de différenciation ou spermiogénèse

Au cours de cette étape, les spermatides vont subir de nombreuses modifications morphologiques, aboutissant à la formation de spermatozoïdes. On notera schématiquement 3 grandes phases : la compaction de l'ADN nucléaire, la formation de l'acrosome et la formation du flagelle.

Tout d'abord, la réorganisation nucléaire va consister en une condensation de l'ADN, permise principalement par le remplacement des histones en protamines. Cette compaction a pour but de réduire la taille du noyau et de protéger le matériel génétique (ex. : éviter l'oxydation des bases). Puis, l'acrosome sera mis en place et se répartira sur les 2/3 antérieurs du noyau. Le noyau rond va peu à peu s'allonger. L'élongation du flagelle débute par la migration du centrosome à l'opposé de l'acrosome. Enfin,

l'élimination du cytoplasme en excès (corps résiduel ou gouttelette cytoplasmique) permettra au spermatozoïde d'obtenir sa forme allongée. La description des différentes structures est détaillée dans le chapitre suivant.

iv. Spermiation

Etape ultime, elle consiste en la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, qui seront alors transportés jusqu'à l'épididyme afin de poursuivre leur maturation.

b. Anatomie du spermatozoïde

i. Structure générale

Le spermatozoïde est une cellule mobile qui mesure environ 60µm et se compose schématiquement de trois parties distinctes, la tête, le cou et le flagelle, ce dernier étant lui-même divisé en trois sections (figure 4).

[Illustration sous droit]




Figure 4. Représentation schématique d'un spermatozoïde humain

La tête se compose principalement du noyau, recouvert par l'acrosome. Cet acrosome résulte de la fusion des vésicules golgiennes en une vésicule acrosomale. Cette vésicule contient de nombreuses enzymes nécessaires à la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte au moment de la fécondation.

Le cou (ou collet) contient le centrosome constitué de deux centrioles. Un centriole est une structure creuse formée de neuf triplets de microtubules. Le centriole proximal forme le complexe centriolaire. Son axe est perpendiculaire à l'axe du flagelle. Il se dédoublera lors de la fécondation pour initier le premier fuseau mitotique. Le centriole distal est quant à lui parallèle à l'axe du flagelle. Il sera le point de départ de la formation de l'axonème par un mécanisme de polymérisation de microtubules.

Le flagelle contient les structures permettant la mobilité spermatique. Parmi celles-ci, il faut distinguer l'axonème, structure fondamentale située au centre du flagelle (figure 5B). La structure de l'axonème sera détaillée dans le chapitre suivant.

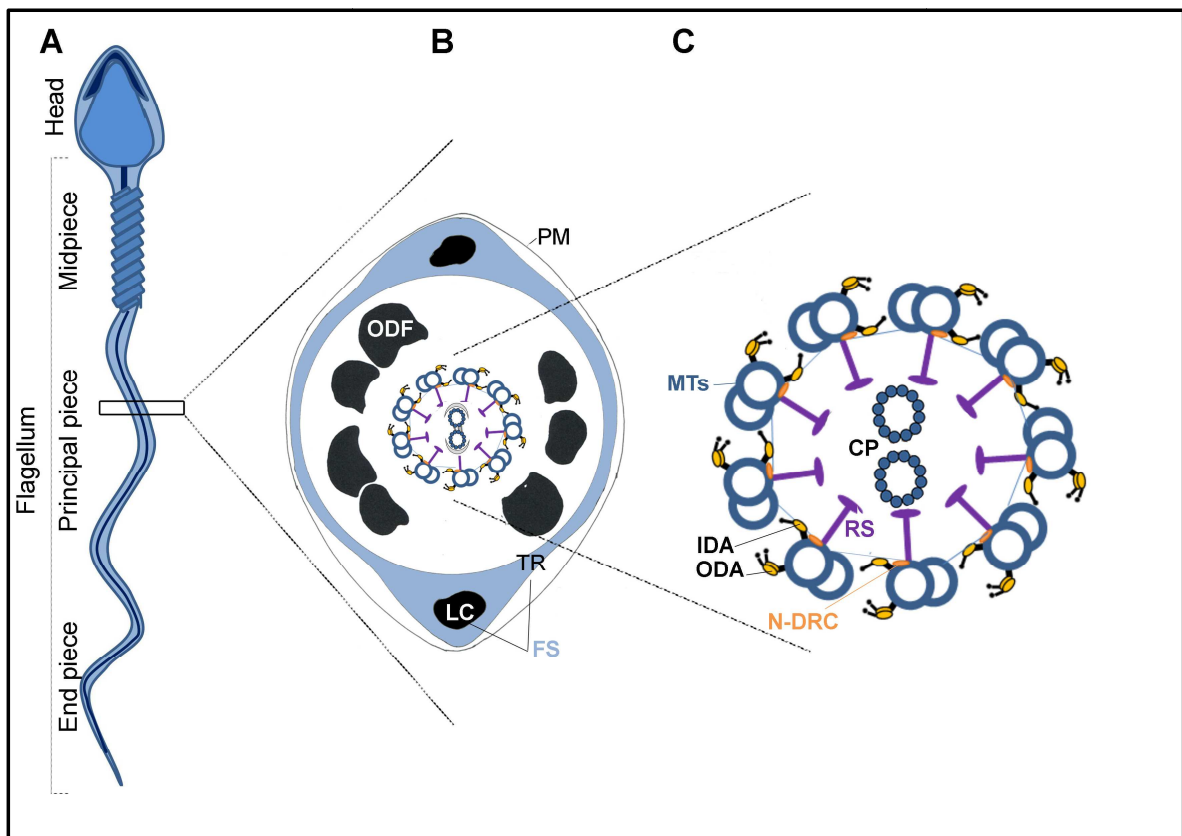


Figure 5. Schéma représentant une coupe transversale du flagelle spermatique. (A) Représentation schématique d'un spermatozoïde humain. Le flagelle est schématiquement divisé en 3 sections (B) Coupe transversale du flagelle au niveau de la pièce principale, PM : Membrane plasmique, LC : colonnes longitudinales, ODF : fibres denses externes, FS : gaine fibreuse, TR : stries fibreuses (C) Grossissement de l'axonème, révélant une organisation en structure « 9+2 ». IDA, ODA : bras internes et externes de dynéines, N-DRC : complexe Nexine-Régulation des dynéines, RS : ponts radiaux, MT : Microtubules. D'après *Coutton et al*, 2015 (4)

Le flagelle se décompose en trois sections (figure 6) :

- la pièce intermédiaire, où l'axonème est entouré d'une gaine de mitochondries permettant de fournir une partie de l'énergie nécessaire à son mouvement (ATP). On retrouve à ce niveau également neuf fibres denses externes accompagnant les doublets de microtubules sur leur partie externe. Ces fibres denses permettent notamment d'amplifier le mouvement généré par l'axonème (5). Cette partie se termine par un anneau fibreux dense appelé l'*annulus*.
- la pièce principale : à ce niveau, l'axonème est entouré d'une gaine fibreuse formée de stries fibreuses circonférentielles ancrées sur deux colonnes longitudinales permettant de rigidifier la structure. Cette gaine fibreuse contient des protéines qui fournissent la majorité de l'énergie nécessaire au mouvement de l'axonème (6). On ne retrouve, à ce niveau, plus que sept fibres denses externes. Ces fibres denses persisteront jusqu'aux deux-tiers du flagelle.
- La pièce terminale : on observe à ce niveau une disparition progressive des microtubules et de la gaine fibreuse. Il persistera essentiellement la membrane plasmique.

[Illustration sous droit]

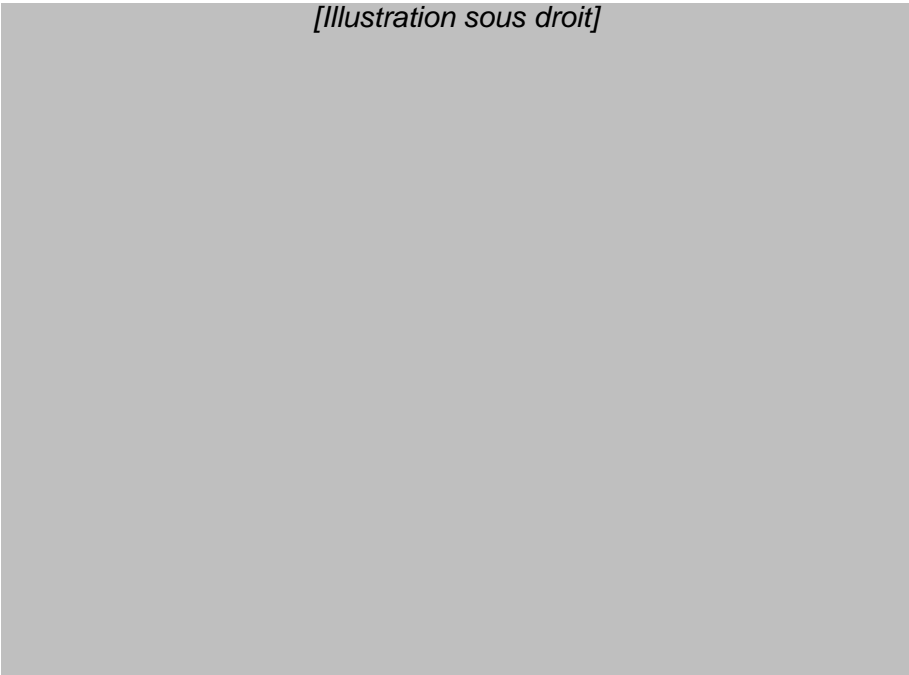


FIGURE 6. Coupes transversales et 3D du flagelle du spermatozoïde, sur 3 niveaux. D'après (7)

ii. Structure axonémale

L'axonème va se former à partir d'un des deux centrioles (corps basal), permettant l'initiation de la polymérisation des microtubules. L'axonème est constitué de 9 doublets de microtubules (microtubule A complet + microtubule B incomplet) reliés à une paire centrale de microtubules (2 microtubules complets) par des ponts radiaires. Cette organisation est dénommée « modèle 9+2 » (figure 5C).

Différentes structures et complexes protéiques sont répartis de manière régulière tous les 96 nm le long des doublets périphériques (8) : bras internes et externes de dynéines, ponts radiaires, liens de nexine – complexe de régulation des dynéines, et le complexe associé à la calmoduline et au pont radiaire (figure 7).

Les bras de dynéines, protéines motrices, sont ancrés sur le microtubule A. Ces bras viendront s'accrocher au microtubule B du doublet voisin afin d'initier le mouvement. On distingue des bras internes et externes de dynéines, situés respectivement du côté du doublet central et du côté de la membrane plasmique. Ces dynéines sont composées de nombreuses protéines formant des chaînes lourdes, intermédiaires et légères, dont l'assemblage varie entre les bras internes et externes. Les chaînes lourdes sont directement responsables de l'activité motrice, en permettant l'attachement et le détachement dans un mouvement de glissement du bras de dynéine au microtubule B. Les chaînes intermédiaires assurent la fixation des chaînes lourdes sur le microtubule A. Enfin, les chaînes légères interagissent avec les chaînes intermédiaires et jouent un rôle de régulation de l'activité des dynéines (9).

Les ponts radiaires (au nombre de 3 chez l'homme) relient les doublets périphériques au doublet central.

Les liens de nexine relient le microtubule A d'un premier doublet au microtubule B du doublet voisin. Les liens de nexine font partie du Complexe de Régulation des Dynéines (N-RDC), situé au niveau du deuxième pont radiaire. Ce complexe permet de

coordonner le mouvement des bras de dynéines et de relier chaque paire de microtubules (10).

L'activité des bras de dynéines serait régulée par des signaux mécaniques et enzymatiques provenant de la paire centrale de microtubules, via les ponts radiaires et le N-RDC (11).

[Illustration sous droit]

Figure 7. Organisation de l'unité fondamentale de 96 nm de l'axonème du flagelle du sperme d'oursin. Les bras de dynéine externes (en violet, ODA) composés de 2 chaînes lourdes (α et β) sont ancrés sur le microtubule A. Les 7 isoformes des bras internes de dynéine (IDA, rose) sont représentées ainsi que le complexe de régulation des dynéines (N-DRC, jaune) et 3 ponts radiaires (RS1-RS3, gris). Le complexe associé à la calmoduline et au pont radiaire n'est pas visible. D'après (12).

Cette structure axonémale est également retrouvée dans d'autres cellules ciliées de l'organisme. On distingue différents types de cils :

- Des cils « mobiles » avec un axonème de type « 9+2 » retrouvés au niveau trachéal, sinusal et des trompes de Fallope entre autres. C'est également le cas des spermatozoïdes.
- Des cils immobiles avec une structure axonémale « 9+0 », cils uniques « primaires » ou « sensoriels » par exemple au niveau rénal ou neuronal.
- Un cil embryonnaire mobile avec une structure « 9+0 », responsable de la latéralisation des organes durant la gastrulation (13).

La description de l'axonème a été en grande partie réalisée chez d'autres espèces car les gènes des flagelles et des cils sont extrêmement bien conservés au cours de l'évolution.

Plusieurs modèles d'étude sont reconnus, notamment (14):

- *Chlamydomonas reinhardtii* (Algue verte)
- *Mus musculus* (Souris)
- *Trypanosoma brucei* (protiste responsable de la maladie du sommeil)
- *Tetrahymena thermophila* (protozoaire)

Chez tous ces modèles, l'axonème se situe au centre du flagelle, sur toute sa longueur.

L'axonème serait composé d'environ 250 protéines, mais seules quelques dizaines d'entre elles sont aujourd'hui bien identifiées, en grande partie grâce à ces modèles (15).

Il a également été montré l'existence de grandes homologues de structure entre ces protéines et des orthologues dans le flagelle spermatique humain (9). Ceci a pu permettre l'avancée des connaissances du processus de spermatogénèse et de ce fait identifier de nouvelles causes à l'infertilité masculine.

B. Infertilité masculine

Il est admis que l'infertilité touche plus de 20 millions d'hommes à travers le monde. Cependant, la prévalence de cette affection reste difficile à estimer, que ce soit au niveau national ou mondial (16). Malgré certaines études contradictoires, la prévalence de l'infertilité masculine semble par ailleurs augmenter chaque année (17,18). Cette pathologie constitue de ce fait un véritable problème de santé publique (1). L'OMS a d'ailleurs reconnu l'infertilité comme la 5^{ème} pathologie la plus handicapante (World report on disability, WHO 2011)(19).

Au début des années 1990 a été mise en évidence une baisse de la fertilité dans les pays industrialisés, en évolution depuis une cinquantaine d'années (20). Le déclin des paramètres spermatiques porte principalement sur la baisse de la concentration de spermatozoïdes au sein d'un éjaculat. Il a également été noté une proportion plus importante d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes (21). Ces observations ont pu être confirmées en France par le biais du réseau national CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme) créé en 1993, qui suit régulièrement les paramètres du sperme des patients donneurs (22).

1. Les différents types d'infertilité

On distingue différentes anomalies spermatiques, soit quantitatives (l'azoospermie, caractérisée par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat, ou l'oligospermie, caractérisée par moins de 15 millions de spermatozoïdes par ml de sperme ou 39 millions par éjaculat), soit qualitatives. Parmi ces dernières, on décrit la tératozoospermie (malformation d'une ou plusieurs parties du spermatozoïde), l'asthénozoospermie (spermatozoïdes peu mobiles, voire immobiles) ou encore la nécrospermie (grande proportion de spermatozoïdes morts au sein de l'éjaculat). Souvent ces différentes anomalies sont associées, on parlera par exemple d'oligoasthénotératozoospermie (OATS).

La tératozoospermie a été définie par l'OMS en 2010 par moins de 4% de formes spermatiques typiques retrouvées dans l'éjaculat (Classification de Krüger) (23). Dans le groupe des tératozoospermies on distingue différents types, en fonction de la section morphologiquement anormale du spermatozoïde : tête/ pièce intermédiaire/ pièce principale (cf. figure 11, p.37).

Dans ce travail, je me suis intéressée à un phénotype particulier de tératozoospermie touchant uniquement le flagelle : le phénotype MMAF « Multiple Morphological

Abnormalities of the sperm Flagellum ». Ce phénotype a été décrit en 2014 par Ben Khelifa *et al.* Les spermatozoïdes présentent une mosaïque d'anomalies flagellaires (absence totale de flagelle, ou flagelle court et/ou enroulé et/ou de diamètre irrégulier).

2. Etiologies

a. Pathologie multifactorielle

Un rapport publié en 2012 de l'INSERM et de l'Agence de la Biomédecine (16) résume les principales causes de l'infertilité et de la baisse de qualité spermatique. L'élément primordial à noter est que cette pathologie est multifactorielle. Certains facteurs de risque/étiologies peuvent être associés chez un même individu. De nombreuses causes sont décrites ; nous distinguerons les causes non génétiques et les causes génétiques.

b. Causes non génétiques

Parmi les étiologies les mieux décrites, on note les causes urologiques (cryptorchidie, cancer, torsion testiculaire), les causes infectieuses (virales ou bactériennes) ou encore les causes endocriniennes. Les facteurs environnementaux par exposition à des toxiques (tabac, pesticides, perturbateurs endocriniens...) et comportementaux (augmentation de l'âge de procréation, surpoids/obésité ou au contraire malnutrition) sont certainement responsables d'une grande part de l'aggravation de l'infertilité ces dernières années, mais leurs effets sont encore pour certains mal caractérisés. Certains de ces facteurs environnementaux, notamment les perturbateurs endocriniens (24) pourraient entraîner des modifications épigénétiques (ex : méthylation de l'ADN, acétylation des histones, microARNs...), avec pour conséquence une modulation de l'expression des gènes, sans atteinte de la séquence nucléotidique. Des modifications épigénétiques sont retrouvées fréquemment dans les gamètes des hommes infertiles, et seraient la cause de la perturbation de la spermatogénèse (25). Si l'exposition à ces toxiques a lieu dès la vie

intra-utérine, les effets sont en général irréversibles (24). Ces modifications épigénétiques sont suspectées par ailleurs d'être responsables de nombreuses autres pathologies communes : cancers, maladies métaboliques, pathologies neurodégénératives, asthme...(26).

c. Causes génétiques de l'infertilité masculine

La composante génétique de l'infertilité est importante, puisqu'elle concernerait environ 1 homme sur 40 (27). Parmi les causes génétiques les plus fréquentes et les mieux décrites, il faut noter le syndrome de Klinefelter (47,XXY), les mutations dans le gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) et les microdélétions du chromosome Y. Ces trois étiologies expliquent environ 15% des infertilités génétiques (3). Les causes géniques sont quant à elles moins bien décrites, du fait du très grand nombre de gènes impliqués dans le processus de spermatogénèse, estimé entre 1000 et 2000 gènes (28). A l'heure actuelle seuls quelques gènes ont été formellement mis en cause dans l'infertilité masculine, et pour encore 50% des cas, aucune cause n'est identifiée (infertilité "idiopathique"). Le potentiel est donc important concernant la découverte de nouvelles causes géniques dans cette pathologie.

i. Anomalies chromosomiques

Des anomalies chromosomiques sont retrouvées chez 5 % des hommes infertiles et leur incidence atteint 15 % en cas d'azoospermie (29). Peschka *et al.*, ont identifié environ 13% d'aberrations chromosomiques dans une population infertile lors du bilan avant ICSI (30). Dans la majorité des cas il s'agit d'une anomalie des chromosomes sexuels. Les altérations de la structure des chromosomes autosomiques (translocations ou inversions) sont retrouvées dans des proportions moins importantes (31).

1. Anomalies des chromosomes sexuels

a. Syndrome de Klinefelter

Les hommes atteints d'un syndrome de Klinefelter présentent une formule chromosomique à 47 chromosomes, avec un chromosome X surnuméraire (47,XXY) (figure 8). Ce syndrome touche environ 1 homme sur 600 dans la population générale, et est dans la majorité des cas découvert fortuitement à l'occasion d'un bilan d'infertilité, seul signe constant. En effet, l'expressivité est variable, les symptômes les plus fréquemment observés étant une grande taille à l'âge adulte ou un hypogonadisme (association d'une gynécomastie, d'une micro-orchidie, d'un retard pubertaire et d'une faible pilosité). On peut parfois noter un retard dans les acquisitions, sans déficience intellectuelle cependant. Dans la majorité des cas ces hommes présentent une azoospermie (absence totale des spermatozoïdes dans l'éjaculat).

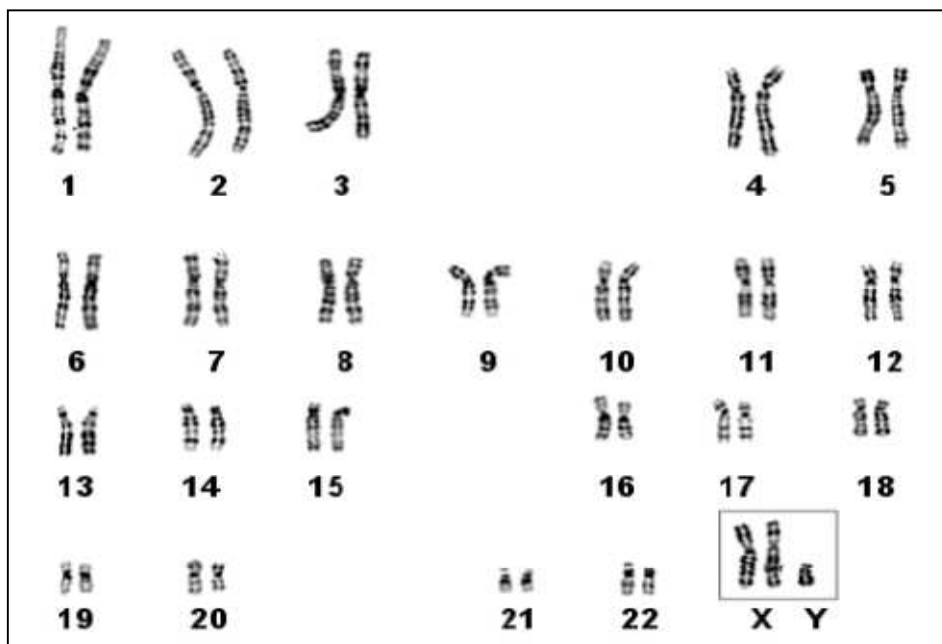


Figure 8. Caryotype d'un individu présentant un syndrome de Klinefelter, montrant un chromosome X surnuméraire

b. Autres anomalies des chromosomes sexuels

Elles sont plus anecdotiques. On citera uniquement les hommes 46,XX dont le gène *SRY*, situé sur le bras court du chromosome Y, est transloqué sur un autre chromosome. Ce phénomène peut se produire par exemple lors d'un crossing-over entre le chromosome X et Y dans les gamètes du père. Normalement, la recombinaison homologue entre ces deux chromosomes ne peut se faire qu'au niveau des régions PAR1 et PAR2, situées aux 2 extrémités des chromosomes sexuels (figure 9).

La différenciation masculine sera possible par la présence du gène *SRY*, mais la spermatogénèse sera impossible due à l'absence des régions AZF, fondamentales pour la gamétogénèse (voir chapitre micro-délétions du Y). Ces hommes seront donc totalement infertiles (azoospermie).

[Illustration sous droit]




Figure 9. Représentation schématique du chromosome Y, d'après (32).

2. Remaniements chromosomiques : translocations, inversions.

Les translocations, c'est-à-dire les échanges de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues, sont les remaniements chromosomiques les plus fréquemment observés dans la population infertile (8 fois plus fréquents chez les patients oligo et azoospermiques que dans la population générale) (33). Ces translocations sont pour la plupart équilibrées, c'est-à-dire sans perte de matériel génétique chez l'homme qui

en est porteur, et donc sans conséquences sur le développement de l'individu. Cependant ces remaniements sont connus pour provoquer une altération du processus de spermatogénèse (34).

On distingue les translocations réciproques (figure 10A) (échange de matériel entre 2 chromosomes non homologues) et les translocations Robertsoniennes qui impliquent les chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) avec fusion des bras longs de 2 chromosomes, et un nombre modal final de 45 chromosomes (figure 10B).

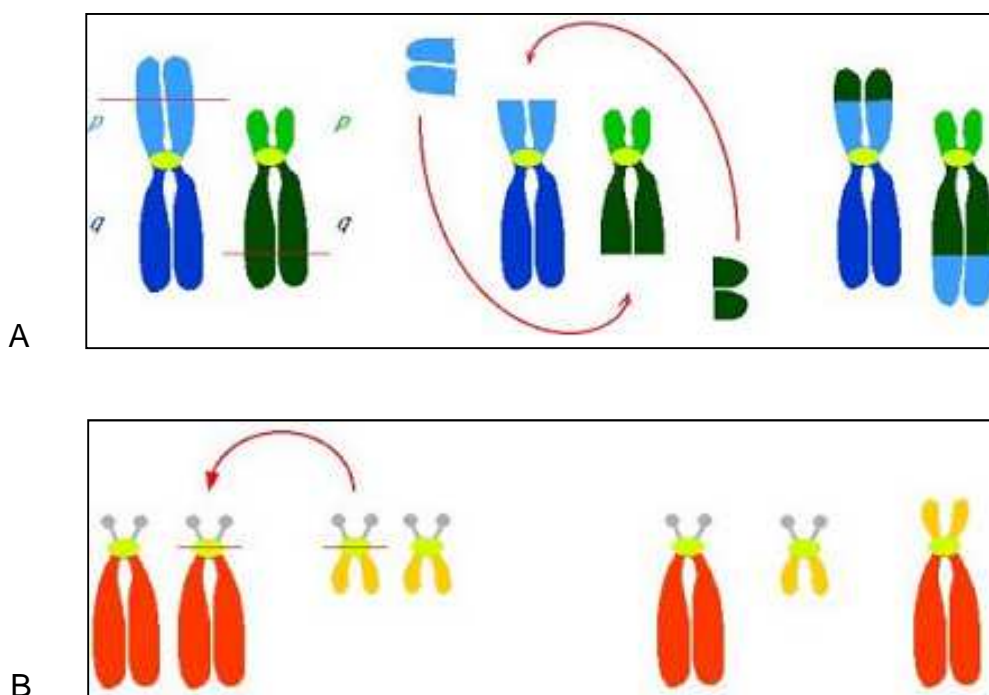


Figure 10. A. Représentation schématique du mécanisme de translocation réciproque B. Représentation schématique du mécanisme de translocation Robertsonienne

Au cours de la méiose, le contenu chromosomique est réparti équitablement entre les deux cellules filles. En cas de translocation équilibrée, il y a un risque d'erreur de ségrégation du matériel génétique. De manière théorique, les patients porteurs d'une translocation équilibrée vont produire une proportion plus importante de spermatozoïdes au contenu chromosomique déséquilibré, même si cette proportion est très variable suivant le type de translocation (33).

Chez les patients porteurs de translocations équilibrées, on retrouve le plus souvent une oligospermie, pouvant être expliquée par une élimination plus ou moins importante des gamètes au contenu chromosomique déséquilibré (31). La cellule peut en effet entrer en apoptose en cas de détection d'un contenu chromosomique anormal lors de la méiose.

Au-delà du risque d'infertilité chez le patient porteur, une fécondation avec un gamète déséquilibré expose au risque de fausse couche spontanée, ou à la naissance d'un enfant porteur de malformations.

ii. Anomalies moléculaires

1. Microdélétions du chromosome Y

Sur le bras long du chromosome Y sont situés des gènes fondamentaux pour la spermatogénèse (gènes de la région AZF, azoospermia Factor). La région AZF est constituée de 3 sous-régions : AZFa, AZFb, AZFc (figure 9). La perte de la région a et/ou b est en générale dramatique pour la spermatogénèse, avec pour conséquence une azoospermie. La délétion unique de la région AZFa entraîne la perte des cellules germinales et est responsable du syndrome « Sertoli Cells Only ». Celle de la région AZFb provoque un blocage de la spermatogénèse. La perte unique de la région AZFc est responsable de phénotypes divers, de l'azoospermie à l'oligospermie (35). C'est uniquement dans cette situation qu'il pourra être retrouvé des spermatozoïdes grâce à la technique TESE (extraction chirurgicale des spermatozoïdes) (36).

Ces délétions surviennent suite à une Recombinaison Homologue Non Allélique (NAHR) durant la méiose au niveau de séquences hautement répétées (ex : palindromes) présentes sur le chromosome Y (37).

Globalement, les microdélétions du chromosome Y sont retrouvées chez 10% des hommes avec une azoospermie non-obstructive et chez 5% des patients avec une oligozoospermie sévère (<5 millions de spermatozoïdes/ml) (38).

2. Mutations du gène CFTR

Le gène *CFTR* est muté à l'état homozygote dans la mucoviscidose. A ce jour, plus de 1200 mutations ont été identifiées dans ce gène, mais la mutation p.F508del est la plus fréquemment retrouvée (70%) (39). L'incidence en France est de 1/4500 nouveau-nés. Les patients atteints de cette pathologie présentent, en dehors des symptômes digestifs et pulmonaires qui font le pronostic de la maladie, une infertilité par agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD). On parle d'infertilité excrétoire, les spermatozoïdes étant normalement produits au niveau testiculaire. Une ABCD est aussi retrouvée chez 1% des hommes infertiles n'ayant aucun autre symptôme digestif ou pulmonaire (40). L'infertilité sera alors le seul symptôme retrouvé. Si on analyse le gène *CFTR* chez ces hommes, on retrouvera en général une mutation « majeure » à l'état hétérozygote (ex : p.F508del), associée à une mutation dite « mineure » (ex : R117H, allèle 5T).

3. Mutations dans des gènes impliqués au niveau de la spermatogénèse

Ces dernières années ont été marquées par une accélération de la découverte de nouveaux gènes dans l'infertilité masculine. Malgré ces avancées, en 2015, seulement une vingtaine était identifiée avec un niveau de preuve suffisant.

Le tableau 1 actualisé d'après (41) indique les gènes impliqués très probablement dans l'infertilité masculine.

Gènes	Phénotype	Méthode d'identification	Nombre de patients mutés	Références
PICK1	Tératozoospermie (Globozoospermie)	Gène Candidat	1 (Cas Familial)	Liu <i>et Al.</i> , 2010
ZBP1	Tératozoospermie (Globozoospermie)	Gène Candidat	15/381	Yatsenko <i>et Al.</i> , 2012
SPATA16	Tératozoospermie (Globozoospermie)	Cartographie par Homozygotie Séquençage	3 (Cas Familial) 1	Dam <i>et Al.</i> , 2007 Karaca <i>et Al.</i> , 2014
DPY19L2	Tératozoospermie (Globozoospermie)	Cartographie par Homozygotie Séquençage	15/20 dont 2 frères 14/18	Harbuz <i>et Al.</i> , 2011 Ghédir <i>et Al.</i> , 2016
AKAP4	Tératozoospermie (Flagelles)	Gène Candidat	1	Baccetti <i>et Al.</i> , 2005
DNAH1	Tératozoospermie (Flagelles)	Cartographie par Homozygotie	7/20 dont 3 frères	Benkhelifa <i>et Al.</i> , 2014
AURKC	Tératozoospermie (Macrozoospermie)	Cartographie par Homozygotie Séquençage	14/14 dont 2 frères 26/33	Dieterich <i>et Al.</i> , 2007 Ghédir <i>et Al.</i> , 2015
SLC26A8	Asthénozoospermie	Cartographie par Homozygotie	3/146	Rode <i>et Al.</i> , 2012
SEPT12	Asthénozoospermie	Gène Candidat	2/200	Kuo <i>et Al.</i> , 2012
GALNTL5	Asthénozoospermie	Gène Candidat	1/200	Takasaki <i>et Al.</i> , 2014

CATSPER1	Asthénozoospermie	Cartographie par Homozygotie	3 (Cas Familial)	Avenarius <i>et Al.</i> , 2009
SYCP3	Azoospermie	Gène Candidat	1/9	Miyamoto <i>et Al.</i> , 2003
SOHLH1	Azoospermie	Gène Candidat	3/96	Bacetti <i>et Al.</i> , 2005
KLHL10	Oligozoospermie Sévère	Gène Candidat	3/270	Yatsenko <i>et Al.</i> , 2006
NR5A1	Azoospermie	Gène Candidat Séquençage	7/325 7/398	Bashamboo <i>et Al.</i> , 2010 Ferlin <i>et Al.</i> , 2015
NANOS1	Azoospermie	Gène Candidat	3/195	Kusz-Zamelczyk <i>et Al.</i> 2013
TEX11	Azoospermie	Gène Candidat	7/289	Yatsenko <i>et Al.</i> , 2015
TAF4B	Azoospermie	Cartographie par Homozygotie	4 (Cas Familial)	Ayhan <i>et Al.</i> , 2014
ZMYND15	Azoospermie	Cartographie par Homozygotie	3 (Cas Familial)	Ayhan <i>et Al.</i> , 2014
HSF2	Azoospermie	NGS*	5/766	Mou <i>et Al.</i> , 2013
NPAS2	Azoospermie	NGS*	3 (Cas Familial)	Ramasamy <i>et Al.</i> , 2015
PLCZ1	Absence D'activation Ovocytaire	Gène Candidat NGS*	1/9 2 Frères	Kashir <i>et Al.</i> , 2012 Escoffier <i>et Al.</i> , 2016

*NGS = séquençage haut débit (Next Generation Sequencing)

Tableau 1 Récapitulatif des gènes identifiés dans l'infertilité masculine

d. Ciliopathies : notions

On appelle ciliopathies ou dyskinésies ciliaires primitives (DCP) des pathologies très hétérogènes d'un point de vue génétique mais dans lesquelles on répertorie systématiquement une atteinte des cellules ciliées. La transmission est majoritairement autosomique récessive (42) et l'incidence (probablement sous-estimée) d'au moins 1/15000 naissances (43,44). Une trentaine de gènes ont été décrits mutés dans cette pathologie (45). Le plus connu est le syndrome de Kartagener, qui se traduit par une atteinte du tractus respiratoire (bronchorrhée chronique, bronchectasies, sinusites chroniques), un *situs inversus*, et également une infertilité.

L'infertilité masculine est fréquemment retrouvée dans les tableaux de ciliopathies. Cela s'explique par le fait que les cils partagent de nombreuses protéines avec les flagelles des spermatozoïdes (46). Cependant, infertilité et PCD ne sont pas systématiquement associées, certains patients pouvant présenter une infertilité isolée, ou bien une ciliopathie sans infertilité. Certains gènes codent pour des protéines spécifiques des cils ou des flagelles, tandis que d'autres protéines auront un rôle à la fois dans la ciliogénèse et la spermatogénèse, expliquant ainsi la variabilité des tableaux cliniques observés (14).

3. Exploration médicale de l'infertilité

a. Stratégie générale

Après un interrogatoire, un examen clinique et au minimum un spermogramme/spermocytogramme, des examens complémentaires seront décidés selon les recommandations de l'Association Française d'Urologie (47) :

- Bilan endocrinien en cas d'oligospermie, de dysfonction sexuelle ou d'endocrinopathie.
- Echographie prostatique en cas d'azoospermie excrétoire ou de faible volume éjaculé.
- Caryotype et recherche de microdélétions du chromosome Y devant une azoospermie excrétoire ou une oligospermie sévère avant ICSI.
- Dosage des marqueurs séminaux (ex : α glucosidase) et recherche des mutations du gène CFTR en cas d'ABCD.

b. Spermogramme avec spermocytogramme

Ce sont les deux examens de base du bilan masculin en cas d'exploration d'une infertilité dans un couple. En cas d'anomalie sur un premier spermogramme, cet examen doit être reproduit à trois mois d'intervalle du fait de la variabilité des résultats dans le temps chez un même patient (23,47). Plusieurs paramètres vont être analysés, répertoriés dans le tableau ci-dessous :

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10^6 per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR+NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)

Tableau 2. Valeurs seuils des paramètres spermatiques (WHO, 5eme édition)

Le spermocytogramme s'attache à évaluer la forme et à déterminer les anomalies morphologiques gamétiques (figure 11).

[Illustration sous droit]

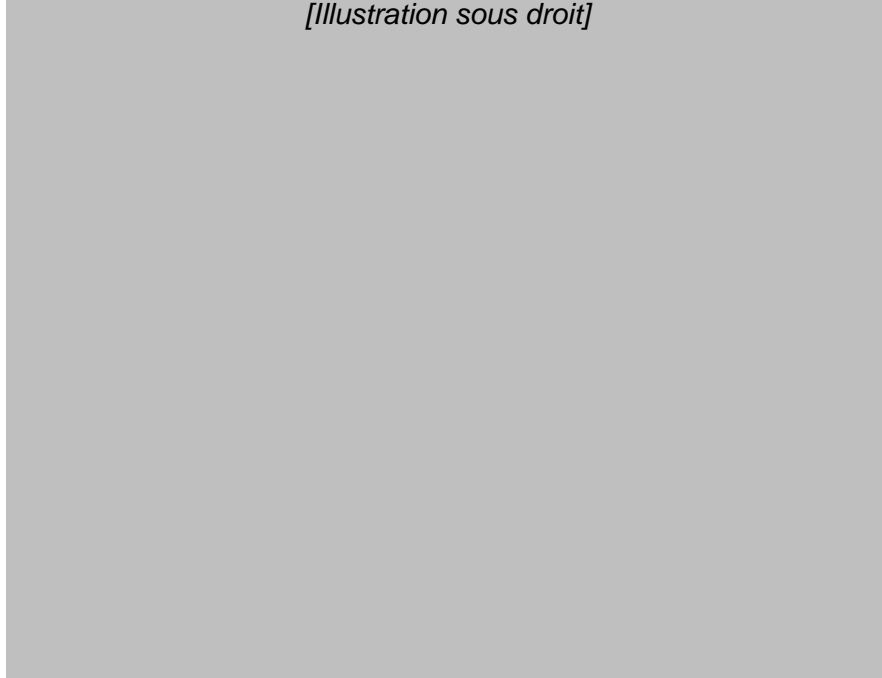


Figure 11. Les différentes anomalies morphologiques spermatiques, d'après Kruger *et al*, 1993

c. Explorations génétiques

i. Caryotype

Un caryotype est prescrit devant toute oligospermie < 10 Millions, et pour les azoospermies non obstructives. Dans la figure 12 sont exposées les différentes anomalies pouvant être retrouvées sur un caryotype, avec la prise en charge spécifique.

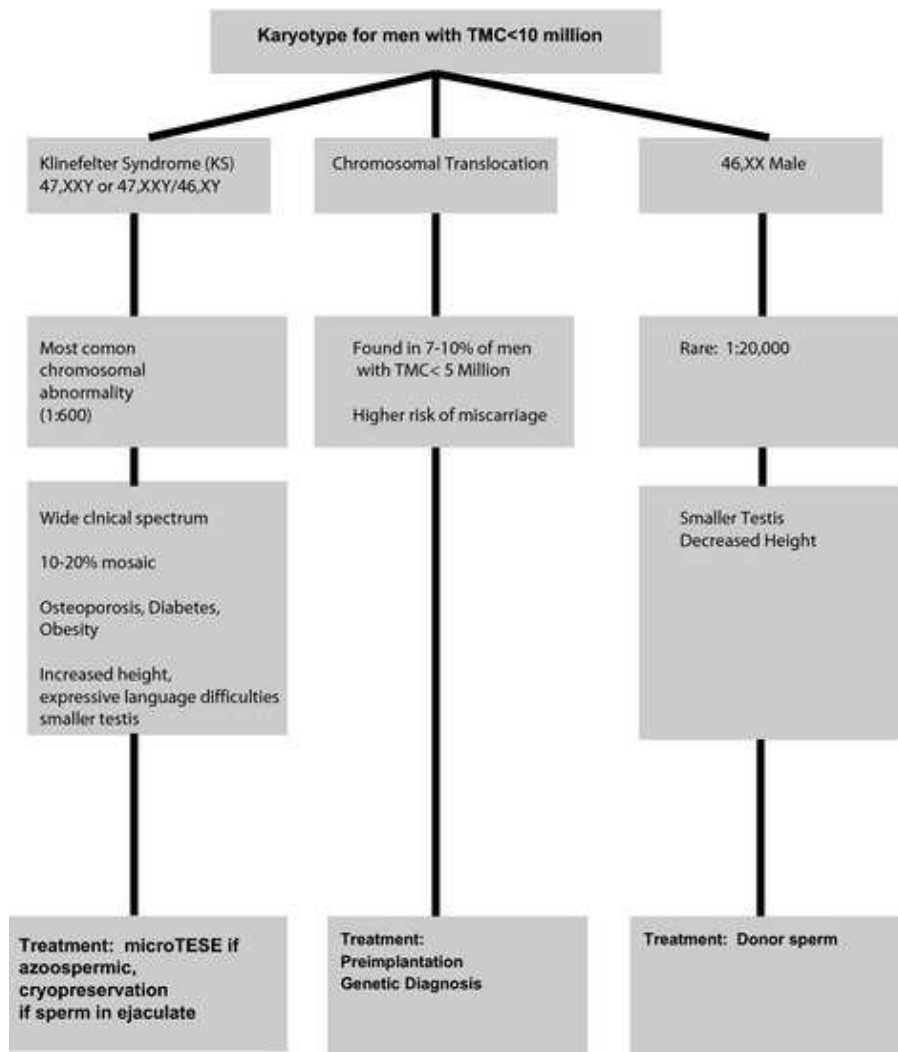


Figure 12. Prise en charge en cas de caryotype anormal chez l'homme oligospermique. D'après (38).

ii. FISH (Hybridation *In Situ* Fluorescente) sur spermatozoïdes

Il faut distinguer deux cas de figure.

Tout d'abord, la technique de FISH sur spermatozoïdes peut être employée afin d'évaluer le taux d'aneuploïdie et de diploïdie gamétique chez des patients présentant un phénotype spermatique très altéré. Pour cela, on utilisera principalement des sondes marquant les chromosomes 13, 18, 21 et les chromosomes sexuels (figure 13).

Dès les années 1990, il a été recommandé de rechercher les aneuploïdies chez les patients présentant une oligoasthénozoospermie (48). En effet, ces hommes semblent

présenter un taux plus important d'aneuploïdies spermatiques (49). Il semble toutefois que la morphologie des spermatozoïdes ne soit pas un bon indicateur de contenu chromosomique (50). Plusieurs études rapportent ainsi que le contenu euploïde (c'est-à-dire « normal » d'un point de vue du contenu chromosomique) du spermatozoïde n'est pas toujours corrélé à une morphologie gamétique typique (51). De plus, il a été observé une grande variabilité interindividuelle des taux d'aneuploïdies chez des patients présentant une même forme de tératozoospermie (52). La FISH sur spermatozoïdes peut se discuter en bilan pré-ICSI chez certains hommes infertiles afin de vérifier le taux de déséquilibre et d'évaluer le risque d'une fausse couche ou la naissance d'un enfant porteur de malformations sévères (50,53).

Le deuxième cas de figure concerne les patients porteurs de translocations réciproques. La FISH sera alors réalisée avec des sondes spécifiques du remaniement chromosomique. Ceci permet d'étudier la proportion de gamètes équilibrés, les taux étant très variables d'une translocation à une autre (33).

A noter qu'en cas de translocation Robertsonienne, la FISH sur spermatozoïdes n'est pas recommandée. Chez ces patients, la proportion de gamètes équilibrés est toujours plus importante que la proportion de gamètes déséquilibrés, et les taux sont relativement similaires entre les patients (54).

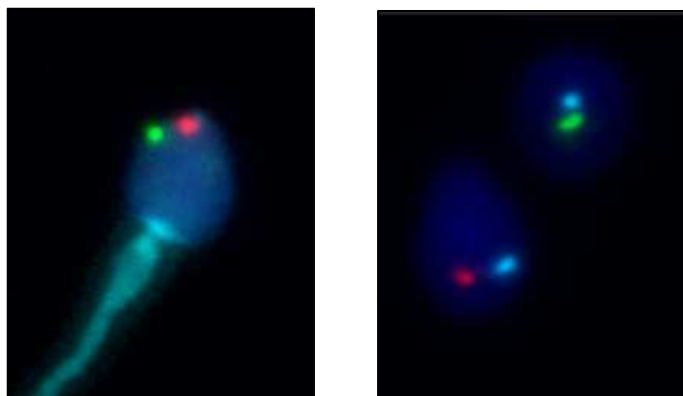


FIGURE 13 : FISH SUR SPERMATOZOÏDES.

A GAUCHE : chromosome 13 (13Q14.2) (vert), chromosome 21 (21Q22.13) (rouge)

A DROITE : centromère Xp11.1-q11.1 (vert), centromère Yp11.1-q11.1 (Orange), centromère 18p11.1-q11.1 (Bleu)

iii. Analyses moléculaires

Les analyses moléculaires à prioriser seront orientées par le phénotype spermatique observé chez le patient. En cas d'ABCD, la recherche de mutations dans le gène CFTR sera réalisée. En cas d'azoospermie ou oligospermie sévère, on recherchera en priorité les microdélétions du chromosome Y. Chez les patients avec des spermatozoïdes macrocéphales, il est recommandé de séquencer le gène *AURKC* retrouvé muté chez 50.8 à 100% de ces patients (4,55). Pour les patients globozoocéphales, l'étude en première intention du gène *DPY19L2* a montré son intérêt depuis la mise en évidence des altérations de ce gène (délétion génomique et mutations ponctuelles) chez 60 à 83.3% des patients globozoospermiques (4,56,57).

Chez les patients dont toutes les explorations génétiques systématiques se seront avérées infructueuses, des perspectives existent aujourd'hui grâce à la mise en évidence régulière de nouveaux gènes et l'arrivée du séquençage nouvelle génération dans les laboratoires. Ainsi la constitution et l'étude simultanée de panels de gènes candidats (éventuellement spécifiques de chaque phénotype d'infertilité) permettra d'augmenter le pouvoir diagnostique de routine dans les années à venir.

4. Prise en charge médicale de l'infertilité masculine

a. Techniques de PMA

En cas d'infertilité masculine due à une azoospermie ou oligoasthénotéatozoospermie, la technique de choix est la FIV (Fécondation *In Vitro*) assistée par micro-injection (ICSI). La technique d'ICSI est utilisée depuis 1992 (58) et consiste à injecter directement dans le cytoplasme de l'ovocyte un spermatozoïde, ce qui permet de s'affranchir des paramètres de nombre et de mobilité spermatique.

La sélection du spermatozoïde qui sera injecté est faite sur la taille, la forme et la mobilité du spermatozoïde, et à défaut, sa vitalité. Si ces caractéristiques ont effectivement une

valeur pronostique, elles ne peuvent bien sûr garantir que le spermatozoïde sélectionné soit indemne d'aneuploïdies ou de mutations géniques.

b. Efficacité de la technique

En 2013, 40000 ICSI ont été pratiquées en France, pour 8747 naissances, soit environ 20% de réussite (naissances vivantes) (59). Cependant on note des taux de réussite très disparates en fonction des couples. Ces variabilités sont en partie expliquées par les différents phénotypes d'infertilité masculine (60–62).

c. Risques sur le développement embryonnaire

Plusieurs études recommandent d'être vigilant quant aux risques génétiques et épigénétiques éventuels secondaires à ces ICSI, du fait de l'utilisation de spermatozoïdes issus d'une spermatogénèse déficiente (63,64). On distingue différents risques :

- Risques liés à la FIV/ICSI en elle-même (65,66)
- Risques liés à la transmission de l'infertilité
- Risque d'apparition d'une pathologie secondaire au défaut génétique du père, autre que l'infertilité. En effet, pour certains phénotypes d'infertilité comme par exemple le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales avec des mutations dans le gène *AURKC*, 100% des spermatozoïdes présentent un contenu tétraploïde, contre-indiquant formellement une FIV avec ces spermatozoïdes en raison du risque d'aneuploïdie chez l'embryon (67). Ceci démontre l'intérêt d'étudier les effets d'une mutation sur le risque d'aneuploïdie.

L'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans l'infertilité paternelle permettront d'affiner le conseil génétique chez ces couples en déterminant si le futur

enfant peut présenter le risque de développer d'autres pathologies en lien avec l'anomalie génétique paternelle et le défaut spermatique.

C. Nouvelles approches pour l'identification des gènes impliqués dans l'infertilité : exemples.

1. Cartographie par homozygotie : exemple de la découverte du gène *DNAH1*

Une étude publiée en 2014 (68) a été le point de départ de ce travail de thèse. Dans cette étude, une cohorte de patients infertiles ayant un phénotype spermatique MMAF a été analysée par cartographie par homozygotie (figure 14). Parmi ces patients, une large proportion était issue d'union consanguine suggérant un mode de transmission autosomique récessive du trait pathologique responsable de l'infertilité.

Dans les pathologies autosomiques récessives, l'utilisation de l'approche par cartographie d'homozygotie permet d'identifier des régions homozygotes communes à plusieurs patients et de localiser des gènes d'intérêt pouvant contenir la mutation responsable.

Cette approche repose sur l'analyse globale des polymorphismes du génome avec des puces à ADN de type SNP (Single Nucléotide Polymorphisms). Les régions d'homozygotie ainsi définies sont généralement d'une taille supérieure à 10Mb. Certains gènes présents dans cette région seront ensuite sélectionnés comme candidats potentiels puis seront étudiés plus en détail par séquençage Sanger afin de déterminer s'il peut exister un lien de causalité avec l'infertilité du patient.

L'implication du gène *DNAH1* a donc pu être mise en évidence chez environ 28% des patients de la cohorte grâce à cette technique. Néanmoins, la cause génétique de plus des deux tiers des patients restait inexplicée, nous conduisant à mener une nouvelle étude par séquençage exomique afin d'identifier d'autres gènes potentiellement impliqués dans l'infertilité de notre cohorte.

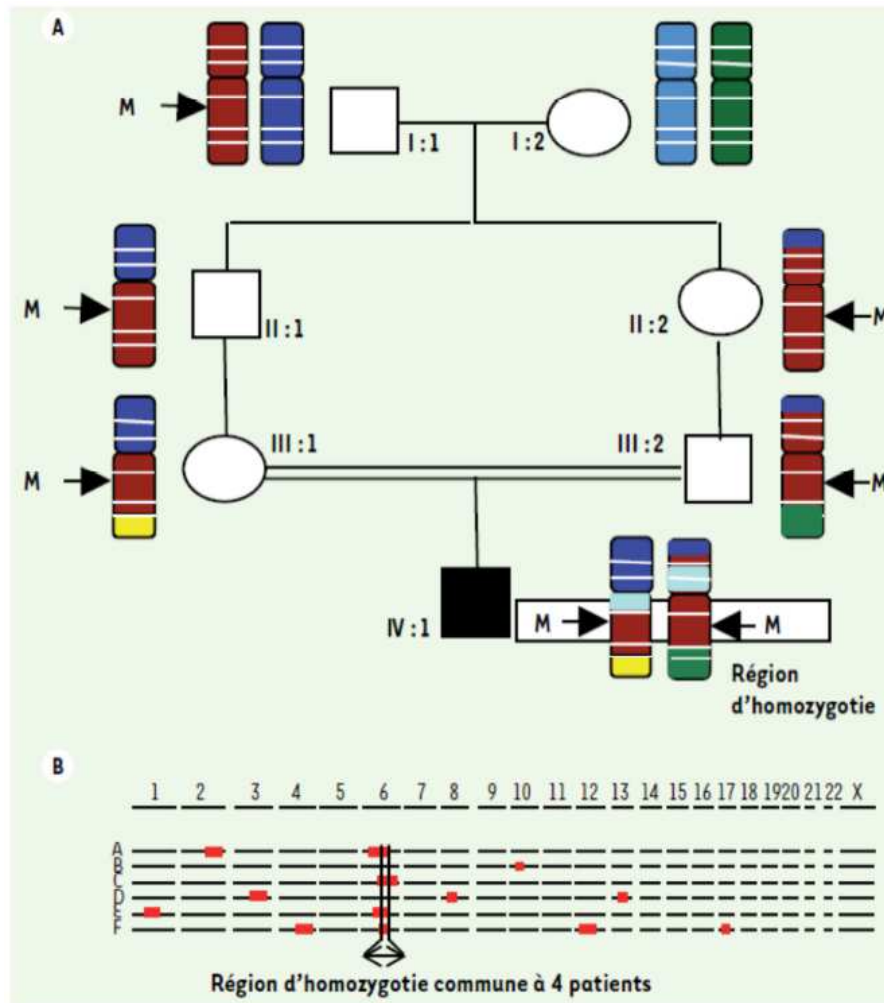


Figure 14. Stratégie de localisation d'un gène pathogène par cartographie d'homozygotie. Pour les patients atteints d'une maladie génétique rare dont les parents sont apparentés (cousins au 1er ou au 2ème degré), on postule que la pathologie ségrège sur un mode autosomique récessif et que les patients ont hérité de deux copies d'une même mutation familiale. Pour simplifier on ne représente ici qu'un seul des 23 chromosomes, porteur de la mutation d'intérêt. L'arrière-grand-père (I:1) du patient (IV:1) est porteur d'une seule copie de la mutation M. La mutation est transmise à l'état hétérozygote à ses enfants et à ses petits-enfants avant d'être héritée à l'état homozygote par IV:1. Des recombinaisons entre chromosomes homologues se produisent à chaque méiose, contribuant à la diversité génétique. Deux copies d'une même région chromosomique, plus ou moins grande et entourant la mutation, sont héritées par le patient IV:1. Cette région, dépourvue des variations génétiques normalement présentes entre chromosomes homologues est appelée « région d'homozygotie ». B. Une analyse sur « puces à ADN » de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) permet d'analyser des variants génétiques répartis sur tout le génome et de repérer les régions d'homozygotie. Cette analyse est réalisée sur plusieurs patients (A-F) présentant le même phénotype et issus d'une union consanguine. La présence d'une région d'homozygotie commune à plusieurs patients peut indiquer que la mutation causale se trouve dans cette région. Une étude *in silico* des gènes se trouvant dans la plus petite région d'homozygotie commune est réalisée. Si un gène, de par sa fonction et son profil d'expression paraît être un bon candidat, il sera séquencé chez tous les patients. Si une mutation ayant un effet délétère sur la protéine est identifiée chez plusieurs patients, on conclue que ce gène est impliqué dans la genèse des symptômes. D'après Coutton *et al.*, 2012 (69).

2. Séquençage haut débit

La stratégie d'identification des gènes dans l'infertilité utilisée dans mon travail de thèse a reposé sur le Séquençage haut débit ou NGS (Next Generation Sequencing). Le séquençage haut débit est une technique récente permettant de réaliser l'étude simultanée de milliers de séquences et donc de rechercher des mutations à l'échelle d'un panel de gènes, de l'exome (c'est-à-dire toutes les parties codantes du génome) ou du génome entier (introns + exons). Son principe est schématiquement résumé dans les figures 15 et 16.

Après s'être assuré de la qualité du séquençage selon différents paramètres (ex : score de Phred, couverture, profondeur de lecture), l'analyse bio-informatique au moyen de différents algorithmes permettra secondairement de détecter les possibles mutations causales parmi les milliers de variants détectés.

La principale difficulté est aujourd'hui de valider par la suite les mutations identifiées dans les gènes candidats afin de confirmer le lien entre l'anomalie et le phénotype. Trop d'études mettent en évidence des variants chez des hommes infertiles sans apporter la preuve formelle de la pathogénicité de ce dernier (70). Premièrement, il est nécessaire de confirmer les variants retenus avec une étude familiale : absence du variant chez les membres non atteints, présence chez les membres ayant le même phénotype. Par la suite l'étude de l'impact du variant sur l'expression du gène (RT-qPCR) ou la protéine (Immunofluorescence, Western blot) sont des bons critères de pathogénicité. Enfin, outre ces stratégies moléculaires, l'utilisation de modèles animaux ou cellulaires se révèle être un excellent moyen pour confirmer le lien de causalité du variant avec le phénotype observé, comme cela a été réalisé dans le second article de cette thèse.

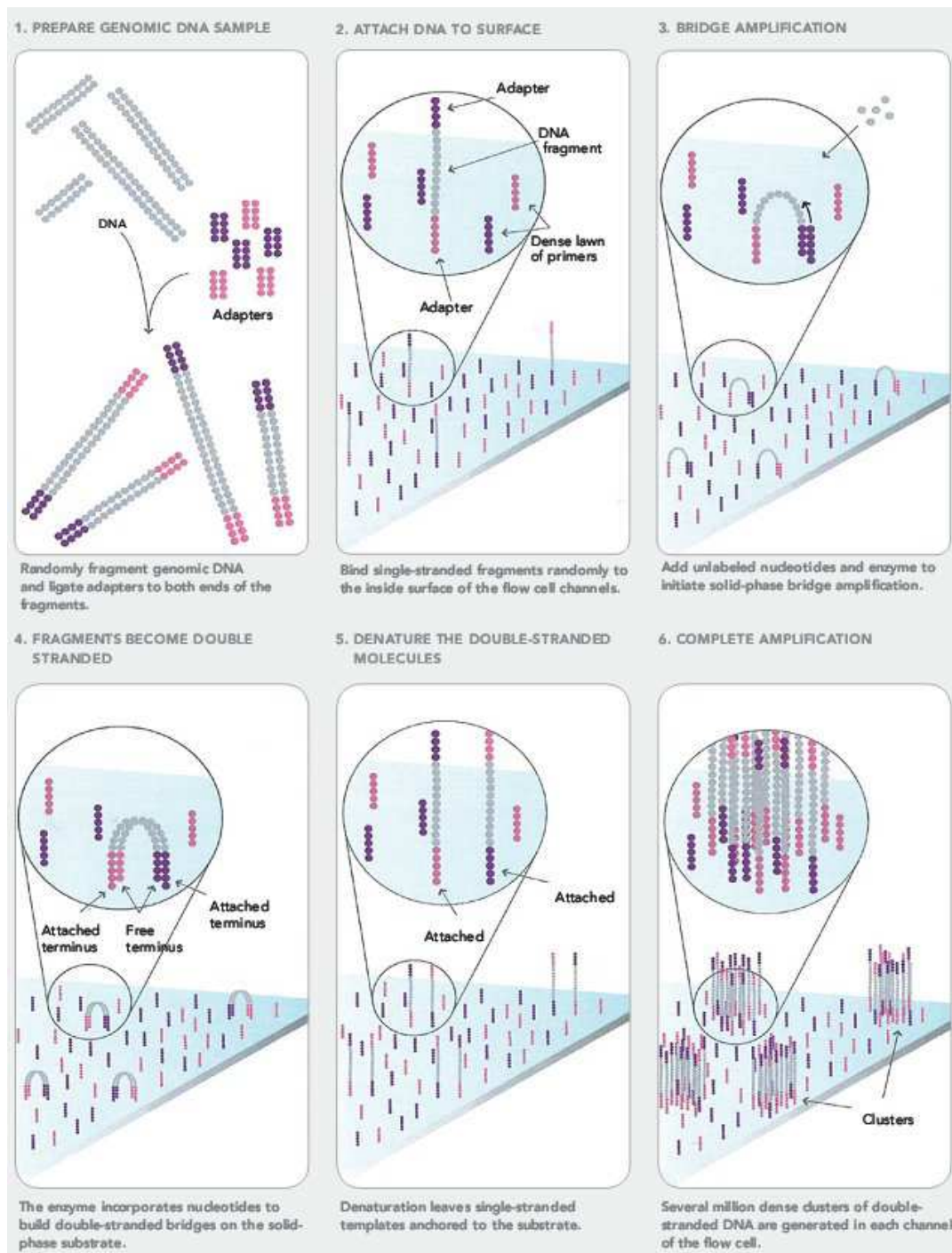


FIGURE 15 PRINCIPE SCHEMATIQUE DE LA TECHNOLOGIE NGS ILLUMINA®

1. Digestion de l'ADN du patient jusqu'à obtenir des millions de fragments de taille uniforme. Fixation de ligands et d'adaptateurs sur ces fragments afin de constituer une « librairie ». Cette librairie peut être représentative du génome entier, ou alors seulement des exons (exome), ou bien d'un panel de gènes variable en fonction de la pathologie utilisée. Pour les 2 derniers cas, on passera alors par des étapes d'enrichissement permettant d'augmenter la concentration en séquences d'intérêt dans l'échantillon.

2. Les fragments vont pouvoir s'attacher à une surface (billes pour la technique de PCR en émulsion ou sur plaque pour la bridge-PCR, comme ici) grâce à ces adaptateurs.

3. 4. 5. 6. Une fois la librairie constituée, une étape d'amplification clonale va permettre d'amplifier de manière spécifique chacun des fragments à séquencer. Différentes méthodes existent pour réaliser cette amplification clonale comme la PCR en émulsion ou la bridge-PCR

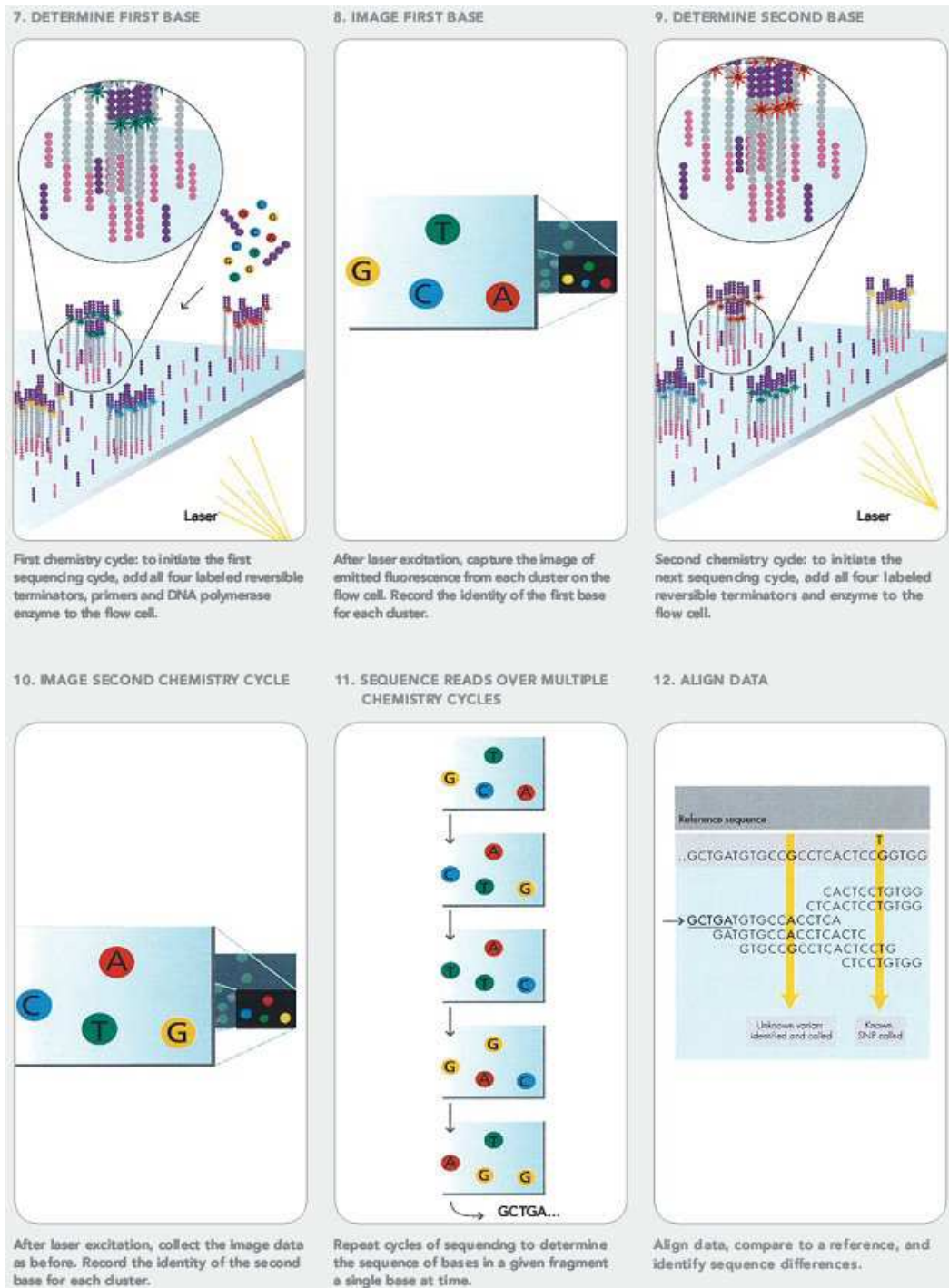


Figure 16. Principe schématique de la technologie NGS ILLUMINA® suite

7. Ajout dans le milieu de nucléotides marqués (Adénine en rouge, Thymidine en vert, Cytosine en bleu et guanine en jaune), d'amorces et l'ADN Polymérase. Incorporation de la première base. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation.
8. Lecture simultanée de la fluorescence émise par chaque cluster, spécifique du nucléotide incorporé.
9. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante.
10. Lecture de la fluorescence.
11. Répétition autant de fois que nécessaire des étapes précédentes (en général, séquences d'environ 200 nucléotides).
12. Reconstruction de chaque séquence nucléotidique par cluster, puis alignement des séquences trouvées sur le génome de référence.

ARTICLE 1

PATIENTS WITH MULTIPLE MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE SPERM FLAGELLA (MMAF) DUE TO *DNAH1* MUTATIONS HAVE A GOOD PROGNOSIS FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

A. Contexte et Objectifs

Plusieurs études ont rapporté un taux important d'aneuploïdie ainsi qu'une mauvaise qualité nucléaire chez les patients ayant des anomalies spermatiques flagellaires. Certaines de ces études suggéraient de plus un mauvais taux de réussite en ICSI chez les patients MMAF (52,60–62).

Un couple sur deux pris en charge en PMA restera à terme sans enfant. En plus de ce taux d'échec important, s'ajoute le coût élevé de cette prise en charge et une morbidité parfois importante (traitements de stimulation ovarienne, complications de la ponction, etc.) (71).

Une meilleure optimisation des indications de la prise en charge par PMA de ces couples pourrait donc être intéressante. Ainsi, l'étude systématique du pronostic de l'ICSI chez les patients en fonction du phénotype voire du génotype d'infertilité permettrait dans certains cas d'orienter plus rapidement les couples vers d'autres solutions (adoption, don de spermatozoïdes).

Dans ce contexte, mon premier objectif de thèse a été d'évaluer par FISH le taux d'aneuploïdie et la qualité chromatinienne dans une population d'hommes infertiles avec phénotype MMAF ayant une mutation homozygote dans le gène *DNAH1*, ainsi que d'analyser rétrospectivement les données d'ICSI de ces patients. Le gène *DNAH1* a été caractérisé en 2014 par notre équipe (68). Des mutations homozygotes ont été identifiées chez 7 individus (dont 3 frères) dans une cohorte initiale de 20 individus MMAF (28%).

B. Article original

Soumis le 26 novembre 2015 dans Human Reproduction (Impact factor : 4.569).

Révisions soumises le 18/02/2016.

Article accepté le 18 Mars 2016.

Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) due to *DNAH1* mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Running title: Good ICSI prognosis for MMAF patients with *DNAH1* mutations.

Clémentine Wambergue^{1,2,3,†}, Raoudha Zouari^{4,†}, Selima Fourati Ben Mustapha⁴, Guillaume Martinez^{1,2,5}, Françoise Devillard³, Sylviane Hennebicq^{1,2,5}, Véronique Satre^{1,2,3}, Sophie Brouillet^{1,5}, Lazhar Halouani⁴, Ouafi Marrakchi⁴, Mounir Makni⁴, Habib Latrous⁴, Mahmoud Kharouf⁴, Florence Amblard³, Christophe Arnoult^{1,2}, Pierre F. Ray^{1,2,3,†} and Charles Coutton^{1,2,3,†}

† The authors should be regarded as joint first and last authors respectively.

¹Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France

²Equipe "Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility", Institut Albert Bonniot (IAB), INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Grenoble, F-38000, France

³CHU de Grenoble, UF de Génétique Chromosomique, Grenoble, F-38000, France

⁴Polyclinique les Jasmins, Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Centre Urbain Nord, 1003 Tunis, Tunisia

⁵CHU de Grenoble, UF de Biologie de la procréation, Grenoble, F-38000, France

⁶CHU de Grenoble, UF de Biochimie Génétique et Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

* **Corresponding author:** Pierre F Ray, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble cedex 9, France. Tel: +33-4-76-76-55-73; E-mail: pray@chu-grenoble.fr

STUDY QUESTION: Does *DNAH1* status influence intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes for patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF)?

SUMMARY ANSWER: Despite a highly abnormal morphology, sperm from MMAF patients with *DNAH1* mutations combine a low aneuploidy rate and a good nuclear quality leading to a good embryonic development following ICSI and a high pregnancy rate.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Teratozoospermia represents a heterogeneous group including a wide range of phenotypes. Among all these qualitative defects, a flagellar phenotype called MMAF is characterized by a mosaic of morphological abnormalities of the flagellum including coiled, bent, irregular, short or/and absent flagella mainly due to the absence of the axonemal central pair microtubules. We previously demonstrated that homozygous mutations in the *DNAH1* gene, encoding an inner arm heavy chain dynein, are frequently found in patients with MMAF (28 % of the patients from the initial cohort). Numerous studies reported an increased rate of aneuploidy and a poor sperm nuclear quality related to sperm flagellar abnormalities which could impede ICSI outcome. Moreover, ICSI success' rate may be influenced by the type of ultrastructural flagellar defects and/or by the gene defects carried by the patients.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Cohort study, retrospective, six infertile male with MMAF due to deleterious homozygous *DNAH1* mutations and their respective spouses, 9 ICSI cycles, 17 embryo transfers. ICSI results were compared with two control populations of 13 non-mutated *DNAH1* MMAF men and an aged-matched control group of 1431 non-MMAF couples. All ICSI attempts took place between 2000 and 2012.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Clinical and biologic data were collected from patients treated for infertility at the CPSR les Jasmins in Tunis (Tunisia). We compared the ICSI outcomes obtained with *DNAH1* mutated and non-mutated patients and non-MMAF couples. For the analysis of the chromosomal status,

fluorescence in-situ hybridization (FISH) analyses were performed on sperm cells from three *DNAH1*-mutated patients and 29 fertile control subjects. Sperm chromatin condensation and DNA fragmentation were evaluated using aniline blue staining and TUNEL assay respectively on sperm cells from three *DNAH1*-mutated men and six fertile controls.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: There was a significantly increased proportion of disomy XY and 18 in sperm from *DNAH1* mutated patients compared with fertile controls (1.52% vs 0.28%, $P=0.0001$ and 0.64% vs 0.09%, $P=0.0001$). However, there were no statistically significant differences among the two groups in the frequencies of either 13, 21, XX or YY disomy and diploidy. Measures of DNA compaction and fragmentation demonstrated a good nuclear sperm quality. The overall fertilization, pregnancy and delivery rates of *DNAH1* mutated men were of 70.8, 50 and 37.5 % respectively. There were no statistically significant differences in any parameters with the two control groups ($P>0.05$).

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: A limitation of this study is the small number of *DNAH1*-mutated patients available and the low number of genes identified in MMAF. Further genetic studies are warranted to identify other MMAF inducing genes to better characterize the genetic etiology of the MMAF phenotype and to improve the management of patients diagnosed with flagellar defects.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: MMAF patients with *DNAH1* mutations combine low aneuploidy rates and a good nuclear sperm quality explaining the good pregnancy rate obtained with these patients. Good ICSI results were obtained for both MMAF groups (*DNAH1* mutated and non-mutated) suggesting that patients presenting with asthenozoospermia due to flagellar defects have a good ICSI prognosis irrespectively of their genotype. The majority of MMAF patients currently remains idiopathic with no genetic cause yet identified. In depth genetic analysis of these patients using next

generation sequencing should reveal new causal genes. Subsequent genotype phenotype analyses could improve advice and care provided to MMAF patients.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): None of the authors have any competing interest. This work is part of the project 'Identification and Characterization of Genes Involved in Infertility (ICG2I)' funded by the program GENOPAT 2009 from the French Research Agency (ANR) and the MAS-Flagella project financed by the French ANR and the Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS).

KEYWORDS: Male infertility, genetics, teratozoospermia, flagellum, MMAF, *DNAH1*, ICSI, FISH.

Introduction

Teratozoospermia is a semen defect defined by the World Health Organization as the presence in the ejaculate of over 96% of morphologically abnormal spermatozoa (WHO, 2010). Teratozoospermia represents a heterogeneous group including a wide range of phenotypes affecting solely or simultaneously spermatozoa's head, neck, midpiece or tail. Among all these qualitative defects, a flagellar phenotype called Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella (MMAF) has been described (Ben Khelifa *et al.*, 2014). This phenotype, previously reported as dysplasia of the fibrous sheath or short/stump tail syndromes, is characterized by a mosaic of morphological abnormalities of the flagellum including coiled, bent, irregular, short or/and absent flagella due to numerous ultrastructural defects of the axoneme and fibrous sheath (Chemes and Rawe, 2003; Coutton *et al.*, 2015). Mammalian sperm flagella are composed of a central structure called the axoneme surrounded by the mitochondrial sheath (only in the midpiece), the fibrous sheath and the outer dense fibers (Fig. 1). The axoneme is composed of an intricate network of microtubules (nine peripheral microtubule doublets and a central pair (CP)), radial spokes, dynein arms and several other compounds. On each microtubule doublet, inner and outer dynein arms are fixed producing the flagella beating force and therefore the motility of the spermatozoa. Recently, in a cohort of 18 unrelated MMAF patients, a homozygous frameshift mutation in *DNAH1* was found in 5 cases (28%) (Ben Khelifa *et al.*, 2014). *DNAH1* is a gene coding for an inner dynein arm heavy chain which is believed to reinforce the link between the radial spokes and the outer doublet (Fig. 1). The radial spokes are believed to be involved in the positioning/stabilization of the central doublets. When *DNAH1* is absent or dysfunctional, the axoneme is grossly disorganized, often with a "9+0" structure (Ben Khelifa *et al.*, 2014). Such central pair defects (9+0 structure) have previously been described as the most frequent ultrastructural abnormalities observed in genetically uncharacterized MMAF patients (Chemes and Rawe, 2003).

Numerous studies reported an increased rate of aneuploidy and a poor sperm nuclear quality related to sperm flagellar abnormalities (Coutton *et al.*, 2015) which could impede intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. *DNAH1* mutations have been identified in 28% of the patients analyzed indicating that many yet unreported genes are likely to be involved in this phenotype. ICSI success' rate may be influenced by the type of ultrastructural flagellar defects and/or by the gene defects carried by the patients (Mitchell *et al.*, 2006; Fauque *et al.*, 2009) and we can wonder if *DNAH1* mutated men have a better or worse prognostic than other MMAF patients or other infertile men. The aim of this study is thus to evaluate the aneuploidy rate in sperms from patients harboring a mutation in the *DNAH1* gene and to assess the levels of sperm DNA fragmentation and nuclear condensation. We also present the ICSI outcomes for 6 couples with spermatozoa from *DNAH1* mutated male and compare it with *DNAH1* non-mutated patients and an age-matched control group. This study provides novel information related to the predicted ICSI's success rate of MMAF patients due to *DNAH1* mutation.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

We compared the ICSI outcomes obtained with *DNAH1* mutated and non-mutated men and with an age-matched control group of non-MMAF couples treated during the same period. Couples were matched for women's age at the time of treatment. All were treated for infertility at the CPSR les Jasmins in Tunis (Tunisia) between 2000 and 2012. Results only refer to fresh embryo transfers.

All MMAF patients were described in (Ben Khelifa *et al.*, 2014). ICSI outcomes were obtained for six couples regrouping all men with homozygous deleterious *DNAH1* mutations including 5 truncating variants (P1, P2, P3, P9, P17) and a stop loss variant (P8) and were fully described in our previous study (Ben Khelifa *et al.*, 2014). Three of

these patients were brothers (P1, P2 and P3) born from a consanguineous union. They harbored the same homozygous *DNAH1* mutation that was also identified in a fourth unrelated subject (P17). The males' age ranged from 28.4 to 41.5 and females' age ranged from 21.7 to 43.3 (Table I). At the time of ICSI no spermatozoa were found in the ejaculate of patient P2 (Table I) therefore testicular sperm extraction (TESE) was performed. We did not include patient P6 from the original study as he carried a false-sense, non-truncating variant of unknown significance and with 35% motility he did not present a pure MMAF phenotype (Ben Khelifa *et al.*, 2014).

The non-mutated group was composed of 13 couples with men presenting with MMAF phenotype but without *DNAH1* mutations. All presented a pure phenotype with < 5% motility and > 96% morphological abnormalities of the flagella. *DNAH1* whole coding region from these men was sequenced previously and no pathological mutations had been identified (Ben Khelifa *et al.*, 2014).

Except for patient 2, semen samples were collected by masturbation after 3 to 5 days of sexual abstinence and examined after liquefaction for 30 min at 37 °C. For patient P2 a microdissection approach was employed in order to enhance sperm retrieval while minimizing damage to the testicle. The utilization of optical magnification allowed targeted identification of seminiferous tubules containing active foci of spermatogenesis and for selective removal of seminiferous tubules while sparing damage to vascularization.

All the patients were informed about the investigations and gave their written informed consent before this study. Non-routine characterization of sperm parameters by FISH, chromatin condensation and DNA fragmentation could only be carried out for 3 of the *DNAH1* mutated patients (P1, P17, P9). These analyses could not be performed for the other patients due to either insufficient biological material or absence of specific

consent. Sperm samples from the 13 non-mutated men were not available for further analyses.

A total of 29 fertile men (all had conceived at least one child spontaneously) who were addressed for sperm donation or cryopreservation before vasectomy, served as control subjects for FISH analysis. All controls were recruited in France, 19 were of European origin and the other 10 were of North African origin (Algeria, Morocco or Tunisia). From these 29 patients six were used as control to assess the sperm chromatin condensation and DNA fragmentation (3 originated from Europe and 3 from North Africa). Mean sperm parameters of these fertile controls are presented in Supplementary Table S1.

Sperm concentration, motility and morphology were evaluated according to the WHO recommendations (WHO, 2010).

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Toulouse (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer). All patients signed an informed consent to participate in the study.

FISH analysis

Fluorescence in-situ hybridization (FISH) analyses were performed on sperm cells from three patients (P1, P17 and P9) and 29 fertile control subjects. Sperm samples were analyzed using dual FISH with two locus specific probes located at 13q14.2 (Green spectrum) and 21q22.13 (Orange spectrum) and triple FISH (chromosomes X, Y and 18) with specific centromere probes of the X chromosome (DXZ1X, p11.1-q11.1, spectrum green), Y chromosome (DYZ3, Yp11.1-q11.1 spectrum orange) and chromosome 18 (D18Z1 18p11.1-q11.1 spectrum Blue) (Fast FISH Cytocell Aquarius). Sperm samples were washed in phosphate buffered saline solution and spermatozoa were layered on a

slide with methanol and acetic acid. The sperm nuclei were partially decondensed using a solution of NaOH (1M) and then washed twice in saline sodium citrate (SSC) solution (Thomas *et al.*, 2004). Before hybridization, the sperm DNA slides were immersed in a jar of 2X SSC/0.4% NP40 solution and passed through an ethanol series of increasing concentrations (70/90/100) before being allowed to air-dry. Denaturation was performed on sperm nuclei and probes for 1 min at 70°C. After overnight incubation at 37°C, the slides were washed in 0.4X SSC/0.3% NP40 then twice in SSC/0.1% NP40. The slides were counterstained with DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) and observed using an Axioplan microscope (Zeiss). Slides were kept frozen at -20 °C until use.

Subsequent image acquisition was performed using a charge-coupled device camera and In situ Imaging System (MetaSystem). The analysis was realized using strict selection criteria: only intact spermatozoa bearing a similar degree of decondensation and clear hybridization signals were scored; disrupted or overlapping spermatozoa were excluded from analysis (Devillard *et al.*, 2012). For each patient, a minimum of 1,000 spermatozoa were counted (Tempest *et al.*, 2010). Only disomic or diploid cells were considered since the distinction between nullosomic cells or hybridization defects cannot be done (Martinez *et al.*, 2013). Moreover no autosomic monosomic concepti are viable.

Sperm chromatin condensation

Sperm chromatin condensation was determined by aniline blue staining on sperm cells from three patients (P1, P17 and P9) and from six fertile controls. Sperm parameters of the three patients are presented in Table I and those of the six fertile controls in the supplementary Table SI. Semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1X, 10 µl were spread on a slide, allowed to air dry and then fixed with a 3% glutaraldehyde solution in PBS 1X for 30 min at room temperature. Slides were then incubated 5 min in water, 10

min in 5% aniline blue diluted in 4% acetic acid solution, 2 min in water (two times), 2 min in 70, 90 and 100% ethanol solutions and finally 2 min in Toluene. Slides were then analyzed using a microscope with a transmitted light microscope 100x objective with oil (Yassine *et al.*, 2015).

Semen DNA fragmentation

Semen DNA fragmentation was evaluated using TUNEL assay on sperm cells from three patients (P1, P17 and P9) and from six fertile controls. Sperm parameters of the three studied patients are presented in Table I and those of the six fertile controls in the supplementary Table SI. Semen samples were washed twice with 5 ml of PBS and fixed in a methanol/acetic acid (3:1,v/v) solution at 4°C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost® slides and air dried at room temperature overnight. Cells were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium citrate in PBS for 2 min and labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) according to the Roche protocol of the In Situ Cell Detection Kit (Roche Diagnostic). Sperm nuclei were counterstained in a 0.5 mg/ml Hoechst solution for 3 min, washed in PBS for 3 min and mounted with DAKO mounting media. Slides were analyzed using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 80i) (Yassine *et al.*, 2015).

Ovarian stimulation and oocyte pick up

Patients were submitted to a standard controlled ovarian stimulation by administration of gonadotropins using either long (n=8) or short (n=1) protocol (Table I). Women were given between 150 and 225 IU recombinant follicle-stimulating hormone (Gonal-F; Merck-Serono) with sometimes human menopausal gonadotrophin (Menopur; Ferring Pharmaceuticals), depending on the age of the patient and previous ovarian

response to gonadotropins. Subsequently, ultrasound was performed, and follicular response recorded from day 5 of gonadotropin stimulation. When at least two follicles were ≥ 18 mm in diameter, 6,500 IU or 10,000 IU human chorionic gonadotropin were administered. Oocytes were retrieved 34-36 h later by vaginal ultrasound-guided follicular puncture.

After retrieval, oocytes were washed with G-MOPS medium (Vitrolife) and incubated in culture medium (GIVF-plus; Vitrolife) for 2-3 hours at 37C, 6%CO₂ and 5% O₂. Then, cumulus cells were removed mechanically by a 30-second exposure to Hyase medium containing 60 IU/mL of hyaluronidase (Vitrolife). Denuded oocytes were then evaluated for nuclear status. Oocytes showing the release of the first polar body were considered mature and were selected for ICSI.

ICSI, embryo culture

Assisted fertilization by ICSI was performed 3–4 h following oocyte collection on mature oocytes. Fertilization was assessed 18-19 hours later for the presence of two pronuclei and two polar bodies. The fertilized oocytes were individually cultured in G1 medium (Vitrolife) until the day of transfer that was performed 48-72 hours after oocyte retrieval.

Cleaving embryos were evaluated for cell number, blastomere appearance (presence of vacuoles, multinucleation, cytoplasmic darkness or inclusions, unevenness size of blastomeres), and fragmentation rate. A top quality embryo was defined as follows: 4-6 cells on day 2, ≥ 8 cells on day 3, <10% fragmentation, and equally sized mononucleated blastomeres. The best embryos were selected for transfer. Supernumerary good-quality embryos were frozen.

Embryo Transfer and pregnancy follow up

For each couple, one to three embryos were transferred by ultrasound guidance, depending on embryo quality and the age of the woman. All patients received luteal support, including 600 mg of vaginally administered micronized progesterone (Utrogestan; Besins Laboratories). Serum hCG levels were measured 14 days after embryo transfer. Clinical pregnancy was defined as at least a visible sac with fetal heart beat 7 weeks after embryo transfer.

Statistical analyses

For FISH analyses, the statistical comparison between patients and control group was made using Student t-test. To compare proportions between two groups (fertilization, implantation, pregnancy and delivery rates), the Chi-square test or Fisher's Exact test was used. The Student's t-test was used to compare means between two groups. Statistical tests with P values ≤ 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed with GraphPad Software™.

RESULTS

ICSI outcomes

The mean male age at treatment was 36 ± 4.8 years (ranging from 28.4 to 41.5 years), and the mean female age was 31.6 ± 7.1 years (ranging from 21.7 to 43.3 years). The 6 couples underwent a total of 9 ovarian stimulation cycles and the mean number of oocytes retrieved per cycle was 16.1 ± 12 (ranging from 1 to 40). One hundred and six metaphase II oocytes were injected, the fertilization rate ((2PN/injected oocytes) was 70.8%. A total of 8 transfers were performed. The mean number of transferred embryos

was 2.0 ± 0.5 (ranging 1 from to 3). Clinical pregnancy rate per transfer was 50% and delivery rate per transfer was 37.5%. Only one miscarriage at 6 weeks of gestation was observed for couple 5.

Good quality supernumerary embryos were frozen. Four out the 6 couples had 1 to 3 replacements of frozen embryos, leading to 2 clinical pregnancies with 2 deliveries. Taking into account the frozen embryo transfers four out of 6 couples (67%) had at least 1 healthy child. Major or minor malformations were not reported in the 6 children who were born. There was only one twin pregnancy (couple 1).

In order to compare these results, we also evaluated the ICSI outcomes of thirteen MMAF patients without *DNAH1* mutations reported in our previous study (Ben Khelifa *et al.*, 2014). The overall fertilization, pregnancy and delivery rates were of 76.5, 46.5 and 39.5 % respectively (Table II). We also assessed the overall outcomes obtained in our fertility center (Polyclinique les Jasmins, Tunis) using the same ICSI procedure between 2000 and 2012 in aged-matched patients (n=1431): fertilization rate was 69.8%, implantation rate was 25.9%, clinical pregnancy rate per transfer was 39.5% and delivery rate per transfer was 32.2 % (Table II).

There were no statistically significant differences between the *DNAH1*-mutated MMAF patients (age, fertilization, implantation, pregnancy and delivery rates) and the two control groups (Table II). Only the fertilization rate in *DNAH1* non-mutated MMAF patients appeared significantly higher compared to non-MMAF patients ($p=0.0281$) (Table II).

Aneuploidy analysis

Results from three color FISH X-Y-18 and dual color FISH 13-21 for the analysis of the chromosomes status in the sperm of the three patients with *DNAH1* mutations are

given in Table III. For triple-FISH, segregation analysis of the chromosomes X-Y-18 was ascertained for 5,807 spermatozoa from the 3 patients (ranging from 1,907 to 1,952 sperm cells per patients) and for a total of 144,138 spermatozoa from 29 normal fertile controls (Table III). For dual-FISH (chromosomes 13 and 21) 6,241 patients' spermatozoa were studied (ranging from 1,896 to 2,448 sperm cells per patients) as well as a total of 38,749 spermatozoa from normal fertile controls (Table III). There was a significantly increased proportion of disomy XY and 18 in sperm of *DNAH1*-mutated patients compared with sperm (n= 144,138) from fertile controls (1.52% vs 0.28%, P=0.0001 and 0.64% vs 0.09%, P=0.0001) (Table III). However, there were no statistically significant differences among the two groups in the frequencies of chromosome 13, 21, XX or YY disomy and diploidy (Table III).

Analysis of sperm chromatin condensation and DNA fragmentation

Sperm chromatin was scored as uncompact if the sperm head was stained with aniline blue (Fig. 2a). The percentage of sperm with uncompact chromatin varied from 6 to 16 % in the three *DNAH1* mutated patients, with a mean of 9.6%. Sperm from normospermic controls had 6.6% of uncompact DNA (n=6). The proportion of sperm with abnormal chromatin condensation was not statistically different (P=0.45) between patients and controls (Fig. 2a).

The proportion of spermatozoa with a green fluorescence (TUNEL positive) indicating DNA fragmentation varied from 6 % to 12.5% in the three patients, with a mean of 9% and 4.5% for controls (n=6) (Fig. 2b). These values were not statistically different between the two populations (P=0.12).

DISCUSSION

The relationship between chromosomal abnormalities and teratozoospermia has been widely investigated. A link has been clearly established for some phenotypes, such

as large-headed multiflagellar spermatozoa (Dieterich *et al.*, 2009), but remains disputable for many other (Lewis-Jones *et al.*, 2003). Several studies demonstrated previously that sperm flagellar abnormalities were often associated with an elevated frequency of gonosomal disomies and diploidies (Bacetti *et al.*, 2005; Rives *et al.*, 2005; Collodel *et al.*, 2006; Ghedir *et al.*, 2014). These chromosomal abnormalities observed in MMAF patients might be linked to the common components shared between the sperm centrosome, the mitotic spindle and the flagella (Coutton *et al.*, 2015). Therefore, it could be hypothesized that defects in some centrosome-associated proteins may disturb both flagellum formation and spindle assembly during sperm meiosis, resulting in nondisjunction errors and spermatozoa aneuploidy (Rives *et al.*, 2005). Chromosomal abnormalities were however not detected in all reports describing the sperm chromosomal constitution of MMAF patients (Viville *et al.*, 2000), pointing out that flagellar defects do not systematically lead to sperm aneuploidy.

In the light of the above, the aim of this study was to evaluate the aneuploidy rate and the sperm DNA quality in MMAF patients with a mutation in the *DNAH1* gene. Sperm FISH analyses showed that *DNAH1* patients have few abnormal sperm although we observed a significant increase of XY and 18 disomy. These low aneuploidy rates suggest that ICSI with spermatozoa from infertile patients mutated in the *DNAH1* gene will likely be of good prognosis for future pregnancies. Pending complementary studies on larger cohorts of *DNAH1* mutated men, we propose that sperm FISH analyses should be envisaged in MMAF patients harboring a *DNAH1* mutation to verify if the rate of XY and 18 disomy is indeed increased in these patients. Such analysis however is not necessary in a routine setting. Sperm nuclear quality is also an important parameter to predict the chances of success for ICSI treatment as demonstrated in globozoospermia. Indeed, the lower live birth rate per transfer in globozoospermic patients may be due to sperm DNA damages related to defective chromatin condensation and DNA fragmentation (Dam *et al.*, 2007; Brahem *et al.*, 2011; Perrin *et al.*, 2013; Yassine *et al.*, 2015). In *DNAH1* patients,

the rate of DNA compaction and fragmentation was not statistically different between patients and controls thus demonstrating a good nuclear sperm quality.

In this study, MMAF patients with *DNAH1* mutations had an overall fertilization, implantation, pregnancy and live-birth rates of 70.8%, 31.3%, 50% and 37.5% respectively. These results are statistically comparable with the overall outcomes obtained in our fertility center (polyclinique les Jasmins, Tunis) in the same time period. They are also similar to those obtained for MMAF patients without mutations in the *DNAH1* gene (Table II). Successful application of ICSI to treat male infertility due to MMAF was also previously described (Chemes and Rawe, 2003; Chemes and Alvarez Sedo, 2012). A recent meta-analysis estimated the mean overall fertilization, pregnancy and live-birth rates in MMAF patients at 63%, 57% and 43% respectively (Dávila Garza and Patrizio, 2013). These results obtained from non-genotyped MMAF patients, are quite similar to those observed here with *DNAH1* mutated men. Interestingly, it was reported that ICSI's success rate may be correlated to the type of ultrastructural flagellar defect carried by the patients as Mitchell *et al.* (2006) reported a lower implantation (8%) and clinical pregnancy rates (15%) in patients without axonemal central pair. Fauque *et al.* (2009) also reported a slower kinetics of early embryo cleavage and a low implantation rate when the central microtubule pair was missing. Here, we described the absence of the central doublet as a hallmark of *DNAH1* associated MMAF (Ben Khelifa *et al.*, 2014) but observed a good ICSI outcomes. The difference may be explained by the molecular defects causing the 9+0 phenotype. In *DNAH1* patients, it is the lack of inner arm heavy chain which results in the abrogation of radial spokes anchoring (Ben Khelifa *et al.*, 2014). We can suppose that this absence of inner arm could be less damaging for embryonic development than other defects like those induced by the absence or defects of centrosomal or pericentrosomal proteins (Chemes, 2012; Coutton *et al.*, 2015). Here, all patients studied had a truncating mutation expected to abrogate the protein functionality. Patients P1, 2, 3 and 17 have the same homozygous splicing mutation in exon 75 (c.11788-1G>A) that was demonstrated to

lead to non-sense mediated mRNA decay leading to the complete absence of the protein (Ben Khelifa *et al.*, 2014). We can therefore safely assume that patients bearing other *DNAH1* truncating mutations will be similarly affected with a typical MMAF phenotype and good ICSI prognosis. This expected good prognosis can logically extend to the other patients affected with less severe *DNAH1* mutations, such as missense variants (modification of a single amino acid). We also observed that four out the 6 studied couples subsequently had 1 to 3 replacements of frozen embryos leading to 2 clinical pregnancies with 2 deliveries. These data also suggest that axonemal defects due to *DNAH1* homozygous truncating mutations do not hamper embryo survival and development following thawing.

To conclude, although we observed an increased rate of XY and 18 disomy, MMAF patients with *DNAH1* gene alterations showed a relatively low aneuploidy rate and a good nuclear sperm quality leading to a good embryonic development following ICSI. These good parameters explain the high pregnancy rate achieved by these patients. This study demonstrates that MMAF patients present an overall a good prognosis following ICSI. *DNAH1* mutations were found in 28% of the patients analyzed suggesting that several other genes induce MMAF. Some of these genes affecting a small proportion of patients may however be more deleterious and induce a poor prognosis following ICSI. We observed that the fertilization rate of MMAF patients without *DNAH1* mutations is higher than that in the control group. However clinical pregnancy and delivery rates are comparable between the three groups, we can therefore not exclude the possibility that some of the yet unidentified gene defects in non-*DNAH1* mutated MMAF patients could impair subsequent embryonic development and decrease ICSI success' rate. Further genetic studies are therefore warranted to identify other MMAF inducing genes to better characterize the genetic etiology of the MMAF phenotype and to improve the management of patients diagnosed with flagellar defects.

Acknowledgments

The authors thank patients for their interest and cooperation.

Authors' roles

C.W., R.Z., P.F.R, C.A. and C.C. analyzed the data and wrote the manuscript; C.W., F.D., V.S. and F.A. performed sperm FISH analyses; G.M. and S.B. performed DNA fragmentation and chromatin compaction analyses. R.Z., S.F.B.M., S.H., L.H., O.M., M.M., H.L. and M.K. provided clinical samples and data; P.F.R. and C.C. designed the study, supervised all molecular laboratory work, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and its accuracy. All authors contributed to the report.

Funding

This work was supported by following grants: ANR Genopat 2009 for the project ICG21 and the MAS-Flagella project financed by the French ANR and the DGOS.

Conflict of interest

None declared.

REFERENCES

- Baccetti B, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Serafini F, Piomboni P. Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertil Steril* 2005;**84**:123–129.
- Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, Yassine S, Pierre V, Delaroche J, Hennebicq S, *et al.* Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 2014;**94**:95–104.
- Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology* 2011;**77**:1343–1348.
- Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;**9**:405–428.
- Chemes HE. Sperm Centrioles and Their Dual Role in Flagellogenesis and Cell Cycle of the Zygote. In: Schatten H (ed). *The Centrosome*. Humana press, 2012, 33–48. Available at: http://link.springer.com.gate2.inist.fr/chapter/10.1007/978-1-62703-035-9_2.
- Chemes HE, Alvarez Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;**14**:14–23.
- Collodel G, Moretti E. Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. *Andrologia* 2006;**38**:208–215.
- Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:455–485.
- Dam AHDM, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, Golde RJT van, Kremer JAM. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:63–75.
- Dávila Garza SA, Patrizio P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and "stump" tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;**25**:229–246.
- Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, Guichaoua M, Sèle B, Rousseaux S. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;**17**:1292–1298.
- Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, Prisant N, Zoghmar A, Guichaoua MR, Koscinski I, *et al.* The Aurora Kinase C c.144delC mutation

- causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 2009;**18**:1301–1309.
- Fauque P, Albert M, Serres C, Viallon V, Davy C, Epelboin S, Chalas C, Jouannet P, Patrat C. From ultrastructural flagellar sperm defects to the health of babies conceived by ICSI. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:326–336.
- Ghedir H, Mehri A, Mehdi M, Brahem S, Saad A, Ibala-Romdhane S. Meiotic segregation and sperm DNA fragmentation in Tunisian men with dysplasia of the fibrous sheath (DFS) associated with head abnormalities. *J Assist Reprod Genet* 2014;
- Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril* 1985;**44**:645–651.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003;**79**:212–215.
- Martinez G, Gillois P, Le Mitouard M, Borye R, Esquerré-Lamare C, Satre V, Bujan L, Hennebicq S. FISH and tips: a large scale analysis of automated versus manual scoring for sperm aneuploidy detection. *Basic Clin Androl* 2013;**23**:13.
- Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers M-C, Selva J, Clavier B, Escudier E, Escalier D. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;**21**:2065–2074.
- Perrin A, Coat C, Nguyen MH, Talagas M, Morel F, Amice J, De Braekeleer M. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia* 2013;**45**:1–9.
- Rives N, Mousset-Simeon N, Mazurier S, Mace B. Primary flagellar abnormality is associated with an increased rate of spermatozoa aneuploidy. *J Androl* 2005;**26**:61–69.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2006;**4**:1.
- Tempest HG, Cheng SY, Gillott DJ, Handyside AH, Thornhill AR, Griffin DK. Scoring of sperm chromosomal abnormalities by manual and automated approaches: qualitative and quantitative comparisons. *Asian J Androl* 2010;**12**:257–262.
- Thomas C, Cans C, Pelletier R, De Robertis C, Hazzouri M, Sele B, Rousseaux S, Hennebicq S. No long-term increase in sperm aneuploidy rates after anticancer therapy: sperm fluorescence in situ hybridization analysis in 26 patients treated for testicular cancer or lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004;**10**:6535–6543.

Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000;**15**:2563–2566.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th edn. Cambridge:Cambridge University Press; 2010. p. 272

FIGURE AND LEGENDS

Figure 1 Structure of the sperm flagellum. **(a)** Mammalian sperm flagellum is structurally divided into three areas: midpiece, principal piece and end piece. **(b)** Schematic cross section through a representative segment of the principal piece showing the plasma membrane (PM) surrounding 7 outer dense fibers (ODF, there are 9 ODF in the midpiece). The fibrous sheath (FS) is composed of two longitudinal columns (LC) which are connected by transverse ribs (TR). Within the ODF are the components of the axoneme. **(c)** The axoneme is enlarged and the offset shows: the 9 outer microtubule doublets of the axoneme (MTs) with associated inner dynein arms (IDA), outer dynein arms (ODA), radial spokes (RS), nexin-dynein regulator complex (N-DRC), nexin links (NL) and the central pair microtubules (CP).

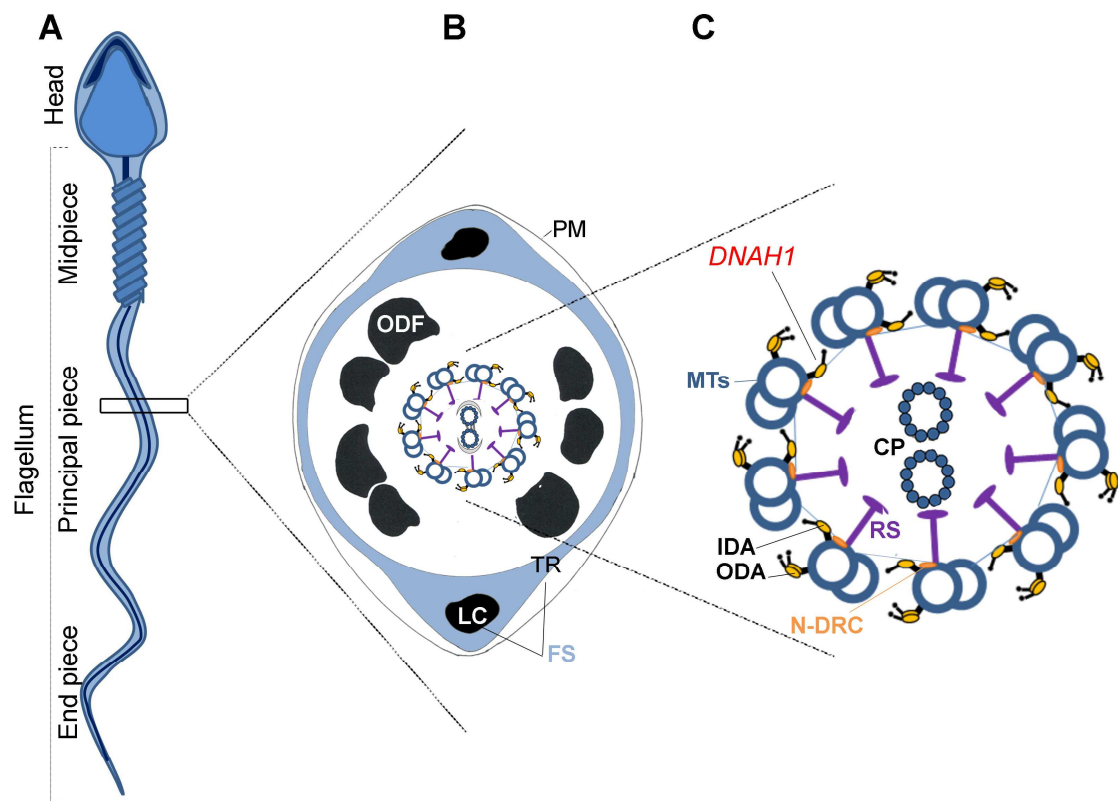


Figure 2 Measure of DNA condensation and fragmentation. **(a)** DNA condensation was measured from sperm cells stained with aniline blue (AB). Control sperm (left) were not significantly different (student t-test, $p=0.45$) from patients' sperm (right). Histogram shows the percentage of sperm cells stained for fertile controls ($n=6$) and patients ($n=3$). Bars represent mean+SEM. **(b)** DNA fragmentation analysis with terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL test) assay. Hoechst and TUNEL staining for control sperm (left) were not significantly different (student t-test, $p=0.12$) from staining for patients' sperm (right). Histogram shows the percentage of TUNEL positive cells for fertile controls ($n=6$) and patients ($n=3$). Bars represent mean+SEM. SEM = standard error of the mean.

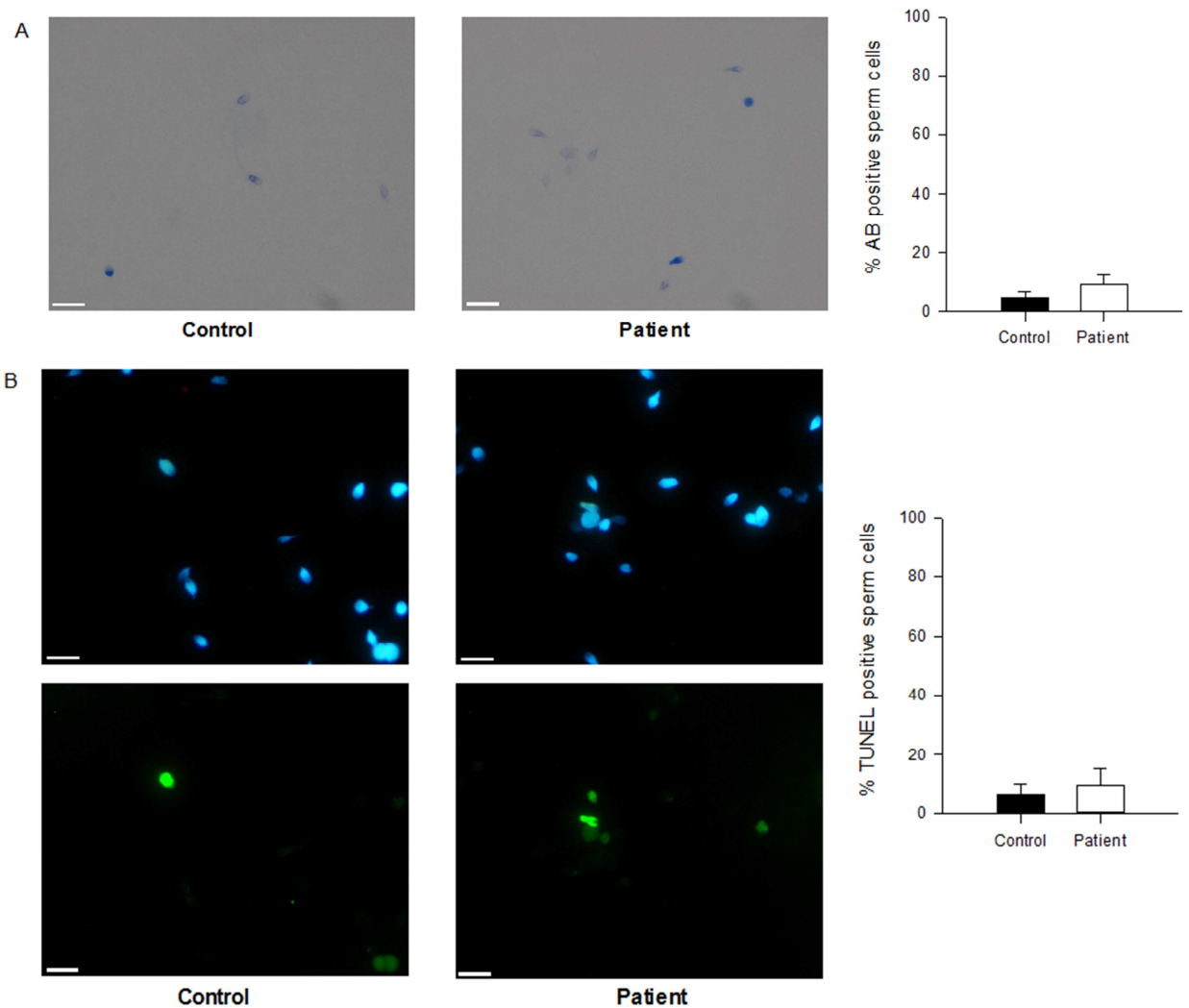


Table I: Main characteristics of patients and ICSI outcomes in the six couples with infertile male mutated in DNAH1.

Couples	Patients		Sperm parameters										Outcomes						
	Infertile male*	DNAH1 mutation	Female age	Male age	Volume (ml)	Numeration (M/ml)	% Motility (a+b)	% Motility (c)	% Typical forms	Collected oocytes	Injected oocytes	2PN	3PN	% 2PN Fertilization rate	Embryos	No of transferred embryos	No of frozen embryos	Clinical pregnancy	Delivery
1	P1	c.11788-1G>A	30.0	29.9	2.8	<20	0	2	0	21	21	13	1	62	13	3	6	1 (twin)	1
2	P2	c.11788-1G>A	28.4	28.4	Testicular biopsy					25	18	8		44	8	2	6	2	2
3	P3	c.11788-1G>A	30.5	36.8	4	42	1	1	0	8	4	2	1	50	2	2	2	0	0
			30.8	37.1	3	52	0	2	0	15	10	9		90	9	2	5	1	1
4	P8	c.12796T>C	21.7	40.5	4.5	9.2	0	5	0	40	23	17		74	17	2	9	0	0
5	P9	c.5094+1G>A	42.8	40.9	3	29	0	<1	0	1	1	1		100	1	1		1	0
			43.3	41.5	4	35	0	2	0	3	1	0	1		0				
6	P17	c.11788-1G>A	26.4	32.3	3.0	>20	0	<1	0	17	13	10		77	10	2	6	1	1
			30.9	36.8	2.5	31	0	<1	0	15	15	15		100	15	2	10	0	0

PN=pronuclear; SD: standard deviation; * Infertile patients previously described in Ben Khelifa *et al.* (2014);

Table II: Outcomes of ICSI cycles in the three different groups.

Variable	MMAF DNAH1 +	MMAF DNAH1 -	Overall ICSI outcomes in age-matched patients
No. of patients	6	13	1431
Mean male age (years)	36.1 ± 4.8	40.6 ± 7.3	40.5 ± 5.6
Mean female age (years)	31.6 ± 7.1	33.4 ± 4.4	34.4 ± 3.5
No. of cycles	9	29	1574
No. of oocytes collected	145	315	15135
No. of oocytes injected	106	243	10447
No. of oocytes fertilized	75	186	7292
Fertilization rate (%)	70.8	76.5 *	69.8
Mean number of embryos replaced	2.0 ± 0.5	2.2 ± 0.5	2.0 ± 0.6
No. of transfer	8	28	1478
Implantation rate (%)	31.3	24.6	25.9
Clinical pregnancy (% per ET)	4 (50)	13 (46.5)	584 (39.5)
No. of miscarriage (n)	1	2	106
Delivery rate (% per ET)	3 (37.5)	11(39.3)	478 (32.3)

Values are mean +/- SD; ET: embryo transfer; * P <0.05 (Chi-square test).

Table III: FISH analysis for three MMAF patients with DNAH1 mutations.

	Analyzed gametes (n)	Disomies (%)		Analyzed gametes (n)	Disomies (%)			Diploidy (%)	
		13, 13, 21	13, 21, 21		X, X, 18	Y, Y, 18	X, Y, 18		X or Y, 18, 18
Patient P1	1,896	0.11	0.31	1,948	0.21	0.15	1.28	0.51	1.48
Patient P17	1,897	0.36	0.36	1,907	0	0	2.87	0.9	0.39
Patient P9	2,448	0.28	0.28	1,952	0.16	0.1	0.41	0.5	0
Mean patients		0.25	0.317		0.123	0.083	1.52	0.637	0.623
SD patients		0.128	0.040		0.109	0.076	1.25	0.228	0.77
Controls	38,749			144,138					
Mean controls		0.40	0.30		0.06	0.05	0.28	0.09	0.48
SD controls		0.117	0.132		0.05	0.04	0.13	0.05	0.17
P value		0.072	0.833		0.074	0.219	0.0001	0.0001	0.368

n= number; SD: standard deviation.

C. Conclusion et perspectives

DNAH1 est le premier gène à avoir été formellement décrit comme responsable du phénotype MMAF (72,73). En dépit d'importantes malformations spermatiques, les patients avec un phénotype MMAF causé par des mutations dans le gène *DNAH1* présentent un faible taux d'aneuploïdie et une bonne qualité nucléaire. Ceci explique le bon taux de grossesses par PMA observé dans cette population (différences non significatives par rapport aux 2 groupes contrôles). Ces résultats devront être confirmés sur de plus larges cohortes de patients *DNAH1* mutés.

D'autres études génétiques sont nécessaires pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans le phénotype MMAF afin de mieux décrire ce syndrome et d'améliorer les conseils et la prise en charge de ces patients. C'est ce qui a été réalisé dans la seconde partie de ce travail, avec la caractérisation du gène *CFAP43*.

ARTICLE 2

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF *CFAP43*, A GENE INVOLVED IN MALE INFERTILITY CHARACTERIZED BY MULTIPLE MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES OF SPERM FLAGELLA.

A- Contexte et Objectifs

Plus de 1000 gènes seraient impliqués dans la spermatogénèse (28), mais à l'heure actuelle seuls quelques-uns ont été formellement caractérisés (55)(56). Il y a donc un fort potentiel de découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'infertilité masculine. Un projet de séquençage exomique (ANR Genopat 2009, projet ICG2I, Pierre Ray) a été mis en place dans notre laboratoire sur une cohorte de patients infertiles partageant le même phénotype MMAF afin d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans ce syndrome. L'analyse bio-informatique a permis de sélectionner certains gènes candidats selon des critères bien définis : mutations tronquantes homozygotes, faisant partie du ciliome ou flagellome et étant fortement exprimés au niveau testiculaire. Ces filtres ont permis de mettre en évidence 18 gènes candidats dont 8 ont été retrouvés mutés respectivement chez au moins 2 patients de la cohorte. La seconde partie de mon travail a consisté à caractériser plus précisément l'un de ces gènes, appelé *CFAP43* (Cilia and Flagella Associated Protein 43) afin de confirmer son implication dans le phénotype des patients et d'appréhender son rôle dans la spermatogénèse.

B- Article original

Identification and characterisation of *CFAP43*, a gene involved in male infertility characterized by multiple morphological abnormalities of sperm flagella.

Clémentine Wambergue^{1,2,3}, Charles Coutton^{1,2,3}, Raoudha Zouari⁴, Jessica Escoffier⁵, Thomas Karaouzène^{1,2,6}, Sylviane Hennebicq^{1,2,7}, Christophe Arnoult^{1,2} et Pierre F. Ray^{1,2,6}

1) Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France

2) Equipe "Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility" IAB, INSERM U823, La Tronche

3) CHU de Grenoble, UF de Génétique Chromosomique, Grenoble, F-38000, France

4) Clinique des Jasmin, Tunis, Tunisie

5) Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva, Geneva, Switzerland

6) CHU de Grenoble, UF de Biochimie Génétique et Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

7) CHU de Grenoble, UF de biologie de la reproduction, Grenoble, F-38000, France

Corresponding author

Mail : cwambergue@chu-grenoble.fr

Telephone number : 0476767575

Fax :0476768850

ABSTRACT

With over 20 million affected men worldwide male infertility is a public health issue. Male infertility is multifactorial, but a large part is due to genetic problems. Only few genes have so far been characterised in male infertility. In order to find new candidate genes involved in this pathology, exome sequencing was carried out on a cohort of 73 patients presenting with primary infertility due to impaired sperm motility caused by multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). Five unrelated patients carried a homozygous variant in *CFAP43*. The role of the CFAP43 protein is not known yet, thus qPCR, immunostaining and electron microscopy were carried out in order to better characterise its function. We also generated KO mice for *Cfap43* to confirm the MMAF phenotype and to better characterise its physiopathology.

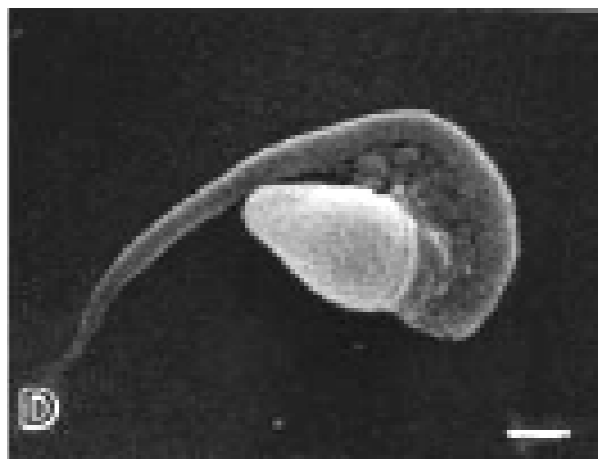
It appeared that *CFAP43* is highly expressed in testis compared to other organs. Electron microscopy analysis of spermatozoa from mutated men evidenced several abnormalities of the sperm axoneme with a frequent loss of the central microtubule pair. Analysis by immunofluorescence showed a flagellar signal in control sperm. Flagella from homozygous KO mice are very short and wrapped, confirming the validity of the genetic diagnosis.

To conclude, we confirmed that CFAP43 is an important protein in spermatogenesis, explaining the infertility of 7% of the MMAF patients tested.

INTRODUCTION

A decline in sperm concentration and morphology has been observed during the last three decades (1) and male infertility now concerns over 20 million men worldwide (2) thus constituting a major health public concern. Male infertility is a multifactorial disorder. There are numerous causes: urogenital infections, immunological or endocrine diseases, exposition to endocrine disruptors but genetic mutations are the main ones. Genetic etiology is very common, yet only few genes were characterised in this pathology (3)(4)(5). It is estimated that over a thousand genes are involved in spermatogenesis (6), so there is a great potential to discover new genes involved in spermatogenesis and which can account for the phenotype of infertile men. The identification of new pathological genes and thus the improvement of diagnosis efficiency will permit to improve medical advice and eventually may allow to suggest new therapeutic strategies. We can distinguish several types of male infertility: a reduction in the number of sperm (oligozoospermia), absence or very little sperm in the semen (azoospermia), sperm with low mobility (asthenozoospermia), dead sperm (necrozoospermia), or abnormality of the morphology of the sperm (teratozoospermia) (7). Herein we studied infertile men with teratozoospermia caused by morphological anomalies of the flagella sometimes associated with a low sperm concentration. This phenotype of teratozoospermia is called: Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella (MMAF) (8). In MMAF phenotype, the flagella can be coiled, bent, irregular, short or absent (Fig. 1). All these abnormalities induce motility problems, resulting in male infertility.

Figure 1. Human Sperm with MMAF phenotype (Electron Microscopy)



Teratozoospermia is often observed in men with Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) (9). It is caused by a dysfunction of the motile cilia which is a common structure between the sperm flagella and motile cilia from various cells such as respiratory cells. In the middle of the flagellum, there is the axoneme, which is composed of an intricate network of microtubules (nine peripheral microtubule doublets, plus a central pair) and dyneins. Despite their similarity flagella and motile cilia present several differences: motile cilia are made of exclusively by the axoneme whereas mammalian sperm flagella are divided into three main parts: the midpiece (with the mitochondrial sheath surrounding the axoneme), the principal piece and the end piece (with the outer dense fiber and the fibrous sheath surrounding the axoneme)(7). In our study we recruited infertile men with MMAF syndrome which did not present any of the other typical syndromes of PCD such as *situs inversus* or respiratory problems.

Our team has recently demonstrated that *DNAH1* is a gene frequently mutated in patients with MMAF (28 % of the patients from the initial cohort) (8). This indicates that other gene defects are expected to account for the remaining undiagnosed patients. This gene encodes for an inner arm heavy chain dynein (Fig. 2). Other genes are expected to induce flagellar abnormalities, based on the description of animal model presenting with similar anomalies or on PCD patients described to have sperm abnormalities. Overall dozens of other genes are expected to be involved in MMAF pathogenesis.

In this study, we analysed 73 exomes of a cohort of patients with MMAF. It enabled us to identify several candidate genes, which then have to be characterised. Homozygous mutations in *CFAP43* were identified in 5 out of 73 patients (6.8 %). Herein we present the initial characterization of the molecular physiopathology induced by this defective gene. We defined the expression profile of *CFAP43*. We confirmed by immunofluorescence on spermatozoa the localisation of the protein. Moreover, a KO mouse model was created with the CRISPR/Cas9 technique (10), in order to confirm our genetic diagnosis and to study more precisely the gene function.

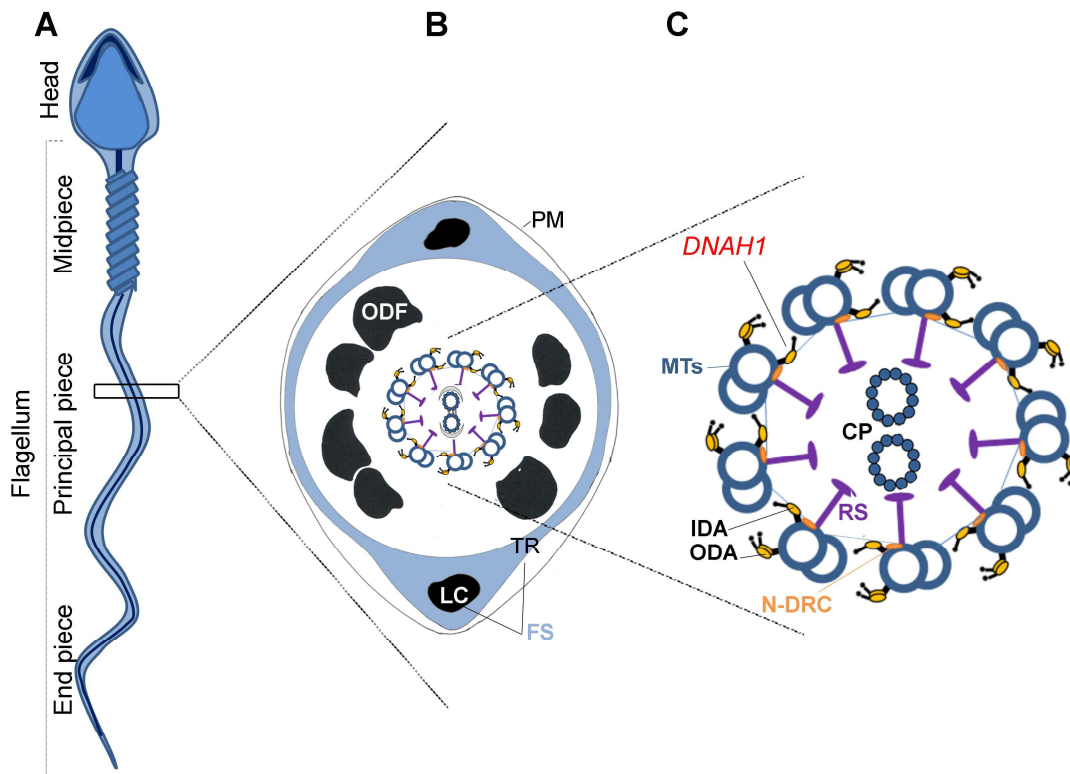


Figure 2. Structure of a sperm flagellum

(A) Mammalian sperm flagellum is structurally divided into three areas: midpiece, principal piece and end piece. (B) Schematic cross section through a representative segment of the principal piece showing the plasma membrane (PM) surrounding 7 outer dense fibers (ODF, there are 9 ODF in the midpiece). The fibrous sheath (FS) is composed of two longitudinal columns (LC) which are connected by transverse ribs (TR). Within the ODF are the components of the axoneme. (C) The axoneme is enlarged and the offset shows: the 9 outer microtubule doublets of the axoneme with associated inner dynein arms, outer dynein arms, radial spokes, and the central pair of microtubule doublets.

MATERIALS AND METHODS

Cohort

The patients studied in this study were recruited in Paris (Hospital Cochin), Grenoble, and mainly Tunis. All samples were included in the CRB “Germethèque” which is a multi-location collection of biological material dedicated to the study of infertility. The study was

approved by our local ethics committee; all individuals gave their signed informed consent and national laws and regulations were respected.

All the patients consulted for primary infertility in one of the participating hospitals or clinics in a department of medical assisted reproduction. Spermograms were performed. All sperm analyses were performed at least twice, in accordance with the World Health Organisation recommendations (11). If flagella abnormalities were consistent with a MMAF phenotype, the patients were included in our cohort and, after patient approval, saliva was collected for DNA extraction and sperm samples stored. Saliva was obtained from all participants and only few subjects disagreed to donate sperm (which had already been collected for creating the spermogram).

All subjects answered a health form focused on PCD manifestations, and none indicated suffering from any of the other symptoms encountered in PCD (respiratory disease, hydrocephalus, *situs inversus...*).

The particularity of this cohort is that the majority of the Tunisian patients had parents who were related and thus with consanguinity.

Exome / Genetic analysis

Genomic DNA was isolated from saliva using Oragen DNA extraction kit (DNAgenotech®, Ottawa, Canada). Coding regions and intron/exon boundaries using the Agilent SureSelect were enriched using the “all Exon V5 kit” (Agilent Technologies, Wokingham, UK). DNA sequencing was undertaken at the Genoscope, Evry, France, on the HiSeq 2000 from Illumina®. Sequence reads were aligned to the reference genome (hg19) using MAGIC, (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/acedb/Software/Magic>). Duplicate reads and reads that mapped to multiple locations in the exome were excluded from further analysis. Depth of sequence coverage was calculated using « in-house » Perl script calculating

separately forward and reverse reads. Reads with sequence coverage under 10 in at least one of forward or reverse reads were excluded. Single nucleotide variation (SNV) and small insertion/deletion (indels) were identified and filtered for quality using an « in-house » software tool that allowed the production of a list of variants present in studied cohorts.

Bio informatics analysis / Identification of candidate variants

Candidate variants were identified using a combination of bioinformatics tools. All were filtered by comparison to EVS, the 1000 Genomes Project (1KG) and the ExAc consortium, and those with a minor allele frequency (MAF) greater than 0.05 for EVS and 1KG and 0.01 for ExAc were excluded.

We also compared these variants to an « in-house » database of 56 control exomes and all variants present in homozygous state in this database were also excluded.

We used Variant Effect Predictor (VEP) to predict the impact of the selected variants on transcripts. We only retained the variant impacting splice donor / receptor sites or causing frameshift, inframe insertion / deletion, stop gain, stop loss or missense. The potential effects of non-synonymous amino acid substitutions on protein function were predicted using SIFT (<http://sift.jcvi.org>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

We selected homozygous frameshift mutations, in order to get damaging phenotype and to facilitate the demonstration of causal effects of the mutations. Because our patients are mostly born in consanguinity relations, our postulate is that the phenotype is due to autosomal recessive segregation.

After the analysis of big data (TIMC - Grenoble), we identified 21 genes on 42 patients potentially involved in this pathology. We selected only the mutations causing a severe DNA damaging (homozygous and truncated).

SANGER confirmation

A PCR was performed on the DNA from the 5 patients who presented a homozygous mutation on *CFAP43* and from a Maghrebian control in parallel with each patient. We used TaqPolymerase (Qiagen®), 60°C x 35 cycles on BioRad® Thermo Cyclers. The primers used for each patient are listed in Supplementary Material Table S1.

All the variations found with Whole Exome Sequencing were confirmed by SANGER sequencing (HITACHI, Grenoble).

Quantitative Real Time PCR

Quantitative Real time PCR was performed on a panel of human and mouse cDNA. The mouse panel was home made with individuals DBA-C57 WT. RNA extractions were performed from 3 mice (mirVana™ PARIS™ Kit, LifeTechnologies®), followed by reverse transcription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystem®). This panel was composed of 8 organs: testis, brain, lung, kidney, liver, stomach, colon and heart. Human cDNAs were obtained from Life Technologies® mRNA, and reverse transcribed with the same kit as mice. This panel was composed of 3 organs: testis, brain and lung.

Data are presented as means of three replicates for each organ, and two reference genes. Messenger RNA (mRNA) expression was assessed by qPCR with a StepOnePlus (LifeTechnologies®), with Power SYBR®Green PCR Master Mix (Life Technologies®). The PCR cycle was as follows: 10 min at 95°C, 1 cycle for enzyme activation; 15 s at 95°C, 60 s at 60°C with fluorescence acquisition, 40 cycles for the PCR. Analysis was performed with advanced relative quantification mode. Values for each gene were normalized to expression level of *ACTB* and *RPL27* genes for human, and *Actb* gene for mouse) via the 2-DDCT method (12). The 2-DDCT value was set at 0 in brain cells,

resulting in an arbitrary expression of 1. PCR primers used to amplify *CFAP43* and the reference gene *ACTB* and *RPL27* are listed in Supplementary Material Table S1.

Immunostaining

We performed Immunofluorescence (IF) staining on human spermatozoa (one control, and one patient) with anti-*CFAP43* antibodies (anti peptide Ab, raised in rabbit, and purified on affinity columns against peptides, Biotem®) and monoclonal anti-acetylated tubulin antibodies (raised in mouse, Sigma-Aldrich®).

Sperm cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 4% PFA for 5 min at room temperature (RT), and washed twice in PBS. Fixed spermatozoa were allowed to air-dry on poly-L-lysine coated slides followed by unmasking in Citrate buffer pH6. After a permeabilization with 0.5% Triton X-100, samples were then blocked with PBS 1X and 2% normal goat serum for 1 hour at Room Temperature. Slides were co-incubated with two primary antibodies *CFAP43* at 1:25 and 1:100, and anti-tubulin acetylated at 1:500 for 2 hours followed by 3 washes with PBS 1X, and then an incubation with the secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Highly cross-adsorbed secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546) were obtained from Molecular Probes (Invitrogen®). After 3 washes with PBS 1X, spermatozoa were counterstained with Hoechst 33342 (blue) as nuclei marker and then mounting in Dakomounting medium (Dako). Appropriate controls were performed, omitting the primary antibodies. Immunofluorescent signals were visualized with a laser scanning confocal microscope (DYNASCOPE, Albert Bonniot Institute, Grenoble, France)

Antibodies anti-CFAP43 production :

Antibodies were produced by Biotem® (Apprieu, France). Two peptides were injected simultaneously into two rabbits in order to increase immunogenicity. One peptide was directed against the N-Terminal part of the protein, and the second peptide against the C-Terminal part. They were then purified on columns.

Peptide sequence: CFAP43 N-Ter: CKKSQPGMDVNQMSFN; CFAP43 C-Ter: AVSERKDICNAMGSKLTC

Electron microscopy

Sperm cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na⁺cacodylate pH 7.4 during 2 hours at room temperature. Cells were washed with buffer and post fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour at 4°C. After washing with water, cells were stained overnight at 4°C with 0.5% uranyl acetate pH 4.0. Cells were dehydrated through graded alcohol (30%, 60%, 90%, 100%, 100%, and 100%) and infiltrated with a mix of 1:1 Epon/alcohol 100% for 1 hour before several baths of fresh Epon (Fluka) for 3 hours. Finally, cells were centrifuged and immersed in fresh Epon and polymerized during 3 days at 60°C. Ultrathin sections of the cell pellet were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% uranyl acetate and 1% lead citrate before being observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX).

KO mice

Creation of CRISPR/Cas9 KO (Supplementary Material Fig. S1) was performed in collaboration with the University of Geneva (UNIGE) animal facility and Dr Serge Nef. All the procedures were done in Geneva until the birth of the modified litters. Three plasmids

were injected directly into the nucleus of the zygotes. All plasmids had a U6 promoter which allowed the transcription of the inserted cDNA sequences. One plasmid expressed the Cas9 protein and the other two expressed two distinct RNA guides targeting exons 2 and 21 of the *Cfap43* gene (Supplementary Material Table S2). The co-injection of two different RNA guide increased the chances to have KO mice. All plasmids (pGS-U6-gRNA expression vector) were ordered from GeneScript with the different cDNA sequences already inserted (Piscataway, NJ, USA).

Thanks to the CRISP/Cas9 technique, we obtained 9 mice (4 males, 5 females) in four months after injection from two pairs of mice. Genotyping and phenotyping of the animals were done in Grenoble. When babies were born, DNA was isolated with DirectPCR Tail (Viagen Biotech®) and we sequenced the 2 target exons. The PCR cycle was as follows: 58°C x 35 cycles, and SANGER sequencing was performed then (Primers are listed in Supplementary Material Table S2).

Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Software. Unpaired T test was used to compare the relative expression of *CFAP43* transcripts in several organs. Data represent mean \pm Standard Deviation (SD). Statistical tests with a 2-tailed P values \leq 0.05 were considered significant.

RESULTS

Bio informatic analysis

After exome data analysis, we found 18 genes potentially involved in this pathology in 42 patients. Considering genes found in minimum two patients at least, we have 8 candidate genes.

In this study, we focused only on one gene *CFAP43*, mutated in 5 unrelated patients. *CFAP43* (NM_025145) is a gene localised on chromosome 10. It is composed of 38 exons and the protein (Q8NDM7) of 1665 amino acids. It is part of WDR proteins family, which is composed of WD pattern (tryptophan and acid aspartic) repetitions. They play a role in protein /protein interactions, and are presumed to serve as framework for the assembly of complex proteins, especially in the axoneme of the cilia and the flagella.

We found different mutations on 5 patients, but only 4 subjects agreed to donate sperm samples for research use (Table1). All these mutations are generating a premature Stop Codon and are considered like “damaging” by prediction softwares.

SANGER Confirmation

All the mutations found with the exome sequencing were confirmed by SANGER sequencing (Fig. 3).

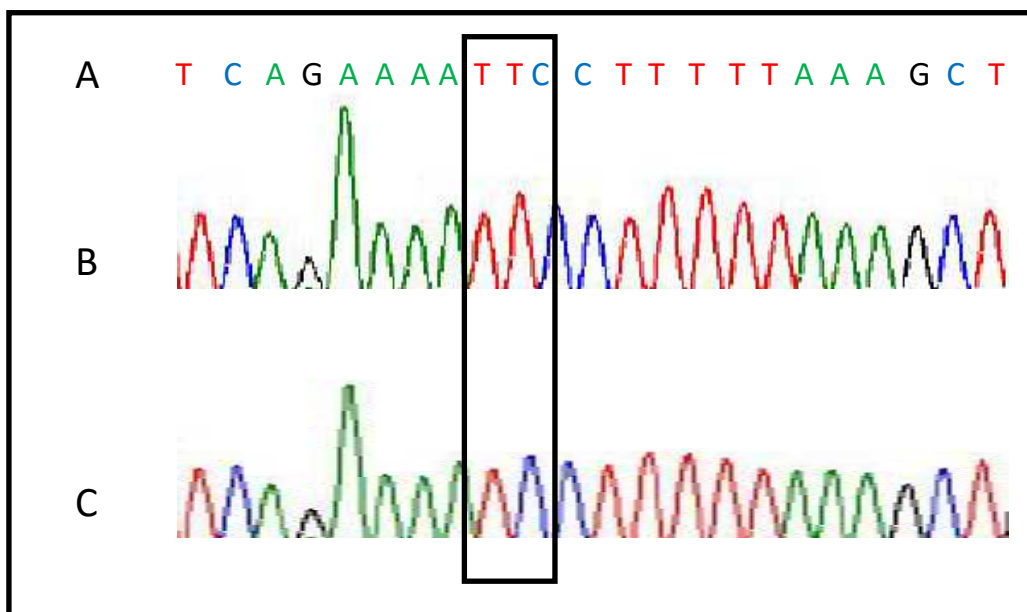


Figure 3. Example of electropherogram of Sanger sequencing for one patient (C) compared to reference sequence (A) and to a Maghrebian control (B). We can notice the deletion of one thymine, leading to a premature stop codon.

Relative mRNA Expression

The amplification efficiencies for the primers were near 100%, according to the slopes of the standard curves. Melting curve analysis confirmed the presence of a single PCR product with a single peak from all samples, indicating that all the primers used are highly specific and efficient for qRT-PCR amplification. Relative expression of *CFAP43* mRNA in testis is significantly higher than in other tissues, especially in ciliated organs (brain, kidney and lung). Brain cell expression is set to 1. For the mouse, the expression of *CFAP43* transcript is significantly higher in testis ($p < 0.001$): 697 times more expressed than in the brain ($SD \pm 67$) (Fig.4). For humans, the expression of *CFAP43* transcript is significantly higher in testis ($p < 0.05$): 204 times more expressed than in the brain ($SD \pm 54$) (Fig. 5).

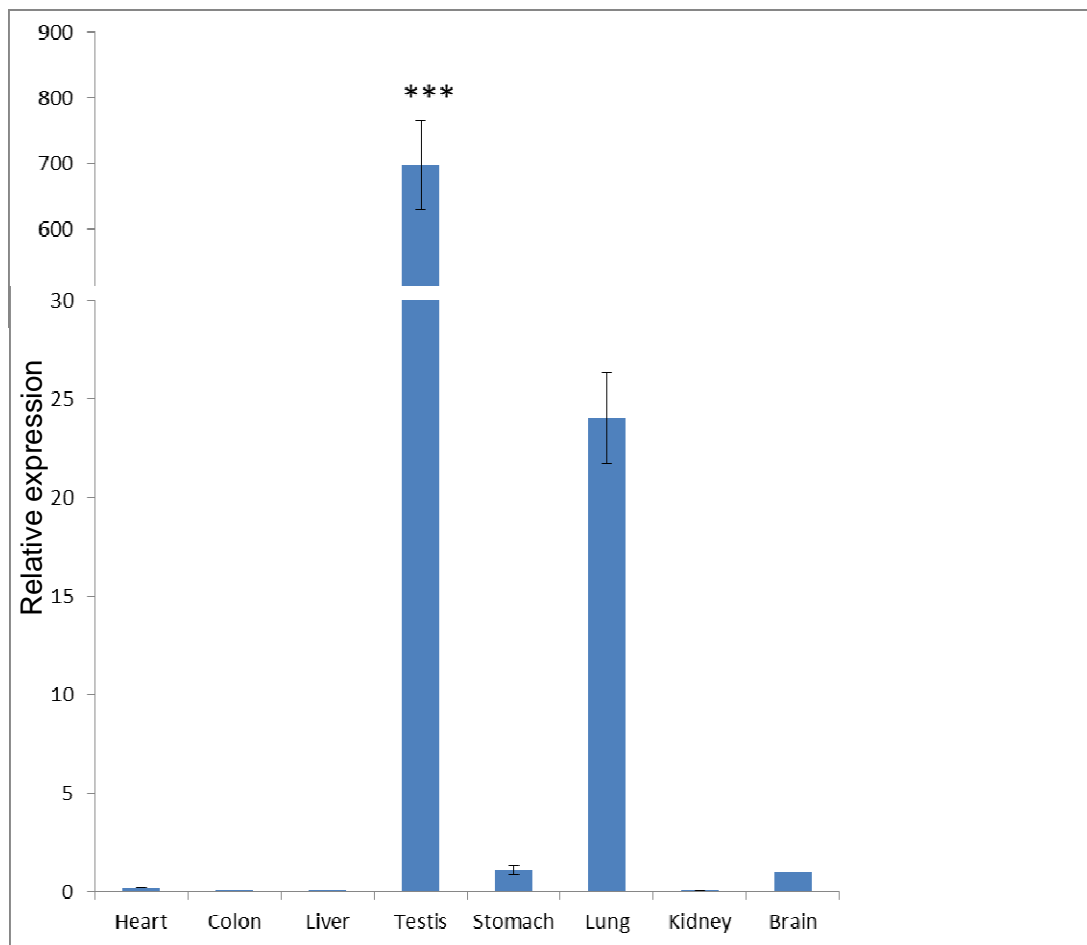


Figure 4. Relative Expression of Mouse *Cfap43* Transcripts. Normalisation with *Actb* Reference gene. Brain expression is arbitrary set to 1. $p < 0.001$ ***

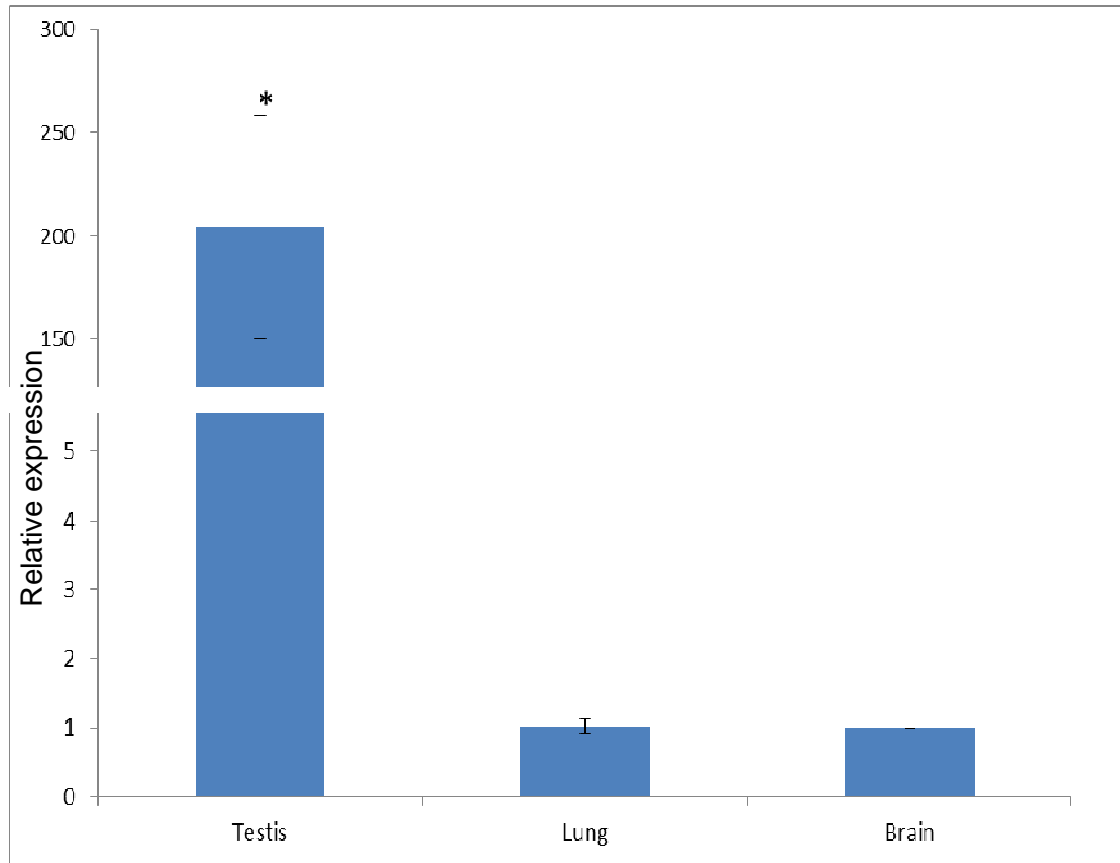


Figure 5. Relative Expression of Human *CFAP43* Transcripts. Normalisation with *ACTB* and *RPL27* Reference genes. Brain expression is arbitrary set to 1. $p < 0.05$ *

Immunostaining

Spermatozoa were co-marked with anti-tubulin and anti- *CFAP43* Abs. Anti-tubulin Abs stained the axoneme all along the flagellum (Figure 6A, 6C, red staining). The *CFAP43* signal was localized throughout the flagellum in control sperm (Fig. 6 B, green staining). Interestingly, the *CFAP43* signal was persistent in flagella of the patient 4 (Fig. 6 D).

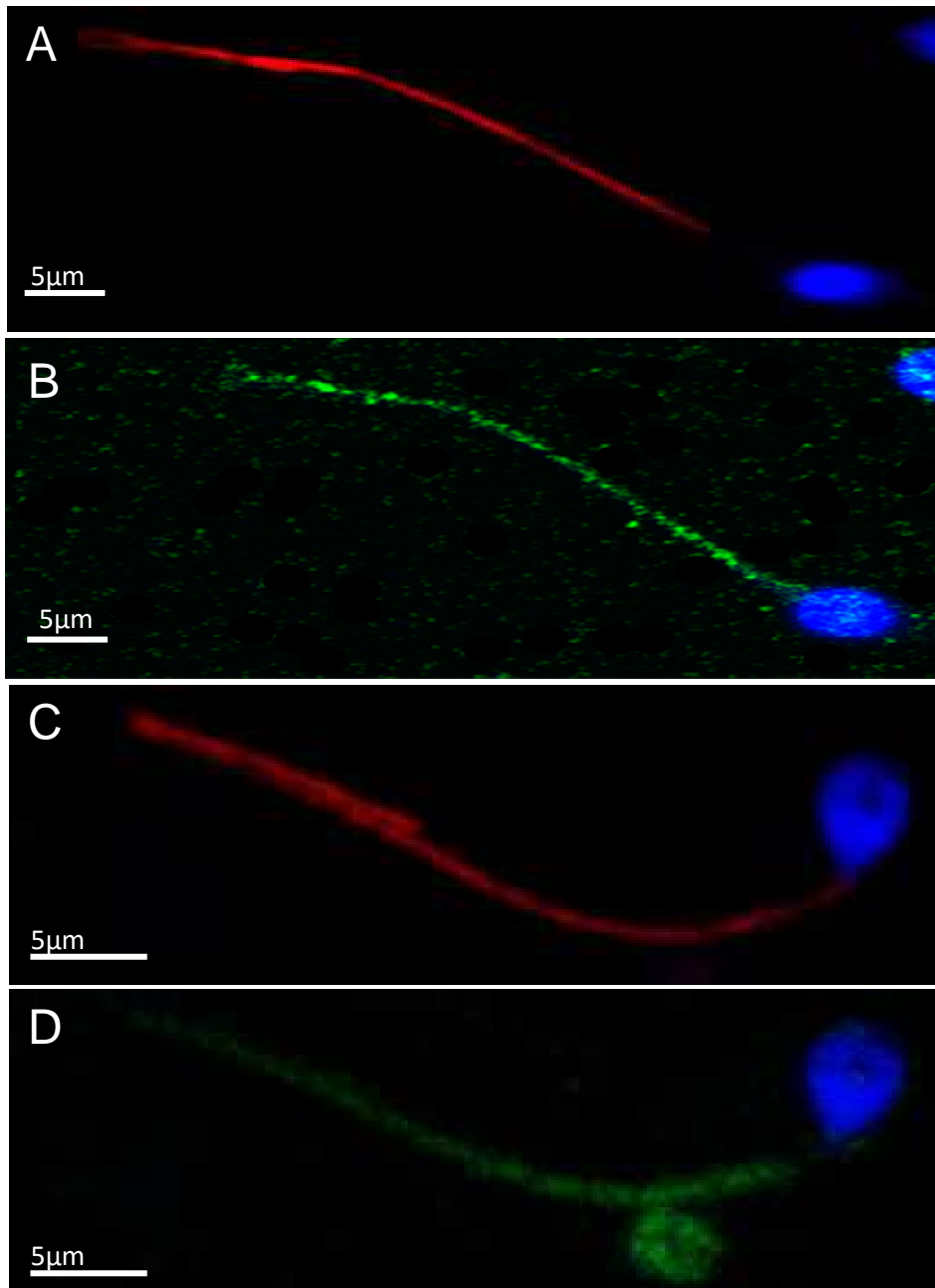


Figure 6.
Immunofluorescence on control sperm (A) Red Signal: Antibody anti-tubuline(B) Green Signal: Antibody anti-*CFAP43*. Blue Signal: Hoechst (nucleus).
Immunofluorescence on patients' sperm (C) Red Signal: Antibody anti-tubuline (D) Green Signal: Antibody anti-*CFAP43*. Blue Signal: Hoechst (nucleus).

Electron Microscopy

At ultrastructural level, numerous defects were observed in the flagella of patients' sperm. First, axonemal structure was disorganized, and the absence of the central pair

represented the main defect (Figure 7C). Some sperm present a complete disorganization of the flagellum structure, and axoneme, dense fibres and fibrous sheath were absent. It is worth noting that the head is normal (Fig.7D).

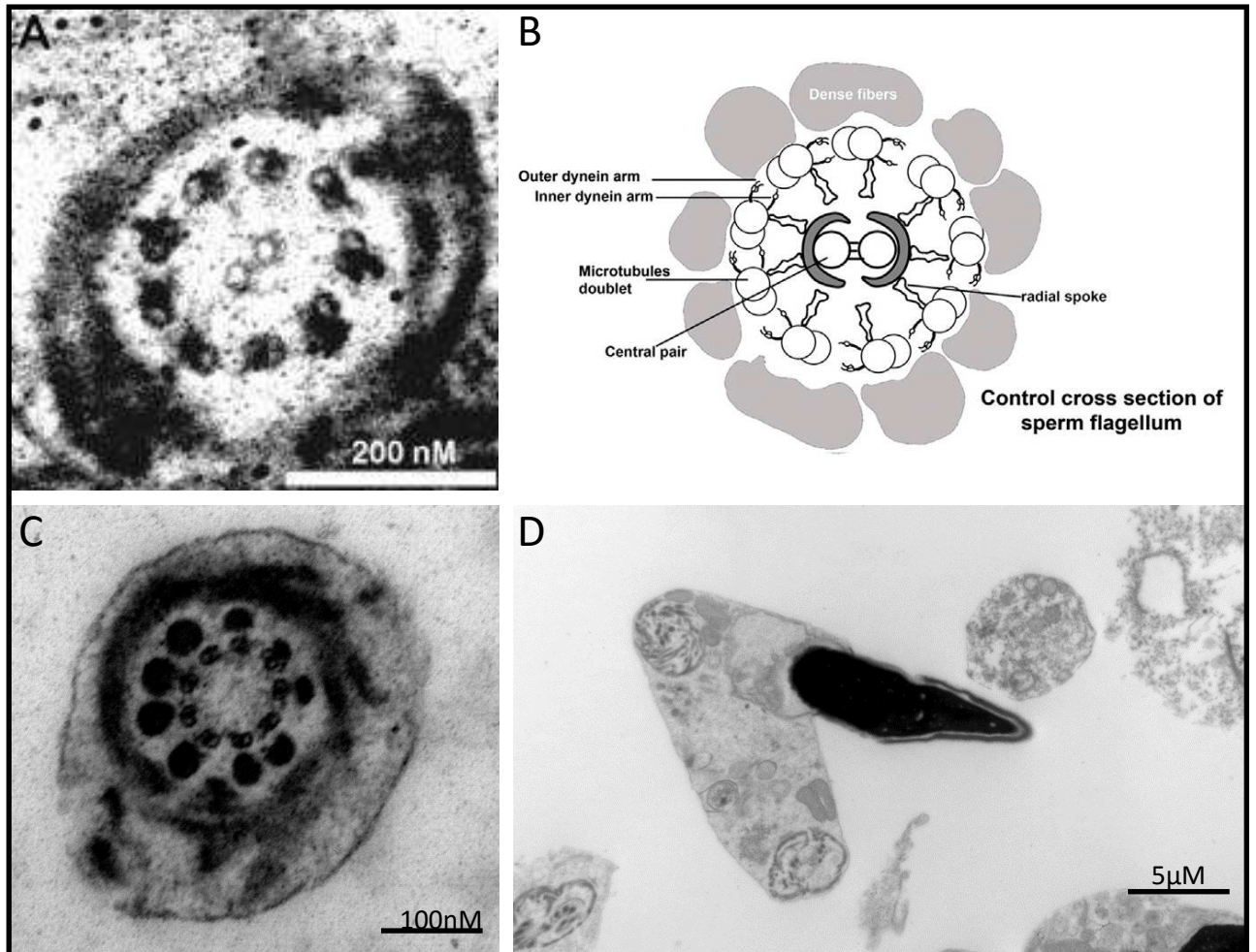


Figure 7. (A) Control cross section of a sperm flagellum (electron microscopy). (B) Schematic representation of a control cross section of sperm flagellum. (C) Mutated patient cross section of a sperm flagellum (electron microscopy). We can notice the absence of the central pair of microtubules. (D) Sperm from a mutated patient (electron microscopy): we can notice a short and a wrapped tail.

KO mice

Following the sequence analysis of the two targeted exons (2 and 21) we observed the following genotypes. For exon 2, one mouse had a heterozygous 8nt deletion. For exon 21, two mice had a heterozygous deletion (of 4 and 10nt) and one mouse had a

homozygous 1 nucleotide (G) deletion. All these deletions entail a frameshift and are expected to lead to complete absence of the protein or the production of a truncated protein. Every male was mated with a female. Remarkably, only the females mated with heterozygous males were pregnant in contrast with the female mated with the KO homozygous male. The KO homozygous male was then sacrificed and epididymal sperm and testis studied. Testis size was normal. The sperm was analysed by optic microscopy. We observed that 100% of the spermatozoa were altered with a short and coiled tail and a normal head, a phenotype very similar to the human phenotype (Fig. 8).

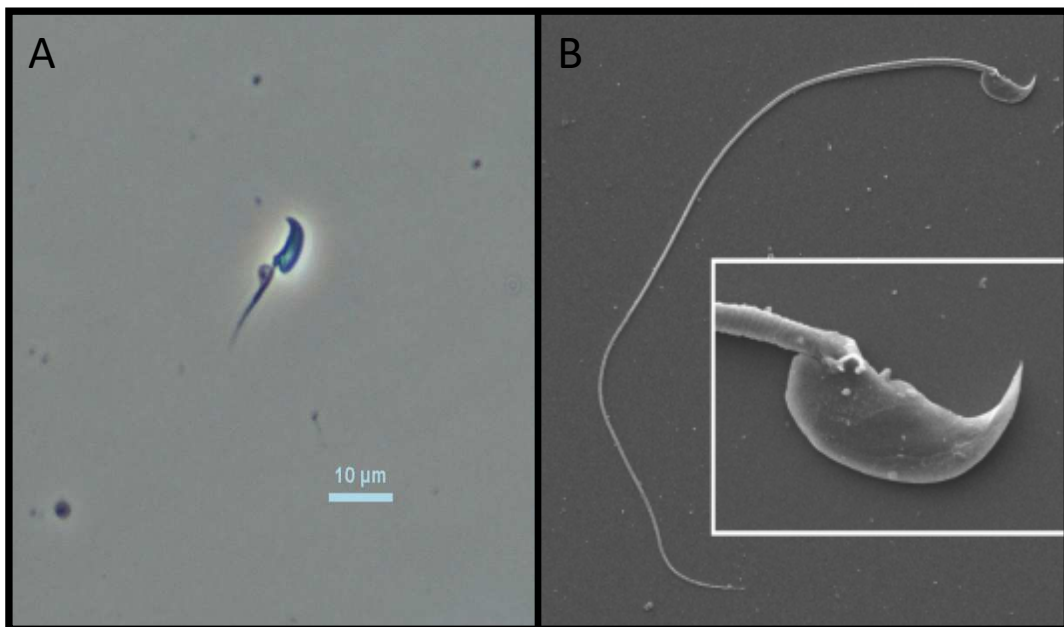


Figure 8. (A) KO Mice sperm (optic microscopy). We can notice a short and a wrapped tail. (B) Control Mice Sperm (electronic microscopy).

DISCUSSION

Validation of *CFAP43* involvement

All the candidate mutations found in Next Generation Sequencing were verified following Sanger sequencing. Exome sequencing is thus a powerful method for gene discovery and

the direct identification of pathological mutations. We believe that both the quality of sequencing and the bioinformatic analysis are critical for successful identification of mutations. In our study, we used strict filters on the quality of sequencing. Since our patients presented strong consanguinity, we only focused on homozygous mutations, postulating that the studied trait has an autosomic recessive segregation. We will reanalyse our data and look for other types of mutations in all the genes that we have selected (21 genes) following this initial screen. We also regularly performed additional exome sequencing on newly recruited MMAF patients. The increment of our data base will allow to discover new candidate genes, and to increase the number of patients who have a mutation in the same gene thus strengthening the arguments in favor of their implication in the investigated phenotype. Eighteen genes were considered as good candidates based on the identified mutations and on their described functions and pattern of expression. Eight of these genes were found mutated in at least 2 patients from our cohort, and are described as important genes for spermatogenesis and as being likely involved in cilia/flagella in the scientific literature(13).

Quantitative real time PCR is a powerful technique for DNA quantitation (sensitivity in the order of a single copy). We use this technique with Relative quantitation, compared to other organs. This analysis permitted to prove that *CFAP43* is an important gene for spermatogenesis because the transcripts are highly expressed in testis and we observed very little expression in other tissues. We then can use absolute quantification in patients versus controls, expecting to have low or no expression in our patients. This analysis was not possible as *CFAP43* expression is restricted to the testis and we could not obtain testis samples from our patients.

The drawback of qPCR is its sensitivity, and despite three replicates, we sometimes observed some important variations between the results leading to a high SD. To avoid this problem, we had to repeat the experiments several times to decrease the SD. We also used a ROX internal standard embedded in our MasterMix in order to correct for

pipetting variations so our results are already normalized with this staining (normalisation with the quantity of MasterMix in each well).

Localisation of CFAP43

We have shown by IF that CFAP43 is located in the flagellum of mature sperm. In the patient we studied, a staining was also observed, suggesting that a truncated protein was present. It is worth noting that the antibodies were produced against 2 peptides (one N-terminal side, the other on the C-terminal side of the protein), thus allowing antibodies to be fixed even if the protein is truncated. To validate the presence of a truncated protein, Western blotting (WB) on sperm flagella proteins from control and patient can be performed. WB will provide evidence of the specificity of the antibody because we can estimate the molecular weight of the immuno-decorated protein. The concordance between the observed and the expected size will permit to validate the specificity of the antibody in WB. In the protein's extract from the patient's sperm, a shift of the band corresponding to CFAP43 is expected. The patient for whom we realised the immunofluorescent analysis has indeed a truncating mutation in exon 21, which should lead to the production of a truncated protein of 885 amino acids, or approximately 100 kDa instead of the 191 kDa for the full size protein. If we do not observe any band in the patient, we will conclude that results observed by immunofluorescence were due to non-specific staining. This would suggest that mutation likely leads to mRNA decay. mRNA decay is a common mechanism resulting in the degradation of abnormal transcripts with a premature stop codon, avoiding the cell to synthesize some non-functional and potentially deleterious proteins. In our case, probably there is no mRNA decay, since we saw a signal in the patient's sperm with immunofluorescence.

In order to improve the fluorescent signal in immunostaining experiments, we can test other sperm fixations (other than PFA), other unmasking solutions (pH is very important for antibody fixations), and variations in the incubation time.

We worked on frozen sperm. Sperm was frozen with cryo-protectant agent (i.e. glycerol). The sperm was rinsed before use, but all these compounds can modify the accessibility of the antibody to the flagella. It would be better to work on fresh sperm but it is usually not possible because of our multicentric recruitment.

We also aim at carrying out some additional immunostaining experiments by doing some co-immuno staining with other antibodies against other flagellar proteins (FSIP2, DNAH5, DNAH1 and DNALI1). It will give us a more detailed localisation of our protein of interest, and will provide some important information regarding the interaction with the surrounding proteins.

Generation of KO mouse model by the Crispr/Cas9 technique and *Trypanosoma* model

Crispr/Cas9 technique is a powerful technique, allowing us to create KO in a few months. We're intending to create KO mice for many of our candidate genes, enabling us to have the rapid confirmation of the human phenotype. The Crispr/Cas9 technique can also be used for creating KI mice; this will enable us to validate false-sense mutations which alter the sequence of a single amino acid.

We have excluded patients with PCD manifestations, but unfortunately, no nasal brushings or biopsies from mutated individuals could be obtained to look for infra-clinical manifestations by exploring the patient's ciliary function in respiratory epithelium.

The utilisation of KO mice will allow us to study other ciliated organs, like lung or kidney, and to perform analyses that cannot be done on patients. It will permit us to know if other organs are affected by this mutation in the tested genes. We will study the structure and

the beat frequency and amplitude of several ciliated cells. If we observe some cilia abnormalities, we can then encourage our patients to have a thorough medical check-up even in the absence of manifestations.

The main drawback of the CRISPR/Cas9 technique is the risk of mosaicism. After the sacrifice of the KO male, we sequenced it again but this time we have to take the epididymal tissue, instead of the phalanges, to confirm the presence of the mutation in the tissue of interest.

Several mechanical phenomena are described, which may explain why only sperm is affected, or more affected than other cilia: sperm cells are subjected to a high intra testicular pressure, especially during the intra-epididymal migration (14). Flagella are also much longer than other cilia and thus small structural damage that might not have any consequences in the cilia might lead to gross malformation in the flagella.

We are planning to study another model: *Trypanosoma brucei*. It is a protist, with flagella, responsible for diseases like “Chagas disease”, or “sleeping sickness”. With this model, we can clone the gene of interest with a tag, and see where the tag is located in the flagella after transfection. It will give us additional evidence in order to conclude that the candidate gene is a crucial gene for flagella.

Consequences of the axonemal defects

In our case, we observed a lack of central pair microtubules (CP). The CP are composed of two microtubules, named C1 and C2, which are structurally and biochemically distinct. The lack of the CPs leading to an abnormal ‘9+0’ configuration of the axoneme is the main defect observed in most cases associated with MMAF (15). Such a defect was also observed in patients with *DNAH1* mutations (8). This abnormality explains the alteration of the entire flagella, and thus the MMAF phenotype. Other teams previously identified similar flagellar defects and described that abnormalities of the peri-axonemal structures

(including Fibrous Sheath, outer dense fibers, mitochondrial sheath) were always associated with axonemal defects (16). These observations raise the hypothesis that CP disorganization might be the cornerstone leading to the MMAF phenotype.

The disorganisation of the microtubules has been described to increase during the sperm transit through the epididymal duct (17). This suggests that CP defects precede other more severe structural abnormalities by weakening the entire axonemal organisation. This demonstrates that CP plays a major role in maintaining the global flagellum organisation throughout spermatogenesis.

Differences between cilia and flagella, and the impact on PCD and infertility treatment

It is essential to compare flagella and motile cilia, because although sperm flagella and motile cilia have a similar microtubule structure based on the presence of a 9+2 axoneme, they present several differences. Motile cilia are constituted almost exclusively by the axoneme, whereas mammalian sperm flagella are divided into three main parts characterised by the presence of additional accessory structures surrounding the axoneme: the outer dense fiber, the mitochondrial sheath, the fibrous sheath. The spermatozoa of infertile male patients with PCD are usually immotile and present various ultrastructural defects of sperm flagella such as missing dynein arms, microtubular translocations, and lack of radial spokes. It would be interesting to compare the genome and the axonemal phenotype of MMAF patients with and without clinical PCD, in order to find out

- If different genes are involved in these 2 diseases
- Or if it's just the same disease with two distinct forms, thus why patients do not develop the same phenotype.

Genotype/phenotype correlation will allow us to provide the best advice and care to patients and to answer many questions: is the risk of aneuploidy increased and is it

therefore advisable to do ICSI? Or do we recommend performing pre-implantation genetic diagnosis?

Conclusion

We have shown that *CFAP43* is likely responsible for the MMAF phenotype in patients presenting with *CFAP43* mutations for the following reasons:

- 1/ Sanger sequencing confirmed the exomic analyses
- 2/ *CFAP43* is strongly expressed in testis
- 3/ Ab against *CFAP43* marked strongly the flagellum, an expected location
- 4/ KO animals generated by Crisp/Cas9 presented pure MMAF phenotypes

The localization of *CFAP43* within the axoneme and its molecular partners should be characterised in order to determine its molecular function.

ACKNOWLEDGMENT

We thank our patients and control individuals for their participation.

This work was supported by the French Research Agency ANR "MAS FLAGELLA" and CHU Grenoble, France

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

1. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2013;28(2):462-70.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2007;22(6):1506-12.
3. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet.* mai 2007;39(5):661-5.
4. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet.* 11 mars 2011;88(3):351-61.
5. Ben Khelifa M, Coutton C, Blum MGB, Abada F, Harbuz R, Zouari R, et al. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl.* nov 2012;27(11):3337-46.
6. Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 oct 2003;100(21):12201-6.
7. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.* 17 avr 2015;
8. Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet.* 2 janv 2014;94(1):95-104.
9. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience.* 1 déc 2014;64(12):1126-37.
10. Zhang L, Jia R, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y, et al. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PloS One.* 2015;10(3):e0120396.
11. WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. WHO. [cité 28 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* déc 2001;25(4):402-8.
13. Eddy EM. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:45-62.
14. Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, Gerton GL, Radice GL, Strauss III JF. Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol.* sept 2002;22(17):6298-305.
15. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* oct 2003;9(5):405-28.
16. Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and periaxonemal anomalies. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ.* 1984;50(1):37-52.
17. Sironen A, Kotaja N, Mulhern H, Wyatt TA, Sisson JH, Pavlik JA, et al. Loss of SPEF2 function in mice results in spermatogenesis defects and primary ciliary dyskinesia. *Biol Reprod.* oct 2011;85(4):690-701.
18. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet.* mai 2015;52(5):289-96.

TABLES

Table 1.

Truncated mutations found in the 5 unrelated patients

Patient 1	chr10:105921781	G>A	exon 26	Stop gained	c.3352G>A p.R1118X
Patient 2	chr10:105905295	AT>A	exon 31	Frame shift	c.3928delT p.F1297F
Patient 3	chr10:105912486	T>G	exon 28	Spliceacceptor variant	c.3541-2T>G
Patient 4	chr10:105928535	C>T	exon 21	Stop gained	c.2658C>T p.W886X
Patient 5	chr10:105928513	C>T	exon 21	Stop gained	c.2725C>T p.R894X

ABBREVIATIONS

PCR	Polymerase Chain Reaction
WES	Whole Exome Sequencing
CFAP43	Ciliated Fibrous associated Protein 43
KO	Knock Out
KI	Knock In
F	Forward
R	Reverse
WT	Wild Type
RNA	Ribonucleic Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
cDNA	complementary DNA
mRNA	messenger RNA
PFA	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate Buffered Saline
MMAF	Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
PCD	Primary Ciliary Diskinesia
CRB	Center of Biological Ressources
SNV	Single Nucleotide Variation
EVS	Exome Variant Server
VEP	Variant Effect Predictor
WB	Western Blot
Nt	Nucleotide
CP	Central pair microtubules
IF	Immunofluorescence
SD	Standard Deviation
Ab	Anti-bodies

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1.

Primers used for patients sequencing, and for qPCR of *CFAP43*

Function	Primer Name	Primer Sequence
Sequencing	Patient 1 (exon 31)	F AGGTTTCCAAACCAAGTTGC R ACCGTGCTTACACAGATCCTT
	Patient 2 (exon 28)	F CCTCCCTTGTGGTGAAATGT R GTAAAGGGGAAGGTGCACAA
	Patient 3 (exon 26)	F TCTAATGTTGGGTGGGAAGC R GCCTCCTCACTTAGCCTCCT
	Patient 4 (exon21)	F GGCTCAAAGTGTTGGAGAAAG R TCTCAGTGCTTTGCTATGCC
qPCR	<i>CFAP43</i>	F CTGGTAGGCAAAGAGGCAGA R TCACAGCCAATGTACAAGTC
	<i>Cfap43</i>	F ATGGCAACTAATGTGCCAGT R GCAAAGTAGAGTGTAGTCCAGGA
	<i>ACTB</i>	F CCAACCGCGAGAAGATGA R CCAGAGGCGTACAGGGATAG
	<i>RPL27</i>	F TGATGGCACCTCAGATCGC R AGAGTACCTTGTGGGCATTAGG
	<i>Actb</i>	F ACCAGAGGCATACAGGGACA R CTAAGGCCAACCGTGAAAAG

Table S2.

Guide RNA sequences for CRISPR/Cas9 mice generation, and primers for CRISPR/Cas9 mice genotyping.

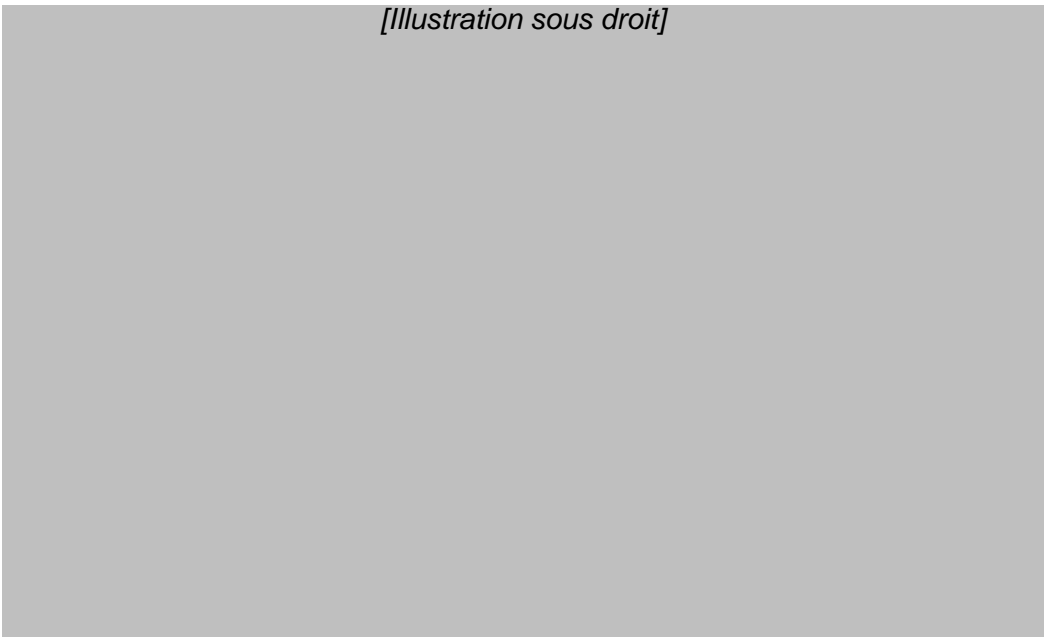
Cfap43 exon2 Guide RNA	AATGTGCCCAGTGAAGTCG
Cfap43 exon21 Guide RNA	CTCCATGGCTGTGAAGGGC
Cfap43 PCR exon 2F	TCAATGACCAGACCATCTGC
Cfap43 PCR exon 2R	AGGACATCTGGCTCACATCC
Cfap43 PCR exon 21F	GAGCTCGCTCAGGTTATTGC
Cfap43 PCR exon 21R	ATAGTGGTTGTGCGCTGGAC

Figure S1.

CRISPR/Cas9 Technique

The core components of CRISPR/Cas9 are a nuclease Cas9 (in blue) comprising two catalytic active domains RuvC and HNH, and a guide RNA. On the presence of a protospacer-adjacent motif (PAM) on the opposite strand, guide RNA directs Cas9 to the target site by base-pairing, resulting in Cas9-generated site specific DNA double strand breaks that are subsequently repaired by homologous direct repair if the homologous sequences are available or otherwise by non homologous end-joining (NHEJ). NHEJ is error prone and may induce small insert or delete (indel) mutations. We can also creating Knock Out mice causing a small INDEL in a target gene. (18)

[Illustration sous droit]



C- Conclusion et perspectives

En conclusion, les résultats de ce travail démontrent que les mutations identifiées dans le gène *CFAP43* sont responsables du phénotype MMAF chez 7% des patients et que la protéine CFAP43 joue un rôle important dans le processus de la spermatogénèse et la formation du flagelle. Cette protéine pourrait avoir probablement un rôle dans la liaison de la paire centrale aux doublets périphériques, et pourrait donc entrer dans la composition ou être en lien étroit avec les ponts radiaires ou le complexe associé à la calmoduline.

Des études complémentaires sont en cours afin de caractériser plus précisément son rôle au niveau flagellaire et axonémal, à la fois chez l'homme et chez des modèles animaux ou parasitaires.

Sur les spermatozoïdes des patients mutés, de l'immunofluorescence ciblée sur plusieurs protéines axonémales connues (DNAH1, DNAH5, DNALI1, FSIP2) sera réalisée afin d'identifier sur quel complexe protéique se répercute l'absence de la protéine CFAP43 et ainsi d'en déduire son rôle et sa localisation au sein de l'axonème du flagelle du spermatozoïde.

L'ultra structure flagellaire des spermatozoïdes de souris KO va être également étudiée par microscopie électronique. De même, il est prévu d'évaluer la fonction des cils respiratoires chez ces souris afin de déterminer s'il existe une répercussion, même minime, de l'absence de CFAP43 sur ces cellules. En effet, bien que les patients ne présentent pas de signes de DCP, on ne peut pas exclure totalement que CFAP43 ne joue pas un rôle dans les autres cils de l'organisme.

Un deuxième modèle inactivé pour le gène *CFAP43* a été produit par ARN interférent : *Trypanosoma brucei*, un protiste possédant un flagelle avec un axonème de structure « 9+2 ». Les premiers résultats de microscopie électronique ont permis de montrer une désorganisation sévère de l'axonème flagellaire chez les mutants.

Ainsi, le séquençage exomique semble être une approche efficace pour découvrir de nouveaux gènes impliqués dans un phénotype d'infertilité, du fait de l'hétérogénéité génétique de cette pathologie. Par la suite et seulement une fois le long travail de caractérisation effectué pour chaque gène, la constitution de panels de gènes d'intérêt, permettra d'envisager le diagnostic génétique en pratique de routine.

Enfin quand suffisamment de patients auront été inclus pour chaque génotype, il pourrait s'avérer intéressant d'étudier, comme pour *DNAH1*, le taux d'aneuploïdie chez ces patients et le pronostic de l'ICSI, afin de guider la pratique médicale et de permettre un choix éclairé aux patients avant qu'ils n'entreprennent un parcours de PMA.

CONCLUSION GENERALE

THESE SOUTENUE PAR : Clémentine WAMBERGUE

Anomalies Morphologiques Multiples des Flagelles chez des patients infertiles : Evaluation du pronostic de l'ICSI chez les patients mutés dans le gène *DNAH1* et caractérisation de nouveaux gènes.

Malgré l'identification régulière de nouveaux gènes depuis plusieurs années, la très grande majorité des cas d'infertilité masculine reste encore inexpliquée et sans cause génétique connue. Ce faible taux de succès peut s'expliquer en partie par une grande hétérogénéité génétique pour de nombreux phénotypes. L'abondance de gènes potentiellement candidats rend l'identification des mutations responsables difficile et complexe. Malgré cela, la découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'infertilité masculine demeure primordiale pour une meilleure compréhension de sa physiopathologie et l'identification des acteurs intervenant aux différentes étapes de la spermatogénèse.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un phénotype particulier de tératozoospermie : les anomalies morphologiques multiples du flagelle (phénotype MMAF). Les hommes tératozoospermiques peuvent bénéficier d'une prise en charge de leur infertilité en Procréation Médicalement Assistée, notamment par Fécondation *In Vitro* avec injection spermatique intra cytoplasmique (ICSI). Le premier objectif de ma thèse a été de vérifier si les mutations dans le gène *DNAH1* responsable du phénotype MMAF n'entravaient pas les chances de réussite de l'ICSI chez ces patients. Nous avons analysé rétrospectivement le taux de réussite de l'ICSI chez 6 de ces patients et évalué la qualité de la chromatine ainsi que le taux d'aneuploïdie gamétique. Au final, on note un bon taux de grossesses (50%), une bonne qualité nucléaire et un faible taux d'aneuploïdie justifiant la prise en charge médicale par ICSI de ces couples.

Le second objectif de ma thèse a été de tenter d'identifier et de caractériser de nouveaux gènes impliqués dans le phénotype MMAF. Pour cela, nous avons réalisé un séquençage exomique chez 73 patients MMAF. Cela nous a permis d'identifier des mutations tronquantes homozygotes dans le gène *CFAP43* chez 5 de ces patients. L'étude des transcrits par RT-qPCR a montré une expression très majoritaire dans le testicule. Les analyses par microscopie électronique et immunofluorescence des spermatozoïdes de même que la production de souris KO par la technique de CRISPR/Cas9 ont permis de confirmer formellement l'implication du gène *CFAP43* dans le phénotype MMAF des patients. Ce schéma de validation pourra être mis en place de manière plus systématique pour tous les autres gènes candidats identifiés par séquençage exomique dans notre cohorte.

Mon travail de thèse a permis l'identification d'un nouveau gène responsable de tératozoospermie et de mieux appréhender les enjeux de la prise en charge médicale de l'infertilité chez ces patients. La poursuite de l'analyse de nos données d'exomes et l'inclusion de nouveaux patients dans la cohorte permettront à terme d'aborder de nouvelles stratégies de prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients infertiles.

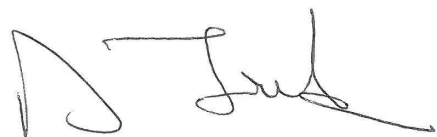
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 11/3/2016



LE DOYEN

PROFESSEUR J.P. ROMANET



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR PIERRE-SIMON JOUK

Pour la Présidente et par délégation Le Doyen de Médecine Pr. Jean-Paul ROMANET
--

BIBLIOGRAPHIE

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2007;22(6):1506-12.
2. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 1991;6(6):811-6.
3. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* avr 2011;25(2):271-85.
4. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.* 17 avr 2015;
5. Lindemann CB. Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1996;34(4):258-70.
6. Eddy EM. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:45-62.
7. Linck RW, Chemes H, Albertini DF. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet.* févr 2016;33(2):141-56.
8. Urbanska P, Song K, Joachimiak E, Krzemien-Ojak L, Koprowski P, Hennessey T, et al. The CSC proteins FAP61 and FAP251 build the basal substructures of radial spoke 3 in cilia. *Mol Biol Cell.* 15 avr 2015;26(8):1463-75.
9. Inaba K. Molecular Basis of Sperm Flagellar Axonemes. *Ann N Y Acad Sci.* 1 avr 2007;1101(1):506-26.
10. Bower R, Tritschler D, VanderWaal K, Perrone CA, Mueller J, Fox L, et al. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol Biol Cell.* 15 avr 2013;24(8):1134-52.
11. Smith EF, Yang P. The Radial Spokes and Central Apparatus: Mechano-Chemical Transducers That Regulate Flagellar Motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* janv 2004;57(1):8-17.
12. Lin J, Okada K, Raytchev M, Smith MC, Nicastro D. Structural mechanism of the dynein powerstroke. *Nat Cell Biol.* mai 2014;16(5):479-85.
13. Satir P, Christensen ST. Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol.* juin 2008;129(6):687-93.
14. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience.* 1 déc 2014;64(12):1126-37.
15. Inaba K. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoolog Sci.* 1 sept 2003;20(9):1043-56.

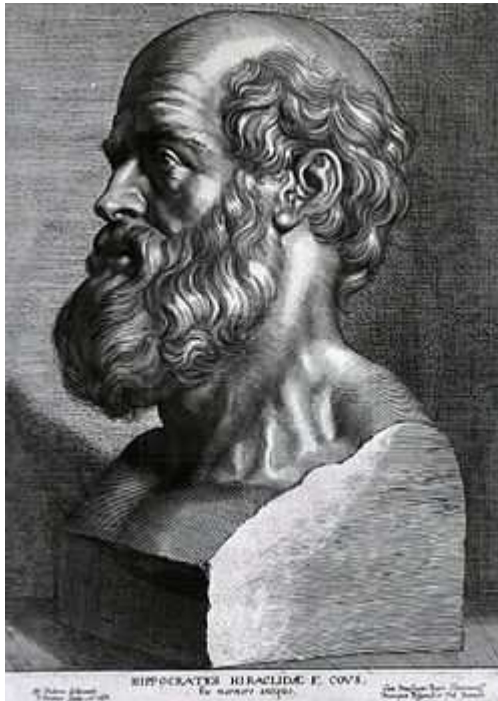
16. 2012-12-05 Rapport_causes_infertilite - Rapport-infertilite-INSERM.pdf [Internet]. [cité 28 nov 2015]. Disponible sur: <http://www.fiv.fr/media/Rapport-infertilite-INSERM.pdf>
17. Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* mai 2001;109(5):333-44.
18. BEH n°7-8-9/2012 / 2012 / Archives / BEH - Bulletin épidémiologique hebdomadaire / Publications et outils / Accueil [Internet]. [cité 18 mars 2016]. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Archives/2012/BEH-n-7-8-9-2012>
19. World Report on Disability - report.pdf [Internet]. [cité 18 mars 2016]. Disponible sur: http://www.who.int/disabilities/world_report/2011/report.pdf
20. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 12 sept 1992;305(6854):609-13.
21. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2013;28(2):462-70.
22. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 2 févr 1995;332(5):281-5.
23. WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. WHO. [cité 28 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
24. Mauduit C, Siddeek B, Benahmed M. [Developmental and environmental origin of male infertility: role of endocrine disruptors]. *Médecine Sci MS.* janv 2016;32(1):45-50.
25. Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet.* mars 2012;29(3):213-23.
26. Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet.* oct 2012;131(10):1565-89.
27. Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, et al. Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE* [Internet]. 29 avr 2011 [cité 24 janv 2016];6(4). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3084853/>
28. Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 oct 2003;100(21):12201-6.
29. O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril.* janv 2010;93(1):1-12.
30. Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M, Schartmann B, Schubert R, et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Oxf Engl.* sept 1999;14(9):2257-63.

31. Pastuszek E, Kiewisz J, Kulwikowska PM, Lukaszuk M, Lukaszuk K. Sperm parameters and DNA fragmentation of balanced chromosomal rearrangements carriers. *Folia Histochem Cytobiol Pol Acad Sci Pol Histochem Cytochem Soc.* 21 déc 2015;
32. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocr Rev.* 1 avr 2001;22(2):226-39.
33. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):281-90.
34. Zhang M, Fan H-T, Zhang Q-S, Wang X-Y, Yang X, Tian W-J, et al. Genetic screening and evaluation for chromosomal abnormalities of infertile males in Jilin Province, China. *Genet Mol Res GMR.* 2015;14(4):16178-84.
35. Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):504-13.
36. Cetinkaya M, Onem K, Zorba OU, Ozkara H, Alici B. Evaluation of Microdissection Testicular Sperm Extraction Results in Patients with Non-Obstructive Azoospermia: Independent Predictive Factors and Best Cutoff Values for Sperm Retrieval. *Urol J.* 2015;12(6):2436-43.
37. Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2010;11(3):182-95.
38. Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology.* 1 mai 2014;2(3):339-50.
39. Mucoviscidose-FRfrPub49.pdf [Internet]. [cité 14 févr 2016]. Disponible sur: <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Mucoviscidose-FRfrPub49.pdf>
40. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 1 janv 2012;27(1):25-35.
41. Coutton C. Caractérisation génétique et moléculaire de l'infertilité masculine : applications à plusieurs formes sévères de tératozoospermie. Université de Grenoble; 2015.
42. Narayan D, Krishnan SN, Upender M, Ravikumar TS, Mahoney MJ, Dolan TF, et al. Unusual inheritance of primary ciliary dyskinesia (Kartagener's syndrome). *J Med Genet.* 6 janv 1994;31(6):493-6.
43. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. Recent Advances in Diagnostics, Genetics, and Characterization of Clinical Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2013;188(8):913-22.
44. Orphanet: Primary ciliary dyskinesia [Internet]. [cité 28 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.orpha.net>
45. Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., éditeurs. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 28 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1122/>

46. Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol*. 14 oct 2015;1-18.
47. Huyghe E, Izard V, Rigot J-M, Pariente J-L, Tostain J, les membres du Comité d'andrologie de l'association française d'urologie (CCAFU). [Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines]. *Prog En Urol J Assoc Fr Urol Société Fr Urol*. févr 2008;18(2):95-101.
48. Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Increased Incidence of Meiotic Anomalies in Oligoasthenozoospermic Males Preselected for Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Assist Reprod Genet*. juill 2000;17(6):307-9.
49. H.Martin R. Genetic consequences of SCSi: The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod*. 5 janv 1996;11(5):924-5.
50. Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le Roy C, Gueganic N, et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online*. févr 2011;22(2):148-54.
51. Tempest HG, Homa ST, Dalakiouridou M, Christopikou D, Wright D, Zhai XP, et al. The association between male infertility and sperm disomy: Evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 14 déc 2004;2:82.
52. Collodel G, Moretti E. Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. *Andrologia*. déc 2006;38(6):208-15.
53. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology*. juin 2011;77(6):1343-8.
54. Pylyp LY, Zukin VD, Bilko NM. Chromosomal segregation in sperm of Robertsonian translocation carriers. *J Assist Reprod Genet*. sept 2013;30(9):1141-5.
55. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet*. mai 2007;39(5):661-5.
56. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet*. 11 mars 2011;88(3):351-61.
57. Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C, et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl*. août 2012;27(8):2549-58.
58. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet Lond Engl*. 4 juill 1992;340(8810):17-8.
59. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique [Internet]. [cité 26 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>
60. Davila Garza SA a, Patrizio P a. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia

- fibrous sheath, and « stump » tail sperm: an updated literature review. [Miscellaneous Article]. *Curr Opin Obstet Gynecol.* juin 2013;25(3):229-46.
61. Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers M-C, Selva J, Clavier B, et al. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2006;21(8):2065-74.
 62. Fauque P, Albert M, Serres C, Viallon V, Davy C, Epelboin S, et al. From ultrastructural flagellar sperm defects to the health of babies conceived by ICSI. *Reprod Biomed Online.* sept 2009;19(3):326-36.
 63. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Squires J, Moy F, Rosenwaks Z. Genetic and epigenetic characteristics of ICSI children. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(6):820-33.
 64. Shimizu Y, Kiumura F, Kaku S, Izuno M, Tomita K, Thumkeo D, et al. Successful delivery following ICSI with macrocephalic sperm head syndrome: a case report. *Reprod Biomed Online.* juin 2012;24(6):603-5.
 65. Wisborg K, Ingerslev HJ, Henriksen TB. In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil Steril.* nov 2010;94(6):2102-6.
 66. Kondapalli LA, Perales-Puchalt A. Low birth weight: Is it related to assisted reproductive technology or underlying infertility? *Fertil Steril.* févr 2013;99(2):303-10.
 67. Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, et al. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod.* déc 2011;17(12):762-8.
 68. Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet.* 2 janv 2014;94(1):95-104.
 69. Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. [Genetics of male infertility: the new players]. *Médecine Sci MS.* mai 2012;28(5):497-502.
 70. Carrell DT, Aston KI. The search for SNPs, CNVs, and epigenetic variants associated with the complex disease of male infertility. *Syst Biol Reprod Med.* 1 janv 2011;57(1-2):17-26.
 71. ra_amp_vigilance_vdef.pdf [Internet]. [cité 26 févr 2016]. Disponible sur: http://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/ra_amp_vigilance_vdef.pdf
 72. Coutton C, Arnoult C, Ray PF. Commentary on « morphological characteristics and initial genetic study of multiple morphological anomalies of the flagella in China ». *Asian J Androl.* 3 nov 2015;
 73. Yang S-M, Li H-B, Wang J-X, Shi Y-C, Cheng H-B, Wang W, et al. Morphological characteristics and initial genetic study of multiple morphological anomalies of the flagella in China. *Asian J Androl.* 2015;17(3):513-5.

SERMENT D'HIPPOCRATE



*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant
l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans
l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire
au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin
d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ;
ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à
corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de
parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon
patient.*

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances
médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.