



**HAL**  
open science

**Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales :  
exploration génétique à propos d'une forme rare  
familiale, prise en charge en aide médicale à la  
procréation**

Omar Touzani

► **To cite this version:**

Omar Touzani. Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales : exploration génétique à propos d'une forme rare familiale, prise en charge en aide médicale à la procréation . Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01626171

**HAL Id: dumas-01626171**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01626171v1>**

Submitted on 30 Oct 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.

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 13 Octobre 2017

Par M. TOUZANI Omar  
Né le 06 Janvier 1987

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales:

- Exploration génétique à propos d'une forme rare familiale.
- Prise en charge en aide médicale à la procréation.

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr BADENS Catherine

Membres : Pr GUILLEMAIN Catherine  
Dr LACROIX Odile  
Dr DELAUNAY Edouard

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER



## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI  
M. Thierry AUGIER  
M. Edouard LAMY  
Mme Alexandrine BERTAUD  
Mme Claire CERINI  
Mme Edwige TELLIER  
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN  
Mme Dominique ARNOUX  
Mme Aurélie LEROYER  
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET  
M. Michel DE MEO  
Mme Anne DAVIN-REGLI  
Mme Véronique ROUX  
M. Fadi BITTAR  
Mme Isabelle PAGNIER  
Mme Sophie EDOUARD

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO  
M. Aurélien DUMETRE  
Mme Magali CASANOVA  
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Henri PORTUGAL  
Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT  
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE  
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

**PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)**

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL  
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY  
Mme Catherine DEFOORT  
M. Alain NICOLAY  
Mme Estelle WOLFF  
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC  
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA  
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT  
Mme Caroline DUCROS  
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE  
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS  
M. Christophe CURTI  
Mme Julie BROGGI  
M. Nicolas PRIMAS  
M. Cédric SPITZ  
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS  
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER  
Mme Sok Siya BUN  
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE  
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

**AHU**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

**ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

**ATER**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahel BOUHLEL
-----------------	--

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Gérard CARLES, Pharmacien Praticien hospitalier  
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien Praticien hospitalier  
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire  
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1<sup>er</sup> décembre  
2015

**A mon jury de thèse,**

**Madame le Professeur Catherine Badens,**

Vous avez été mon chef de service lorsque j'étais interne en biochimie. Vous êtes engagée sur plusieurs fronts entre vos activités hospitalières et celles de recherche et malgré un planning très chargé vous avez toujours su trouver le temps pour vous rendre disponible pour vos internes. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger ce travail, je vous en remercie.

Permettez-moi de vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**Madame le Docteur Odile Lacroix,**

J'ai eu le privilège de travailler à vos côtés dans le laboratoire de fécondation in vitro. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et ce dès les premiers jours. Malgré votre grande expérience vous avez toujours fait preuve de modestie et m'avez toujours permis de participer pleinement aux activités en sollicitant mon avis pour chaque décision et, chaque fois que cela était nécessaire, pris le temps de me corriger. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous et à apprendre à vos côtés.

Vous me faites l'honneur de siéger à mon jury de thèse et de juger ce travail, je vous en remercie.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Edouard Delaunay,**

Tu as été mon co-interne en bactériologie lors de ton niveau 2 où nous avons passé d'excellents moments aussi bien professionnels qu'humains. Tu as partagé avec moi beaucoup de tes connaissances en bactériologie, me donnant ainsi les bases et les outils nécessaires à l'appréhension de cette discipline. Tu as également réussi à me transmettre ta rigueur, ton sens du détail et de l'organisation dans le travail de manière générale. Tu es aujourd'hui en charge du plus grand pôle de bactériologie privé de la région marseillaise que tu as su développer et où tu as su t'imposer par le travail en devenant aujourd'hui un acteur indispensable à ce groupe. Ce travail ne concerne pas directement ta discipline mais tu as cependant accepté sans hésiter de le juger et de siéger au sein de ce jury, je t'en remercie.

**Madame le Professeur Catherine Guillemain,**

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'abord de me recevoir dans votre service de procréation médicalement assistée puis que vous m'avez renouvelée en acceptant d'encadrer mes travaux de recherche durant cette année de Master II au sein de votre équipe. Vous m'avez une nouvelle fois accordée votre confiance en acceptant de diriger mon travail de thèse. Je vous remercie d'avoir partagé avec moi vos précieuses connaissances et votre longue expérience sur le sujet. Vous m'avez consacré beaucoup de temps et d'énergie afin que ce travail puisse être à la hauteur de ce que nous en attendions. Vous m'avez toujours conseillé dans l'intérêt de ma formation, de mes projets professionnels futurs et m'avez donné dans votre service l'opportunité de participer à toutes les activités qui me serviront dans ma vie professionnelle à plus long terme. Vous m'avez transmis votre engouement pour la recherche et la quête de réponses à des sujets qui sont encore non résolus. Je vous remercie pour votre investissement au quotidien dans la formation de vos internes et votre disponibilité à chaque sollicitation. La porte de votre bureau toujours ouverte, vous avez toujours pris le temps, malgré vos nombreuses responsabilités de chef de service, de m'accueillir et de me consacrer le temps nécessaire. En plus de vos remarquables qualités professionnelles vous m'avez donné le plaisir de travailler sous la responsabilité d'une personne engagée, rassurante, fidèle à ses principes, soucieuse du bien-être de ses patients et de la qualité de leur prise en charge.

Vous êtes à l'origine de ce travail, vous avez accepté de diriger cette thèse, et aujourd'hui vous acceptez de siéger dans ce jury.

Pour tout cela je vous suis reconnaissant et vous en remercie sincèrement.

### **A ma future femme, Oumaima,**

Notre rencontre a été la plus merveilleuse des choses qui me soit arrivée pendant cet internat. Tu as su me donner la force et la motivation pour aller au bout de chacun des projets que tu as vécu à mes côtés. Grâce à toi, j'ai pu trouver chaque jour l'énergie, même après une longue journée entre le service et la « recherche », pour ne jamais abandonner mon projet de te rejoindre en inter-CHU malgré toutes les difficultés administratives que nous avons pu rencontrer. Tu as toujours été présente à mes côtés, m'apportant ton soutien de tous les instants et ta patience sans limite ces deux dernières années : cette thèse est aussi la tienne.

Ceux qui me connaissent savent que petit je rêvais de devenir astronaute. A défaut de marcher sur la Lune aujourd'hui j'ai décroché mon étoile. Dans quelques heures tu deviendras ma femme. Puisses-tu illuminer mon ciel pour l'éternité !

### **A mes parents, Amal & Jaouad,**

Pour ces 30 merveilleuses années que vous m'avez consacrées j'aimerais vous exprimer tout mon amour et ma gratitude. Pour votre présence, votre soutien, tant financier qu'affectif, votre bienveillance. A toi maman, pour tous tes sacrifices, tes petits plats soigneusement emballés durant toutes ces années, le stress des veilles de concours, des veilles de résultats. A toi papa, pour la confiance, la liberté et l'indépendance que tu m'as toujours accordées. Tu es un modèle pour moi et c'est en grande partie pour cela que j'ai choisi de suivre tes traces. Vous êtes des parents formidables et j'ai beaucoup de chance de vous avoir. Cette thèse est avant tout la vôtre.

### **A mon frère, Othmane,**

Pour avoir été ce grand frère que tu as toujours su incarner. Tu as, avant moi, traversé les mêmes épreuves et toujours veillé à me faire bénéficier de ton expérience. Pour toutes ces heures passées au téléphone à me soutenir pendant la préparation de mes concours. Pour cette complicité qui nous a toujours unis. Tu es un Grand et tu me le démontres chaque jour.

**A ma sœur, Zineb,**

Pour ta joie de vivre, ton énergie, ton dynamisme et ta bonne humeur ! Tu es la meilleure petite sœur que j'aurais pu espérer avoir. J'ai eu la chance de t'avoir à mes côtés partout où je suis allé : d'abord à Tours puis à Marseille. Tu as toujours été présente et m'as consacré beaucoup de ton temps à me rendre la vie plus facile. Je te remercie pour toutes ces années de bonheur que j'ai eu la chance de passer avec toi. (pose pas trop de questions quand même)

**A mes beaux-parents, Bouchra & Abdallah et à mon beau et frère Amine,**

Pour votre soutien dans cette préparation et cette dernière ligne droite. Vous m'avez accueilli comme votre propre fils. Je suis plus qu'heureux de vous voir présents à mes côtés aujourd'hui et comblé d'avoir une famille aussi formidable que vous.

Merci à toi Amine d'être à l'origine de ce bonheur, un jour peut-être je te rendrai la pareille (ah ça ouiiii...), tu es au top habibi !

**A mes neveux, Ghali, Anis et à tous les prochains...**

Pour vous rappeler que tonton était déjà docteur quand vous mettiez encore des couches !

**A mes grands-parents,** Rokia, Zoubida, Mohamed et tout particulièrement à mon bien aimé et défunt grand père Mohamed Guennoun. Mes yeux se remplissent en t'écrivant ces quelques mots toi qui a toujours été si fier de moi. Je te dédie cette thèse.

**A mes oncles, tantes, cousins, cousines,** je suis très touché et honoré par votre présence à cette soutenance. Vous êtes une famille en or !

**A mes premiers co-internes, Constance et Pascal**

Je ne pouvais pas espérer meilleure équipe pour démarrer mon internat. Pour toutes ces journées déjantées au labo entre les F12 et les « achback », les CTEL et les GPAP. C'est aussi grâce à vous que j'ai pris autant de plaisir pendant ces 4 années. Une grande amitié est née entre nous et j'espère qu'elle restera toujours aussi forte.



## **A Edouardo dit Don Diego De la Vega**

A toutes ces heures passées en bactério à débriefer les matchs de l'OM et du PSG sur fond de MC-Diallo entre les hémocs positives de la cardio et les pizzas de la marina. A tous les « Saluuuut, ». Aujourd'hui c'est un grand plaisir de te voir siéger à mon jury de thèse même si j'aurai du mal à te regarder avec autant de crédibilité toi qui aura été de tous les Carmine, Son, Palais, St-Trop... Une amitié est née ici et je suis certain qu'elle ne fera que grandir encore plus.

## **A Sarah-Lyne,**

Tu as été ma première co-interne en PMA et j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés. Pour tous nos débats philosophiques (ou pas...), notre passion pour la prose et la musique classique signée B2OBA. Je suis très heureux d'avoir partagé ces moments avec toi. J'ai gagné une grande amie et une collègue des plus compétentes. A toujours vouloir faire comme moi toi aussi tu te maries cette année... Je te souhaite tout le bonheur du monde.

## **A mes amis internes,**

**Momo et Christian**, merci pour tous ces bons moments partagés, ces

**Florence et Coralie**, mes dernières co-internes, les journées ne seraient pas les mêmes au labo sans vous !

**Noémie, Eric, Fatih, Xavier, Jojo, Anne-K, Pauline, Lakhdar, Mehdi et tous les autres.**

## **A mes amis du B1A,**

Une pensée pour vous, Simo Zi, Samya, Karl, Clément, Rémi, Walid, Brahim et tous les autres. A toutes ces heures et nuits blanches passées à réviser l'internat.

## **A tous les techniciens de laboratoire,**

Spécialement à ceux que j'ai pu côtoyer pendant mon internat dans les différents services Jean-Charles, Guy, Patrick, Ignacio, Michael, Geoffrey, Lionel et tous les autres. Un grand merci

surtout à toi JC pour ta bonne humeur, ta bienveillance et tes attentions de tous les jours : tes pains au chocolat et le café des lendemains de garde vont me manquer.

**A toute l'équipe du Centre de Procréation Assistée de Sainte-Justine à Montréal :**

**A Pascal Desrosiers**, pour m'avoir permis de faire mon inter-CHU dans ton équipe et de la confiance que tu m'as accordée en me permettant de toucher à tout ce que je voulais apprendre. Ça a été compliqué mais on l'a fait tabernake !

**A Ann, Nathalie et Geneviève** pour m'avoir encadré dans mon apprentissage et accompagné dans cette aventure canadienne. J'ai vécu une expérience unique avec vous si ce n'est la plus marquante de mon internat ! Merci pour tout, vous êtes exceptionnelles les filles !

**A toute l'équipe du CPMA de la Conception à Marseille :**

**Au Professeur Grillo**, merci pour votre confiance

**A Jeanne Perrin**, merci pour ta bonne humeur et ton dynamisme. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés.

**A Jackie Saïas**, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur

**A Carole Daoud**, merci pour ton immense sympathie et ta bonne humeur

**Aux techniciennes du laboratoire :**

**Anne, Annie, Cathy, Florence, Irène, Michèle, Marie-Jo, Nathalie, Thi-Phong et Valérie**

Merci pour tous ces bons moments en votre compagnie !

**A Jackie P, Nathalie B, Alexia, Laetitia, Danielle**

**A l'équipe des gynécologues :**

**Au Professeur Courbière**, merci pour ton dynamisme, ta confiance et ton implication. Tu as toute mon estime, mon respect et mon admiration pour ton impressionnante énergie.

**Aux Docteurs Gnisci, Capelle, Castera, Bannet, Bottin**, merci pour votre bonne humeur

**A l'équipe des Sages-Femmes :**

**A Joëlle** la marocaine ! Merci pour ces merveilleux moments. C'était un grand plaisir de te retrouver tous les jours au CPMA que ce soit pour le travail ou pour ces nombreuses heures à rêver du Maroc que tu chéris tant !

**A Dahbia**, merci pour ta bonne humeur ! Tu es le rayon de soleil de cette équipe et c'était un plaisir sincère de travailler avec toi. Je vais beaucoup te regretter !

**A Coralie et Maelle**, merci pour votre bonne humeur et votre implication au quotidien.

**A l'équipe de recherche U910 groupe « infertilité »**

**Et plus particulièrement à Mike Mitchell, Guy, Razan et Yasmina**

Travailler avec vous fut un immense plaisir, vous m'avez beaucoup appris !

Un grand merci à Mike pour avoir codirigé mes travaux de recherche et à Guy pour avoir supervisé mes manip. Merci à Razan et Yasmina pour votre aide pratique et technique, mais aussi pour tous ces agréables moments passés à vos côtés.

Et pour finir, merci à tous ceux que j'ai oubliés... !

*« L'UNIVERSITÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION  
AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES. CES OPINIONS DOIVENT ÊTRE  
CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À LEURS AUTEURS. »*

# Sommaire

<b>PARTIE 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Physiologie de la reproduction</b> .....	<b>2</b>
A. Gamétogenèse.....	2
a. Ovogenèse.....	2
b. Spermatogenèse.....	8
B. Fécondation.....	21
a. Transit des spermatozoïdes dans les voies génitales féminines.....	21
b. Fusion des gamètes et fécondation.....	22
C. Développement embryonnaire préimplantatoire.....	23
<b>II. L'infertilité</b> .....	<b>24</b>
A. Généralités.....	24
B. Etiologies de l'infertilité.....	25
C. Bilan d'infertilité.....	29
a. L'interrogatoire.....	29
b. Les examens complémentaires.....	30
D. Le spermogramme.....	32
a. Le recueil.....	32
b. L'examen macroscopique.....	32
c. L'examen microscopique.....	32
d. La spermoculture.....	34
e. Le test de migration-survie.....	34
f. Le spermocytogramme.....	35
g. Examen de la maturité nucléaire par coloration au bleu d'aniline acétifié.....	39
<b>III. L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP)</b> .....	<b>39</b>
A. La stimulation ovarienne.....	40
B. Inséminations intra-utérines (IIU).....	40
C. Fécondation in vitro (FIV).....	42
a. FIV conventionnelle.....	42
b. FIV par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI).....	46
<b>IV. Les tératospermies monomorphes : une origine génétique d'infertilité masculine</b> .....	<b>48</b>
A. Tératospermies monomorphes.....	48
B. Globozoospermie.....	49
C. Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales.....	50
a. Description du phénotype.....	50
b. Premières explications du mécanisme de formation.....	51
c. Premières approches génétiques par FISH (Fluorescent In Situ Hybridation).....	53
d. Des spermatozoïdes en réalité tétraploïdes.....	54
e. L'apport du séquençage génomique : découverte de l'implication du gène AURKC (Aurora Kinase C) dans le phénotype des spermatozoïdes macrocéphales.....	55

f. La protéine Aurora Kinase C (AURKC).....	56
g. Formes partielles et prise en charge en AMP .....	58
h. Un phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales : les macrocéphales réguliers monoflagellés.....	60
<b>PARTIE 2 : Notre étude .....</b>	<b>62</b>
<b>I. Rétrospective de près de 10 ans sur les spermatozoïdes macrocéphales au CPMA de la Conception à Marseille entre le 01/01/2008 et le 19/09/2017 .....</b>	<b>63</b>
A. Les chiffres .....	63
B. Prise en charge en AMP .....	66
C. Discussion .....	67
<b>II. Exploration génétique par séquençage de nouvelle génération d'un phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés 69</b>	<b>69</b>
A. Matériels et méthodes .....	69
B. Résultats .....	75
C. Discussion .....	84
D. Perspectives.....	87
<b>Conclusion .....</b>	<b>88</b>
<b>Bibliographie : .....</b>	<b>90</b>
<b>Annexe : .....</b>	<b>96</b>
<b>Liste des abréviations : .....</b>	<b>99</b>
<b>Liste des figures : .....</b>	<b>100</b>
<b>Listes des tableaux :.....</b>	<b>102</b>

## **PARTIE 1 : Introduction**

## I. Physiologie de la reproduction

La reproduction désigne l'ensemble des processus par lesquels une espèce se perpétue, en suscitant la naissance de nouveaux individus. C'est une caractéristique fondamentale partagée par toutes les espèces vivantes. Si elle n'est pas vitale pour l'individu, la reproduction l'est pour l'espèce et est nécessaire au maintien de celle-ci dans le temps. En effet, toute espèce doit posséder un système de reproduction efficace, sans quoi elle serait menacée d'extinction. On distingue la reproduction sexuée, où la fécondation est assurée par des gamètes mâle et femelle donnant un œuf, et la reproduction asexuée qui désigne tous les autres moyens de multiplication où n'interviennent ni gamète ni fécondation.

La reproduction humaine consiste en la fusion de deux cellules, appelées gamètes (ovocyte et spermatozoïde), contenant chacune 23 chromosomes. Cette fusion va permettre la formation d'un embryon contenant 46 chromosomes, dont la moitié provient de la mère et l'autre moitié du père. Chaque embryon a une identité génétique propre et il s'agit plus d'une procréation (formation d'un nouvel être) que d'une reproduction (à l'identique).

La procréation nécessite une phase préparatoire de formation des gamètes (gamétogénèse) puis une phase de fusion de ces gamètes appelée fécondation. On distingue l'ovogénèse, processus de synthèse des ovocytes, et la spermatogénèse, processus de synthèse des spermatozoïdes. Lors de la gamétogénèse, les cellules vont subir une réduction du nombre de chromosomes pour passer de 46 (nombre spécifique de l'espèce humaine) à 23 chromosomes lors de la méiose.

### A. Gamétogénèse

#### a. Ovogenèse

L'ovogenèse est le processus de transformation des cellules souches appelées ovogonies en gamètes femelles ou ovocytes qui, à l'issue d'une série de changements tant cytologiques que moléculaires vont acquérir la capacité à être fécondés et à supporter l'embryogenèse. La chronologie de ces transformations s'étale sur des années. Elle débute au cours de la vie embryonnaire mais n'aboutit à la formation de gamète femelle qu'à partir de la puberté et se déroule de façon cyclique entre la puberté et la ménopause dans l'appareil génital féminin (Figure 1).



## L'appareil génital féminin interne

D'un point de vue anatomique, l'appareil génital féminin interne comporte :

- Deux ovaires, un de chaque côté, siège de la production des gamètes et de la synthèse d'hormones sexuelles ;
- Deux trompes de Fallope, une de chaque côté, lieu de la fécondation ;
- L'utérus, organe supportant le développement embryonnaire. Il est connecté aux deux trompes sur ses bords supérieurs, et au vagin via le col sur le bord inférieur. Il est tapissé sur ses faces latérales et supérieures d'une couche de cellules endométriales.
- Le vagin, lieu de dépôt des spermatozoïdes lors d'un rapport sexuel.

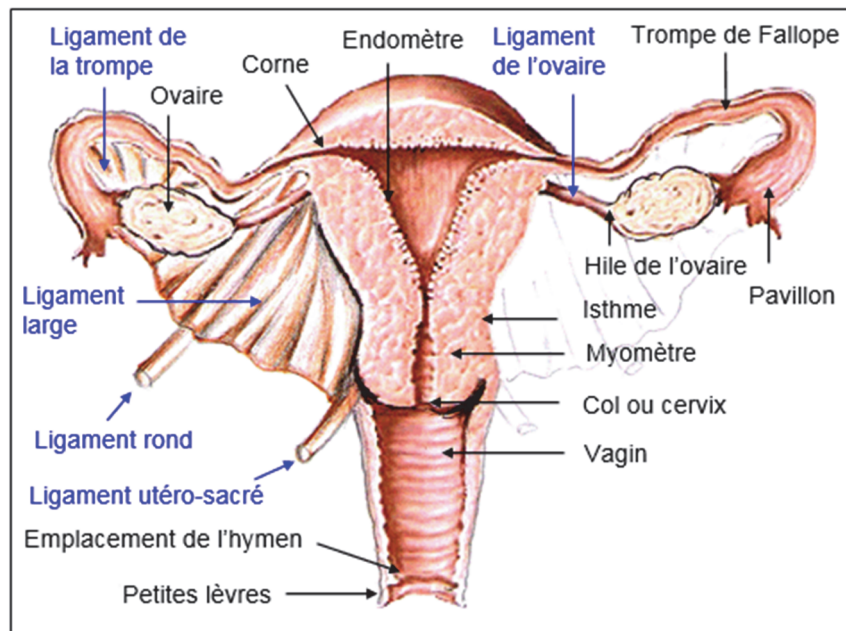


Figure 1 : Appareil génital féminin

## L'ovocyte

### Définition

L'ovocyte, gamète féminin, est une grande cellule sphérique immobile d'environ 120  $\mu\text{m}$  de diamètre en fin de croissance. Il est obtenu suite à deux processus successifs se déroulant dans l'ovaire : l'ovogenèse et la folliculogenèse. L'ovocyte est entouré d'une enveloppe translucide formée de protéines : la zone pellucide (Figure 2). L'ovocyte mature est inclus dans

un nuage de cellules nourricières, appelé cumulus oophorus, dont la couche en contact avec la zone pellucide est nommée corona radiata.

### Structure

Contrairement au gamète masculin, c'est une cellule qui n'a pas terminé sa maturation nucléaire et qui reste entourée de ses enveloppes, formant ainsi un ensemble de 2 à 3 mm de diamètre, dont 120µm pour l'ovocyte lui-même.

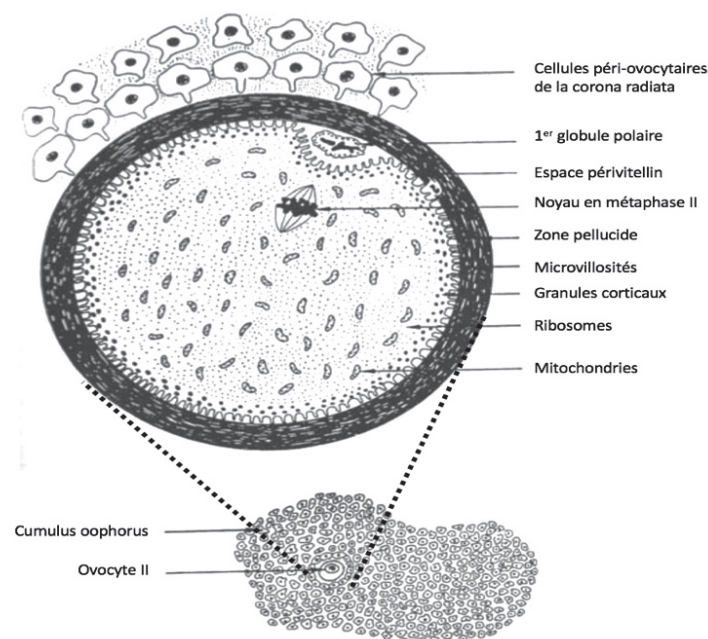


Figure 2 : Ovocyte II au sein d'un cumulus oophorus.

### L'ovogenèse

L'ovogenèse est le processus de transformation des cellules souches appelées ovogonies en gamètes femelles ou ovocytes qui, à l'issue d'une série de changements tant cytologiques que moléculaires vont acquérir la capacité à être fécondés et à supporter l'embryogenèse. Pour cela, l'ovocyte est dépendant des cellules qui l'entourent avec lesquelles il forme une unité morphologique, fonctionnelle et évolutive appelée follicule ovarien. La chronologie de ces transformations s'étale sur des années. Elle débute au cours de la vie embryonnaire à partir de la 9<sup>e</sup> semaine de développement, s'interrompt provisoirement peu avant la naissance et reprend

à la puberté sur un rythme cyclique jusqu'à la ménopause où elle s'arrête définitivement (Czyba et Montella 1993).

#### *La période embryonnaire et fœtale*

A la fin du 1er mois de développement, les cellules germinales primordiales migrent dans les gonades en formation. Elles se différencient en ovogonies qui se multiplient par mitose : c'est la phase active de prolifération. Du 5ème au 7ème mois de développement, une partie des ovogonies se différencie en ovocytes primaires entourés chacun d'une couche de cellules folliculaires formant ainsi des follicules primordiaux.

Dès la vie fœtale, il existe une dégénérescence de la réserve d'ovocytes. Ce stock représente environ 7 millions à 7 mois, 1 à 2 millions à la naissance, 400 000 à la puberté dont 400 uniquement seront potentiellement émis de façon cyclique de la puberté à la ménopause.

#### *De la naissance à la puberté*

A la naissance les ovocytes ont un diamètre de 50 à 70µm. La majorité régresse en grand nombre de sorte qu'il n'en restera que 400 000 à la puberté.

Pour certains débute la longue phase de croissance ovocytaire sous l'effet de substances transmises par les cellules folliculeuses. Elle ne s'achève qu'au moment de la maturation du follicule durant la folliculogénèse. Le volume de l'ovocyte augmente de 40µm à 120µm, le noyau produit de grandes quantités d'ARN, le cytoplasme est le siège de nombreuses synthèses protéiques et s'enrichit progressivement en organites divers. L'ovocyte excrète des glycoprotéines qui forment la zone pellucide.

#### *De la puberté à la ménopause*

La maturation de l'ovocyte est synchrone de la maturation folliculaire. Ce phénomène ne va concerner qu'un petit nombre de follicules, environ 400 à 500 durant la période d'activité génitale ovarienne chez la femme. Il correspond à l'ensemble des changements cytoplasmiques et nucléaires que subit l'ovocyte primaire à l'intérieur du follicule mûr suite à la décharge gonadotrope ovulante de LH (Luteinizing hormon).

## *Chronologie de la croissance folliculaire*

La maturation des follicules dure au minimum 3 mois et se déroule en 3 étapes (Figure 3) :

- 1) Croissance des follicules ovariens jusqu'au stade pré-antral : elle débute environ 3 mois avant l'ovulation et permet la transformation d'environ 500 follicules primordiaux quiescents en follicules préantraux. Cette phase, essentiellement contrôlée par des facteurs intraovariens est indépendante des hormones gonadotropes (FSH et LH).
- 2) Recrutement d'une cohorte de follicules préantraux : grâce à leur sensibilité à la FSH, environ 5 follicules au niveau de l'un des deux ovaires vont poursuivre leur croissance en formant un antrum. Ils ont une taille de 3 à 5mm et vont se développer plus rapidement que les autres follicules préantraux qui dégénèrent par phénomène d'atrésie.
- 3) Dominance et maturation du follicule ovulatoire : au début de la phase folliculaire entre J1 et J6 du cycle ovarien, un des follicules se développe plus rapidement que les autres : c'est la sélection du follicule dominant. Celui-ci poursuivra une croissance fortement accélérée jusqu'au stade pré-ovulatoire (20mm de diamètre) grâce à sa sensibilité plus importante vis-à-vis de la FSH dont la sécrétion augmente régulièrement durant la phase folliculaire du cycle. Le follicule dominant induit l'involution des autres follicules à antrum de la cohorte par la sécrétion de facteurs paracrines (inhibine et FPR). L'antrum du follicule dominant augmente de volume et la vascularisation se développe pour apporter les hormones circulantes nécessaires à sa croissance et la sécrétion dans la circulation périphérique de l'œstradiol et de la progestérone. Les cellules de la thèque interne et celles de la granulosa acquièrent des récepteurs à LH qui stimulent la stéroïdogénèse thécale favorisant la synthèse des androgènes qui seront ensuite aromatisés par les cellules de la granulosa afin de sécréter de l'œstradiol. Au-delà d'un certain seuil circulant, les concentrations d'œstradiol déclenchent la décharge ovulante de LH et de FSH. L'ovulation survient 35 à 36 heures après ce pic.

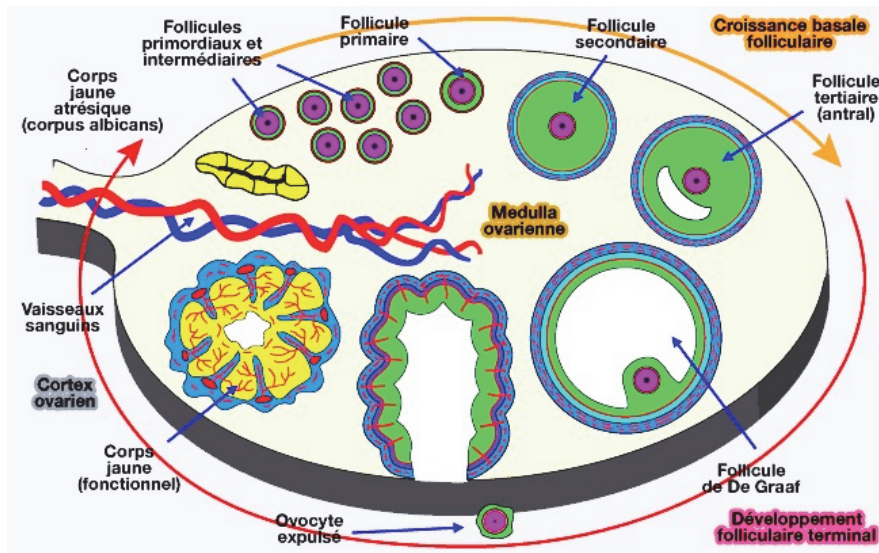


Figure 3 : Chronologie de la croissance folliculaire.

### Cycle ovarien et contrôle neuroendocrinien

Le cycle ovarien dure en moyenne 28 jours du premier jour d'une menstruation au premier jour de la suivante. Il est organisé en deux parties avec une phase folliculaire suivie directement d'une phase lutéale (Figure 4). La phase folliculaire fait directement suite aux règles et correspond à la croissance d'une cohorte de follicules jusqu'à l'ovulation vers le 14<sup>e</sup> jour du cycle. Au cours de la phase lutéale, les cellules de la granulosa du follicule qui a subi l'ovulation se différencient en cellules lutéales formant le corps jaune qui se maintient jusqu'au 25<sup>e</sup> jour du cycle puis dégénère par lutéolyse engendrant les règles suivantes.

Le cycle ovarien est contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus assure une sécrétion pulsatile de GnRH indispensable au fonctionnement des cellules gonadotropes hypophysaires qui excrètent de façon pulsatile la LH et la FSH.

La FSH stimule la prolifération des cellules de la granulosa dans les follicules antraux, et la sécrétion d'aromatase qui stimule la sécrétion d'œstradiol (et d'inhibine). L'effet de la LH varie en fonction de la phase du cycle ovarien. Durant la phase folliculaire, elle stimule la production d'androstènediol par les cellules de la thèque interne puis, avec le pic de LH, induit l'ovulation. Au cours de la phase lutéale, la LH stimule la sécrétion de progestérone par les cellules du corps jaune.

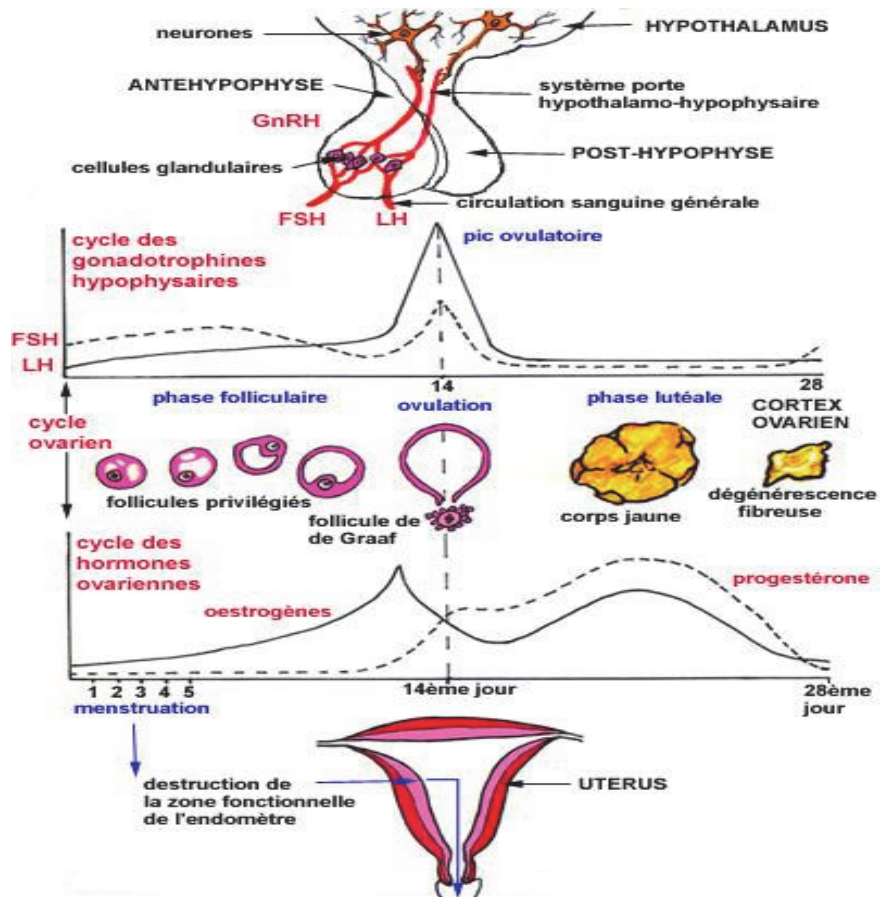


Figure 4 : Cycles des gonadotrophines hypophysaires et des hormones ovariennes.

## b. Spermatogenèse

### L'appareil génital masculin

L'appareil génital masculin (Figure 5) comprend :

- Deux testicules, logés dans une poche revêtue de peau, le scrotum, assurant deux fonctions : la production de spermatozoïdes et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes.
- Deux épидидymes, coiffant chaque testicule et assurant la synthèse de 20% du volume du sperme ainsi que le transport et la maturation des spermatozoïdes.
- Deux canaux déférents émergeant de chaque épидидyme et se terminant par une région dilatée, l'ampoule, où sont stockés les spermatozoïdes avant d'être éjectés par l'urètre lors de l'éjaculation.
- L'urètre assurant deux fonctions : le transport du sperme au moment de l'éjaculation et celui de l'urine lors de la miction.
- Les glandes annexes jouant un rôle important dans la composition du sperme :

- Les vésicules séminales élaborant une grande partie du plasma séminal qui constitue 60% volume de l'éjaculat ;
- La prostate, sécrétant un liquide constituant 20% du volume du sperme qui contribue à la mobilité et au maintien en vie des spermatozoïdes. Ce liquide contient entre autres une protéase, appelée PSA (antigène prostatique spécifique) responsable de la liquéfaction du sperme après l'éjaculation ;
- Deux glandes de Cowper ou glandes bulbo-urétrales situées de chaque côté de l'urètre et sécrétant le liquide pré-éjaculatoire (<1% du volume du sperme) permettant la lubrification de l'urètre peu avant l'éjaculation.

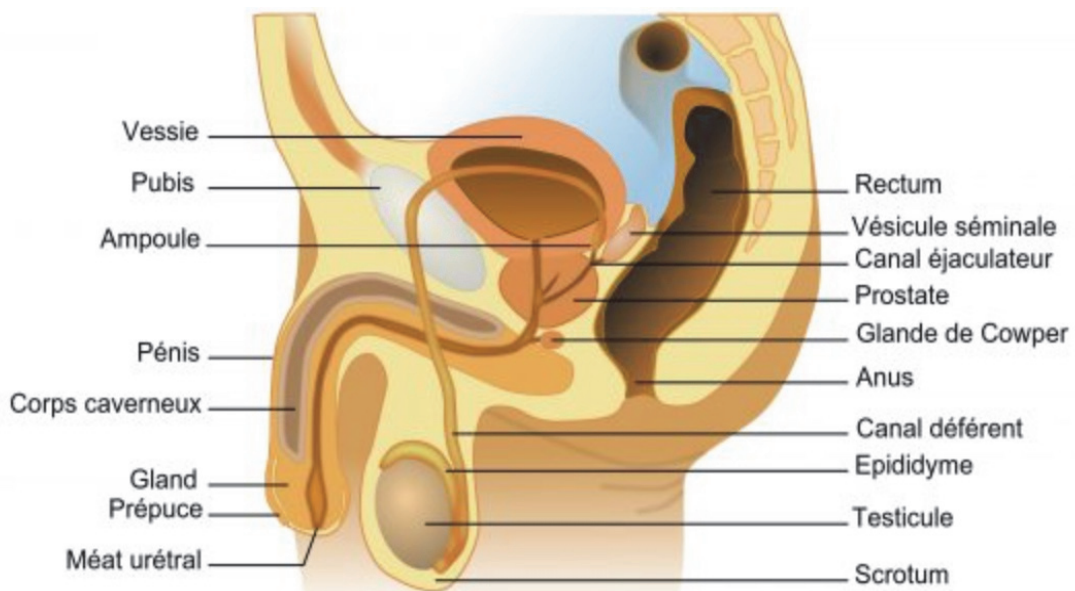


Figure 5 : L'appareil génital masculin.

## Le spermatozoïde

### *Définition :*

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée ayant pour fonction

- Le transport du génome paternel haploïde depuis le testicule jusqu'au lieu de fécondation de l'ovocyte ;
- La reconnaissance spécifique d'espèce au niveau de la zone pellucide de l'ovocyte ;



- La pénétration des enveloppes de l'ovocyte (cumulus oophorus, corona radiata, zone pellucide et membrane plasmique).

*Structure :*

Le spermatozoïde est une petite cellule mobile d'environ 60 µm de longueur, constituée de 3 parties visibles au microscope optique : la tête, le collet et le flagelle (Figure 6).

- La tête :

Elle est grossièrement ovoïde de face, légèrement aplatie latéralement et un peu effilée vers l'avant montrant de ce fait en coupe sagittale un aspect en flamme de bougie. Elle est constituée d'un noyau et d'un acrosome, enveloppés par une mince couche hyaloplasmique et par la membrane plasmique.

Le noyau occupe la majeure partie de la tête, dont il a la forme et ne contient pas de nucléoles. Contrairement aux cellules somatiques où l'ADN est compacté grâce aux molécules d'histones, l'ADN contenu dans les spermatozoïdes s'enroule autour de protéines de compaction riches en acides aminés soufrés et de taille très inférieure aux histones appelées protamines dont la particularité est de conférer à l'ADN des spermatozoïdes une compaction bien plus importante. L'acrosome est une vésicule aplatie, recouvrant les 2/3 supérieurs du noyau. Sa texture est finement granuleuse et uniforme. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques qui interviendront dans la traversée des enveloppes de l'ovocyte.

Un espace sous-acrosomal et péri-acrosomal constitue défini l'hyaloplasme. Il ne contient aucun organite, mais en arrière de l'acrosome il est condensé en une plaque circulaire : la cape post-acrosomale.

- Le collet :

C'est la zone de jonction entre la tête et le flagelle, dans laquelle on distingue deux constituants entourés par une mince couche d'hyaloplasme et la membrane plasmique : un appareil centriolaire et une pièce connective. L'appareil centriolaire est représenté par le seul centriole proximal. Sa structure est classique, avec 9 triplets de microtubules torsadés.



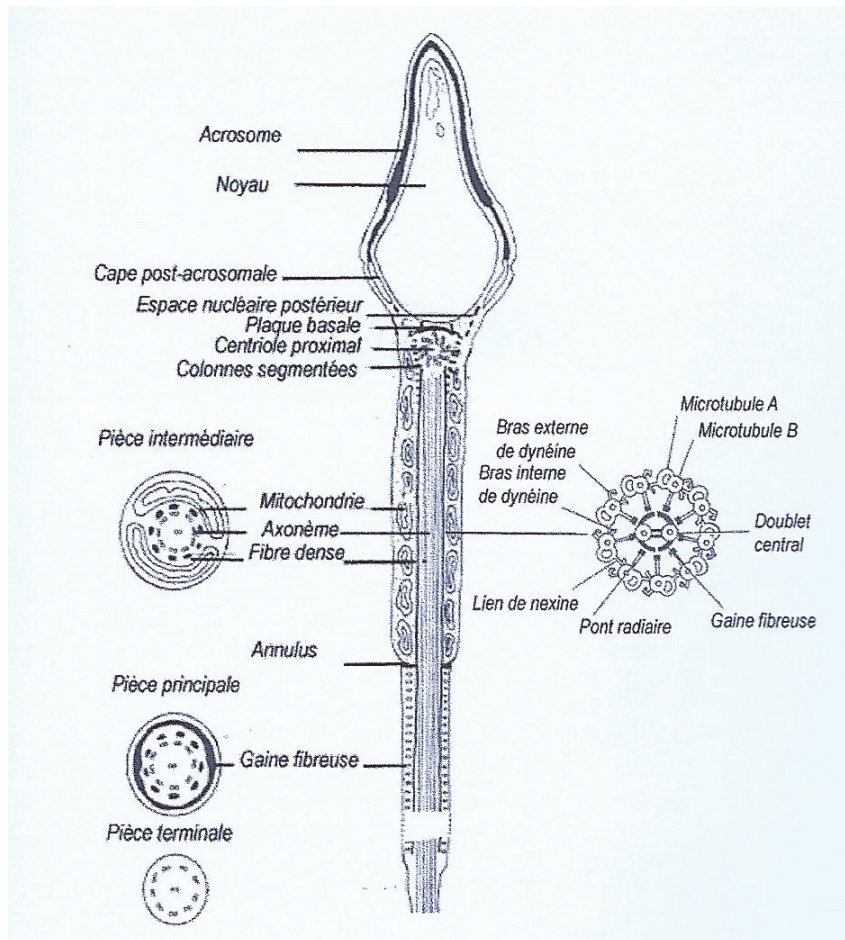


Figure 6 : Ultrastructure du spermatozoïde. D'après biologie de la reproduction humaine éditions Sauramps médical, J-C. Czyba et A. Montella, 1993.

La pièce connective comporte une formation en entonnoir dont la base est du côté du noyau et dont la paroi est composée par l'association de 9 colonnes segmentées formées chacune par l'empilement d'une douzaine de disques sombres. Cette structure adhère vers sa base à une plaque basale disposée au-dessus du centriole et se prolonge par les fibres denses du flagelle.

- Le flagelle :

Il s'agit d'une structure spécifique au spermatozoïde qui lui confère sa mobilité. A partir du collet, on distingue sur sa longueur 3 parties de diamètres décroissants : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Elles ont toutes en commun une structure axiale, l'axonème, et elles diffèrent par les structures concentriques. Le manchon mitochondrial, formé d'une spirale d'une vingtaine de mitochondries mises bout à bout, entoure l'ensemble axonème-fibres denses dans la pièce intermédiaire uniquement.

*Caractéristiques physiologiques :*

- Mobilité :

Les spermatozoïdes sont capables de se déplacer grâce aux mouvements de leur flagelle. C'est une propriété essentielle, qui conditionne leur pouvoir fécondant. Le mouvement flagellaire, de type ondulatoire, naît au niveau du col et se propage vers l'extrémité. Le déplacement du spermatozoïde se fait selon une sinusoïde de faible amplitude suivant une direction plus ou moins rectiligne et sa vitesse dépend de son environnement (liquide séminal liquéfié ou non, glaire cervicale, liquide utéro-tubaire). Dans un sperme, tous les spermatozoïdes ne sont pas mobiles.

- Fécondance :

Le spermatozoïde éjaculé est incapable de féconder. Pour devenir fécondant il devra ultérieurement être capable dans le tractus génital féminin. Le terme de fécondance est assez imprécis car il désigne l'ensemble des propriétés du spermatozoïde le rendant apte à toutes les étapes de la fécondation. Ceci implique donc au moins qu'il soit morphologiquement normal et qu'il ait une bonne mobilité progressive. La fécondance dépend aussi de l'équipement enzymatique acrosomal, du degré de condensation chromatinien, des caractéristiques membranaires, de la présence de protéines cytoplasmiques et sans doute aussi d'autres paramètres jusqu'à présent mal définis. Dans un sperme les spermatozoïdes ne sont pas tous féconds.

## **Spermatogenèse**

### *Définition*

La spermatogenèse est le processus biologique par lequel une cellule germinale indifférenciée initiale, la spermatogonie, se transforme progressivement en une cellule germinale hautement différenciée, le spermatozoïde (Figure 7). Elle commence dans les testicules au début de la puberté et se poursuit toute la vie grâce au maintien d'un pool de spermatogonies souches. Les cordons sexuels, jusqu'alors pleins dans les testicules de l'enfant, se perméabilisent au début de la puberté et se transforment en tubes séminifères contournés, atteignant une longueur d'environ 50 à 60 cm. Ils sont si nombreux que leur longueur totale peut atteindre 300 à 350 m chez un homme adulte. Ils sont constitués par un épithélium germinal

composé de deux différentes populations cellulaires : les cellules de soutien, cellules de Sertoli, et les différents stades des cellules germinales en division et en différenciation. La maturation des cellules germinales débute avec les spermatogonies situées en périphérie des tubes séminifères sous la membrane basale et progresse en direction de la lumière en passant par les spermatocytes I (spermatocytes primaires), les spermatocytes II (spermatocytes secondaires), les spermatides jusqu'aux spermatozoïdes matures.

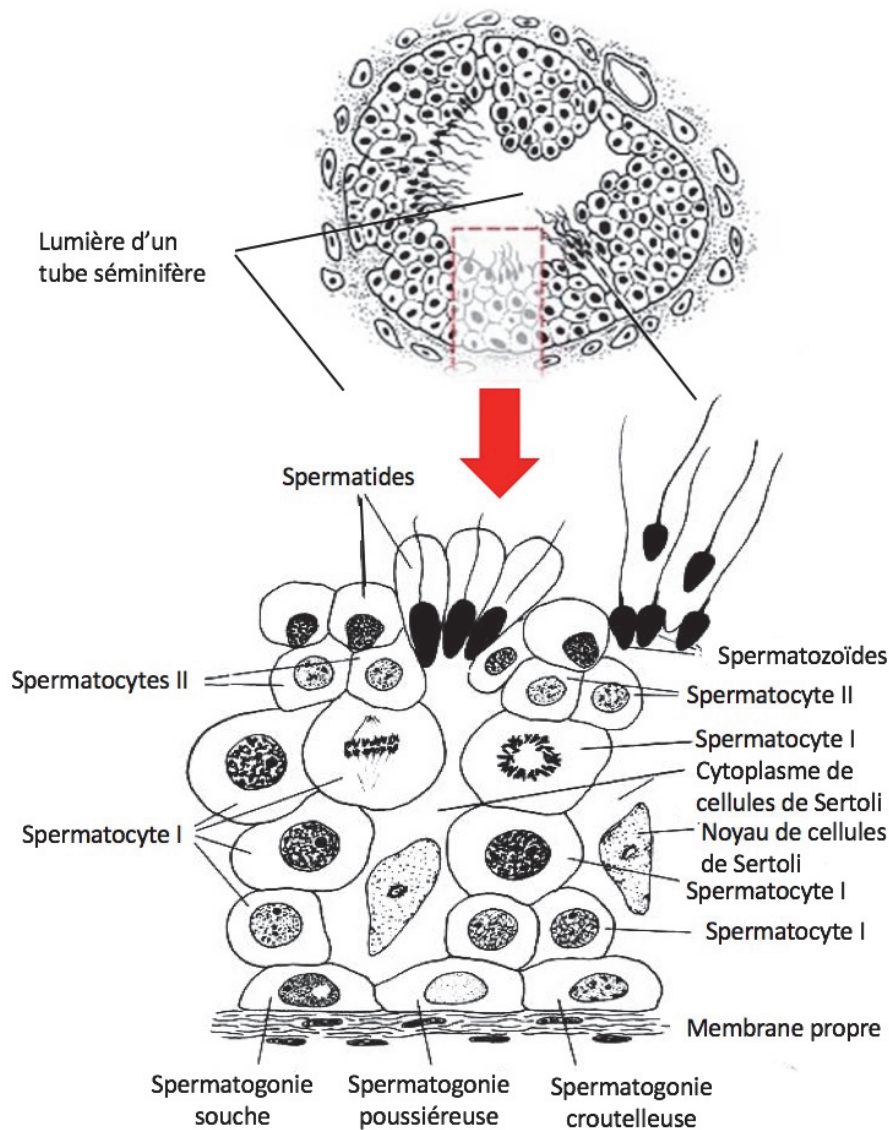


Figure 7 : Schéma d'une coupe de tube séminifère montrant les acteurs de la spermatogenèse.

### *L'épithélium germinal :*

L'épithélium germinal contient les cellules de soutien de Sertoli et les cellules germinales. Les cellules de Sertoli entourent, avec leurs prolongements cellulaires de manière plus ou moins complète, les différents types de cellules germinales. La spermatogenèse s'effectue ainsi au contact étroit des cellules de Sertoli qui n'ont pas seulement une fonction de soutien et de nutrition, mais aussi une activité sécrétrice et phagocytaire. Elles sont reliées les unes aux autres par des jonctions serrées (tight junction) délimitant ainsi deux zones dans l'épithélium : une zone basale dans laquelle sont alignées les spermatogonies et une zone adluminale où se développent les cellules de tous les autres stades de la spermatogenèse. Ces jonctions serrées permettent notamment d'établir une barrière hémato-testiculaire dans les tubes séminifères protégeant les cellules haploïdes des cellules immunitaires circulantes du fait de leurs caractéristiques antigéniques spécifiques.

### *Déroulement :*

La spermatogenèse se déroule en 3 phases :

- Une phase proliférative de multiplication des spermatogonies ;
  - Une phase de réduction chromosomique ou méiose ;
  - Une phase de différenciation : la spermiogénèse.
- 
- Phase proliférative : multiplication des spermatogonies

Les spermatogonies sont des cellules souches diploïdes de petite taille (10-15  $\mu\text{m}$ ) et de forme ovale dont le nombre total atteint 1 milliard dans les deux testicules. Elles se situent dans la couche basale de l'épithélium germinal en périphérie des tubes séminifères. On distingue principalement trois types de spermatogonies selon l'aspect de leurs noyaux : spermatogonies A à noyau arrondi et chromatine dense (Ad), spermatogonies A dites poussiéreuses à noyau ovale pâle (Ap) et spermatogonies B (Figure 8). Les spermatogonies de type A sont considérées comme des cellules souches. Les spermatogonies Ad se divisent et forment leurs homonymes (division homonyme) permettant ainsi le maintien du pool de cellules souches. Le début de la spermatogenèse commence par une division hétéronyme, suite à laquelle les deux cellules filles restent liées les unes aux autres par un mince pont cytoplasmique. C'est à travers ce processus qu'une spermatogonie Ap est engagée dans le processus de la spermatogenèse.

Après une division mitotique supplémentaire, les spermatogonies de type B se divisent également par mitose et donnent les spermatocytes I (spermatocytes primaires).

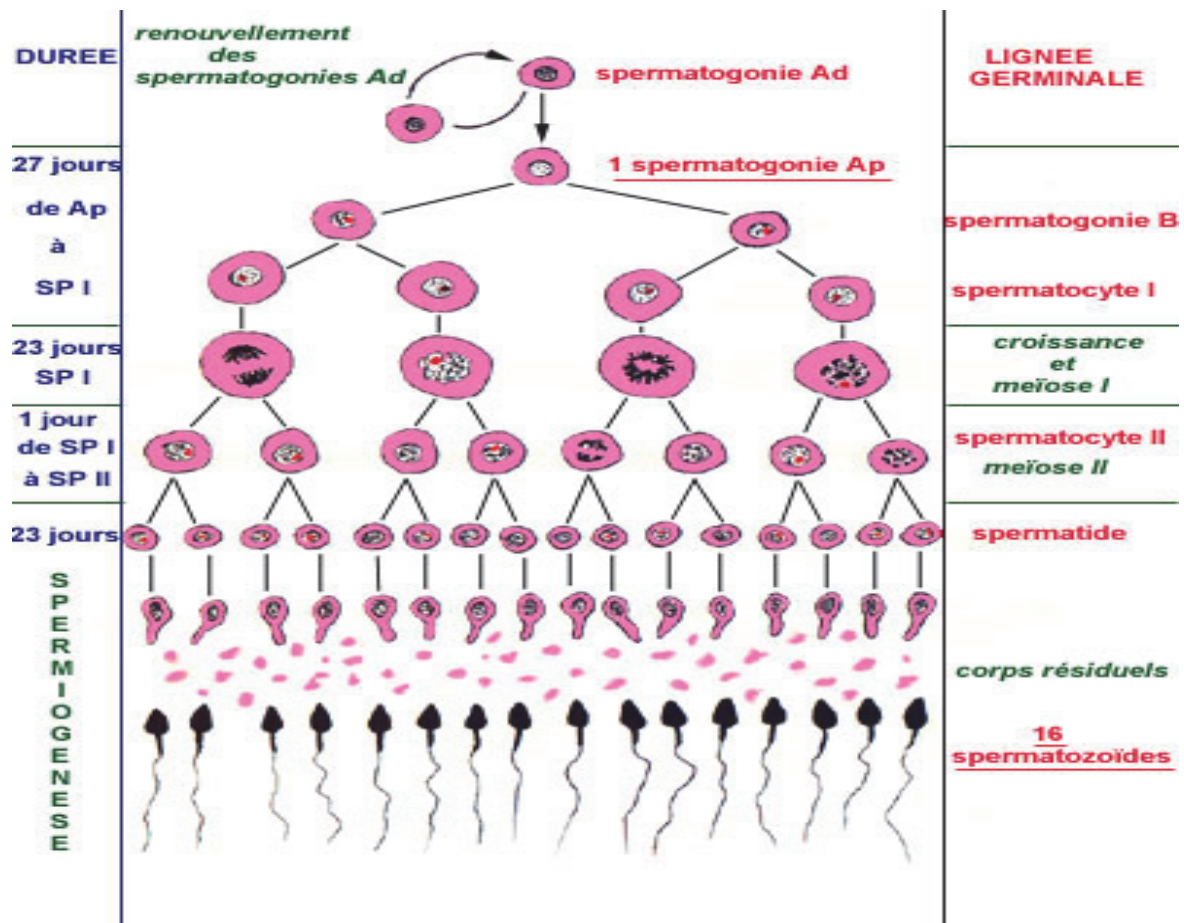


Figure 8 : Cinétique de la spermatogenèse.

- Phase de réduction chromosomique : la méiose

Elle aboutit à partir d'un spermatocyte I diploïde à un spermatocyte II (spermatocytes secondaire) haploïde. Elle est composée de deux divisions cellulaires dont la première est précédée d'une phase de dédoublement du contenu en ADN. Les spermatocytes I nouvellement formés quittent la zone basale et atteignent la zone adluminale en rompant transitoirement les complexes jonctionnels des cellules de Sertoli.

➤ Méiose I :

Avant l'entrée en méiose, les spermatocytes I entament la phase S et dédoublent leur contenu en ADN. Après la phase S, ces cellules, nettement visibles au microscope optique, entament les 5 stades complexes de la prophase I méiotique :

- Le stade leptotène : les chromosomes apparaissent sous la forme de filaments fins enchevêtrés et rattachés par leurs extrémités télomériques à l'enveloppe nucléaire par la plaque d'attache. Chaque chromosome est composé de deux chromatides sœurs attachés l'un à l'autre : ceux provenant du père ensemble et ceux provenant de la mère ensemble.
- Le stade zygotène : les chromosomes s'apparient partiellement par paires homologues grâce à une structure protéique : le complexe synaptonémal. Il s'agit d'une structure complexe constituée d'un élément central relié à deux éléments latéraux. Les cohésines lient la chromatine au complexe synaptonémal de chaque zone des chromosomes impliquée dans les phénomènes ultérieurs de crossing-over.
- Le stade pachytène : stade le plus long de la méiose avec une durée d'environ 16 jours chez l'homme. Les chromosomes s'épaississent et l'appariement des chromosomes homologues y est strict et complet. Les gènes homologues sont juxtaposés et les centromères exactement appariés. Chaque paire chromosomique constitue un bivalent. Les chromosomes sexuels chez l'homme ne s'apparient que par leur partie pseudo-autosomique et sont isolés contre l'enveloppe nucléaire. Des nodules de recombinaison intra-chromosomiques apparaissent et sont le siège d'échanges entre les chromatides homologues. Cette phase a une importance considérable dans le brassage chromosomique (crossing-over).
- Le stade diplotène : stade de séparation des chromosomes homologues. Les chromosomes restent attachés en plusieurs points ou chiasmas au niveau desquels deux des quatre chromatides semblent s'entrecroiser. Ils sont les témoins des événements de recombinaison génétique. Pour le bon déroulement de la méiose il en faut au minimum un par chromosome avec en moyenne 2 à 3.
- Le stade diacinèse : la chromatine se condense à nouveau et les télomères se détachent de l'enveloppe nucléaire qui est résorbée.

Au terme de la prophase I les spermatocytes primaires entament la métaphase I. Les paires de chromosomes homologues (bivalents) se placent en vis-à-vis de part et d'autre du plan

équatorial. Les chiasmas entre chromosomes homologues se placent de part et d'autre de la plaque équatoriale. Leur orientation se fait par un phénomène de « ségrégation aléatoire ». Durant cette phase, deux kinétochores s'attachent à chaque centrosome grâce à la formation d'un fuseau méiotique. Les deux kinétochores d'un même centrosome sont dirigés vers le même pôle d'une cellule, et ceux du chromosome homologue vers le pôle opposé.

La contraction de la fibre du fuseau achromatique entraîne la disjonction des deux chromosomes homologues de chaque paire. Ils migrent aux pôles opposés, tirés par les microtubules accrochés à un kinétochore au niveau d'un centromère grâce à la dépolymérisation de la tubuline : c'est l'anaphase I. Il n'y a pas de clivage des centromères, les chromatides homologues restent attachés au lieu de se séparer comme en mitose. C'est lors de l'anaphase que se déroule la recombinaison inter-chromosomique liée à la répartition aléatoire des chromosomes le long de la plaque équatoriale. Le fuseau méiotique disparaît alors que l'enveloppe nucléaire se reconstitue en télophase I. La cytotéière demeure incomplète. Chaque spermatocyte I donne deux spermatocytes II qui restent unis par un pont cytoplasmique. Les dérivés d'une cellule souche forment donc un syncytium de cellules filles, qui doublent à chaque génération. La formation du syncytium assure que l'ensemble des processus se déroule de façon synchrone dans chaque génération. Cette première division de méiose est qualifiée de réductionnelle car elle est à l'origine de deux cellules filles contenant chacune 23 chromosomes (N), constitués chacun de deux chromatides (2C).

#### ➤ Méiose II :

Les spermatocytes II abordent directement la deuxième division méiotique pour aboutir à des spermatides. Comme il n'y a ni duplication de l'ADN, ni recombinaison du matériel génétique, la deuxième division méiotique progresse plus rapidement. Elle ne dure qu'environ 5 heures, de ce fait, il est donc rare d'observer des spermatocytes secondaires sur les coupes histologiques. La division des chromatides d'un spermatocyte secondaire donne naissance à deux spermatides haploïdes contenant 23 chromosomes mais à ce stade à une seule chromatide. Ceci est dû au clivage des centromères qui permet la séparation des chromatides sœurs, chacune vers un pôle du fuseau. La cytotéière est encore incomplète avec la persistance des ponts cytoplasmiques. Au final, chaque spermatogonie diploïde donne 16 spermatides haploïdes.



- Phase de différenciation : la spermiogénèse

Les spermatides sont avec les spermatozoïdes les plus petites cellules de l'épithélium germinale. A partir de ce stade, les cellules ne se divisent plus. Elles sont activement transformées lors de la spermiogénèse en spermatozoïdes au cours d'un processus de modification morphologique synchrone de 23 jours au contact des cellules de Sertoli. On y observe une évolution de l'acrosome, du contenu nucléaire et le développement du flagelle provoquant un allongement de la spermatide qui devient pyriforme (Figure 9).

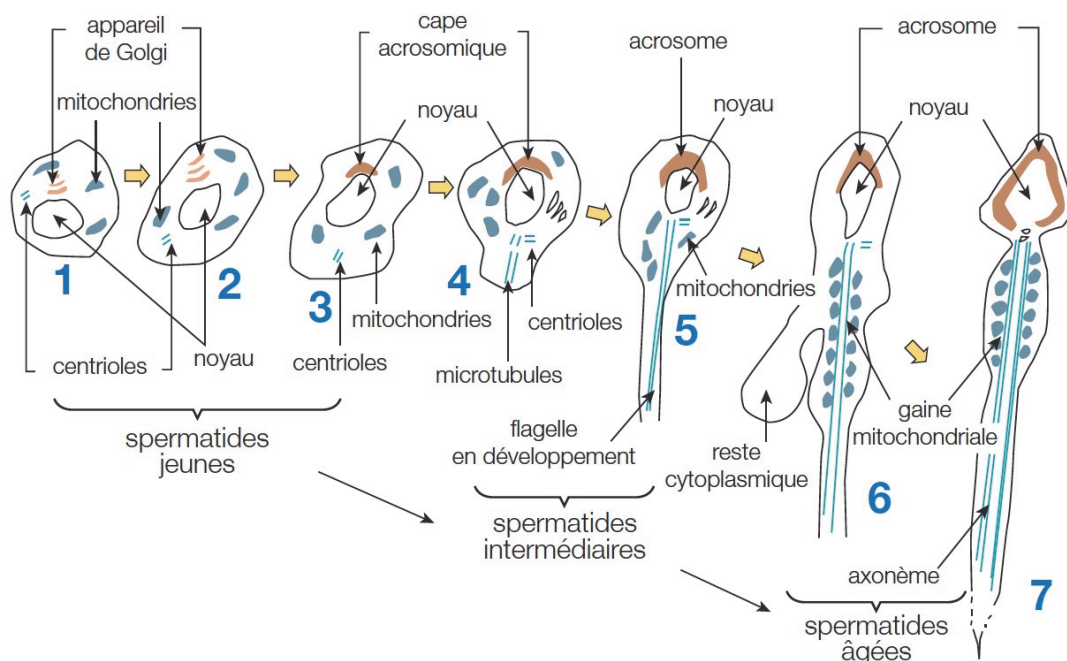


Figure 9 : Schéma simplifié de l'évolution morphologique du spermatozoïde au cours de la spermiogénèse (Extrait de Cahier Bioforma n°42 1999).

Parallèlement aux modifications morphologiques, une transition protéique a lieu dans le noyau. Il perd tout son contenu en ARN, protéines non-histones et enzymes, et ne conserve plus que l'ADN chromatinien. L'état compacte du génome tel qu'il apparaît dans les spermatozoïdes éjaculés est l'expression de profonds remaniements structuraux et chimiques qui affectent le noyau au cours de la spermiogénèse. Initialement sphérique dans les jeunes spermatides, il s'allonge et s'aplatit progressivement au fur et à mesure de la maturation. La chromatine initialement diffuse subit des modifications structurales qui lui permettent d'atteindre un niveau de condensation maximal. Cette compaction résulte du remplacement successif des histones liées à l'ADN par une nouvelle catégorie de protéines nucléaires plus basiques, riches en



arginine, lysine et cystéine : les protamines. Cette réorganisation plus compacte de l'ADN entraîne un blocage de la transcription des gènes et permettrait une meilleure protection contre les éventuelles mutations et faciliterait la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation. La spermatogenèse humaine dure 74 jours et est soumise à des variations individuelles considérables en terme de quantité et de qualité.

### *Transit des spermatozoïdes dans les voies génitales masculines*

Environ 100 millions de spermatozoïdes sont produits par jour et 50 à 200 millions en moyenne sont libérés par éjaculation. A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes sont transportés dans l'épididyme et le canal déférent. Durant leur transit, ils poursuivent leur maturation fonctionnelle sous l'effet des sécrétions vésiculaires principalement épididymaires.

- Voies spermatiques intra testiculaires

Les tubes séminifères débouchent dans les tubes droits qui s'ouvrent au niveau du corps d'Highmore dans un réseau labyrinthique de canaux : le rete testis. Les spermatozoïdes, immatures et immobiles, traversent passivement les voies spermatiques intratesticulaires poussés par les contractions musculaires lisses des voies spermatiques et la pression du fluide testiculaire sécrété de façon continue par les cellules de Sertoli.

- Voies spermatiques extra testiculaires

Elles débutent par les cônes efférents, se poursuivent par le canal épididymaire, le canal déférent et s'achèvent par le canal éjaculateur. Ces voies génitales paires débouchent alors dans l'urètre prostatique, voie urogénitale impaire et médiane. 10 à 12 cônes efférents assurent le transport des spermatozoïdes du rete testis à la tête de l'épididyme.

Le canal épididymaire, accolé à la face postérieure du testicule, est contenu dans l'épididyme. Il comprend une tête dans laquelle pénètrent les cônes efférents, un corps et une queue d'où émerge le canal déférent. Les cellules glandulaires qui le tapissent ont de multiples rôles importants : réabsorption de 90% du fluide testiculaire au cours du trajet épididymaire, modification de sa composition par la sécrétion de nombreuses substances assurant la nutrition des spermatozoïdes, l'acquisition de la mobilité et du pouvoir fécondant. Elles produisent un facteur de décapacitation se fixant sur la membrane des spermatozoïdes pour empêcher

l'expression prématurée de leur pouvoir fécondant. La durée moyenne du passage des spermatozoïdes à travers l'épididyme est de l'ordre de 12 jours. Ceux-ci ne traversent pas l'épididyme à la même vitesse. En effet, des spermatozoïdes de différentes générations se trouvent mêlés au cours du transit.

Le canal déférent fait suite au canal épидидymaire et assure le transit des spermatozoïdes jusqu'à l'urètre, via le canal éjaculateur. Il joue un rôle primordial au moment de l'éjaculation. Les plis de la muqueuse se distendent et permettent ainsi le passage, dans la lumière canalaire dilatée, des nombreux spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme.

Durant leur trajet, les spermatozoïdes sont mélangés à des liquides produits par les glandes annexes (prostate et vésicules séminales). Le mélange de ces liquides donne le sperme. Durant la phase pré-éjaculatoire, il y a une première production d'un liquide muqueux permettant la lubrification de l'urètre par les glandes bulbo-urétrales. Au moment de l'éjaculation, la première partie de l'éjaculat, très riche en spermatozoïdes, est également constituée des sécrétions épидидymaires et des sécrétions prostatiques. La deuxième partie de l'éjaculat, quant à elle, est constituée des sécrétions des vésicules séminales et est beaucoup plus riche en fructose.

### *Contrôle neuroendocrinien*

De nombreux facteurs physico-chimiques conditionnent la spermatogenèse. Elle ne se déroule efficacement que dans le scrotum, dont la température est inférieure de 3 à 5 degrés par rapport à la température corporelle, et elle est inexistante dans les testicules intra-abdominaux (cryptorchidie, par anomalie de la descente testiculaire). De plus, la spermatogenèse est soumise à un contrôle hormonal complexe, à plusieurs étages, lui-même modulé par le système nerveux (Figure 10).

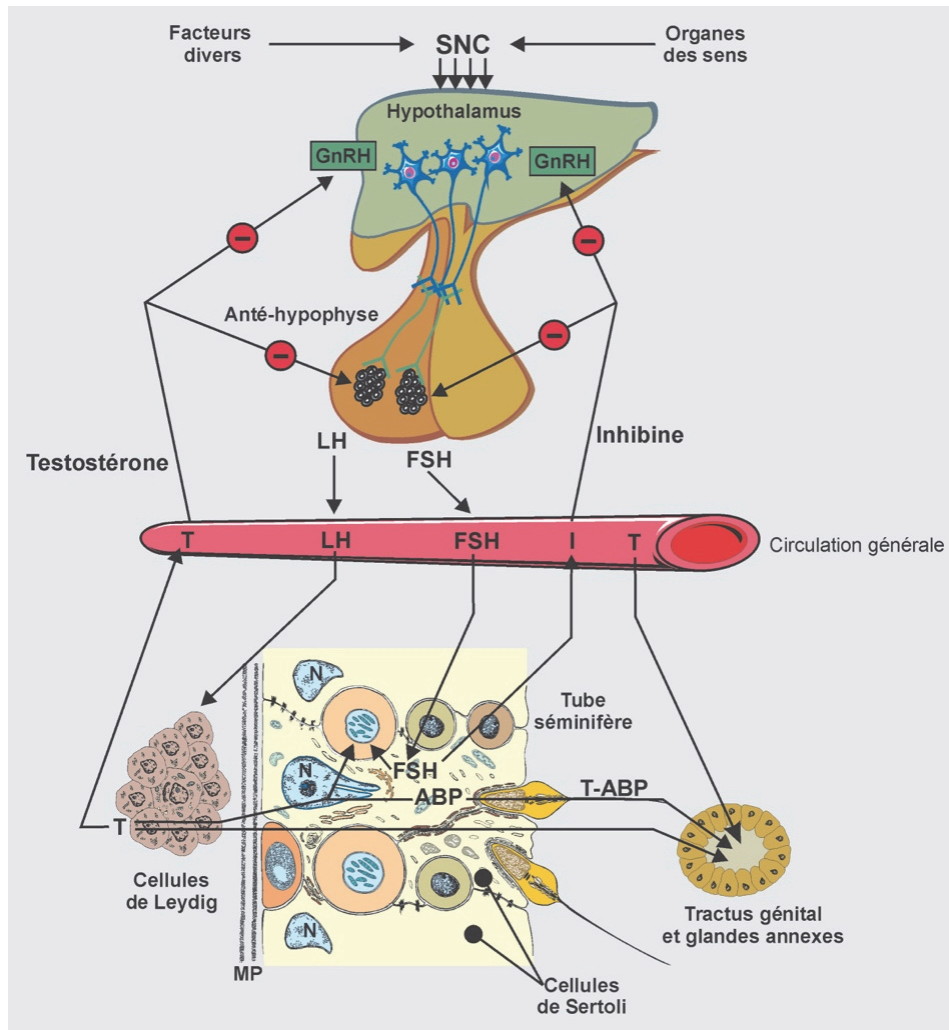


Figure 10 : Contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse (d'après Reproduction et environnement 2010 [www.ipubli.inserm.fr](http://www.ipubli.inserm.fr))

## B. Fécondation

### a. Transit des spermatozoïdes dans les voies génitales féminines

Les spermatozoïdes en suspension dans le liquide séminal sont émis dans le tractus génital féminin au fond du vagin lors de l'éjaculation (Figure 11). Ils entament immédiatement la traversée du col en passant par la glaire cervicale qui joue un rôle de filtre, leur offre des conditions de température et de pH favorables à la liquéfaction du coagulum. Les spermatozoïdes peuvent être stockés dans la glaire cervicale, elle constitue une réserve de spermatozoïdes qui seront relâchés par ondes successives. La composition de la glaire cervicale en période ovulatoire est propice au passage des spermatozoïdes morphologiquement normaux et mobiles. Ainsi, les spermatozoïdes anormaux et peu mobiles sont retenus, ainsi que le liquide

séminal : seulement 1% des spermatozoïdes éjaculés réussiront son franchissement. Les voies génitales féminines sont aussi capables grâce aux sécrétions utérines et tubaires, de contrôler de façon active des modifications fonctionnelles des spermatozoïdes leur permettant d'acquérir un pouvoir fécondant : c'est la capacitation. Seuls les spermatozoïdes capités sont capables de traverser les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte et d'entreprendre la réaction acrosomique qui leur permettra de perforer la zone pellucide. Ils conserveraient leur pouvoir fécondant pendant environ 3 à 5 jours après l'insémination.

#### b. Fusion des gamètes et fécondation

Les spermatozoïdes capités entrent en contact avec les cellules du cumulus qui baignent dans une matrice riche en acide hyaluronique. L'acrosome libère de la hyaluronidase capable de liquéfier la matrice intercellulaire permettant la traversée du cumulus. Arrivé à la zone pellucide, la liaison s'établit entre des enzymes de la membrane spermatique et des glycoprotéines de la zone pellucide (ZP). Cet attachement déclenche la réaction acrosomique, provoquant la fusion de la membrane externe de l'acrosome à la membrane plasmique du spermatozoïde. Il en résulte une libération du contenu enzymatique de l'acrosome qui hydrolyse la zone pellucide permettant ainsi la pénétration du spermatozoïde poussé par les battements flagellaires. Après franchissement de la zone pellucide, le spermatozoïde fusionne avec l'ovocyte. La fusion entre la membrane ovocytaire et la membrane plasmique du spermatozoïde provoque au niveau ovocytaire une décharge cytoplasmique de calcium qui déclenche la reprise de la méiose ovocytaire. Elle permet l'achèvement de la 2<sup>ème</sup> division de méiose, l'expulsion du 2<sup>ème</sup> globule polaire puis la formation d'un pronucléus ou pronoyau femelle haploïde. Le noyau spermatique ayant pénétré l'ovocyte se décondense sous l'action de facteurs ovocytaires et forme le pronucléus mâle. Une nouvelle enveloppe nucléaire est mise en place délimitant un pronucléus mâle. L'œuf fécondé est désormais appelé zygote et comporte deux pronucléi (mâle et femelle).

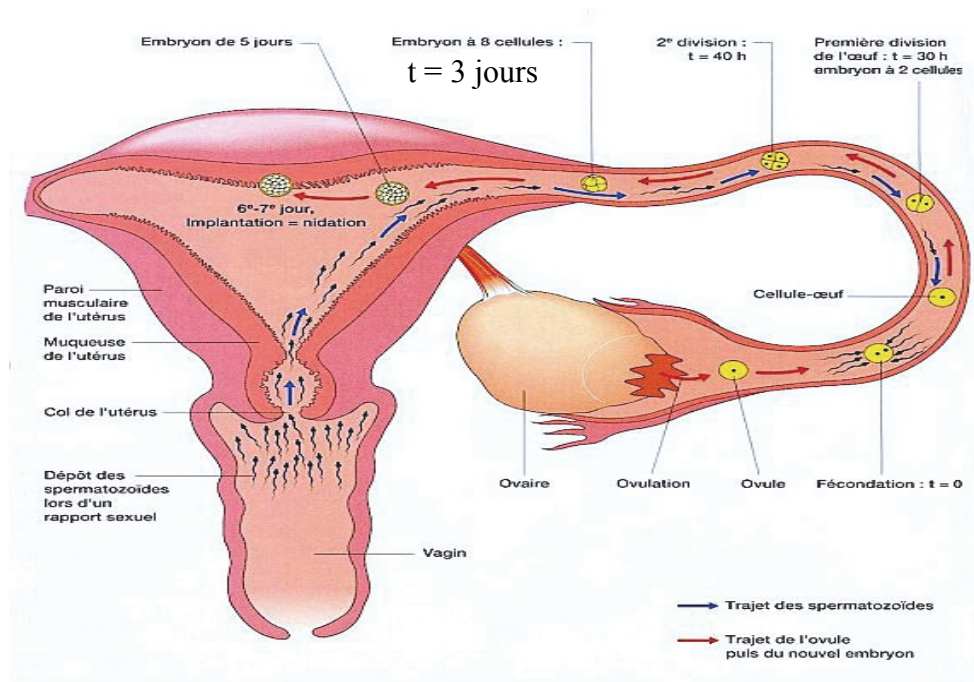


Figure 11 : Fécondation et développement embryonnaire précoce

### C. Développement embryonnaire préimplantatoire

La 1ère semaine du développement correspond à la phase préimplantatoire. C'est la phase de migration de l'embryon dans la trompe puis dans la cavité utérine avant la nidation. L'embryon est libre, il se divise activement par mitoses successives entraînant de ce fait une diminution de la taille des cellules ou blastomères qui le composent. La segmentation aboutit à un embryon constitué de 4 blastomères au 2<sup>ème</sup> jour, 8 blastomères le 3<sup>ème</sup> jour, puis à un massif cellulaire sphérique d'environ une trentaine de cellules appelé morula au 4<sup>ème</sup> jour. Les blastomères sont des cellules totipotentes : chaque blastomère est capable de régénérer la totalité de l'embryon. A ce stade, le développement dépend strictement de l'héritage maternel en ARN et en protéines accumulés au cours de l'ovogenèse dans le cytoplasme de l'ovocyte. La durée de vie de ces transcrits est très variable d'une molécule à l'autre. Lorsqu'ils sont épuisés, la progression du développement embryonnaire dépend de leur remplacement par la mise en activité du génome embryonnaire. Ce remplacement, qui constitue le passage d'un contrôle maternel à un contrôle zygotique du développement, est initié par « l'activation du génome embryonnaire » entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour. Les blastomères s'aplatissent, augmentent leur surface de contact avec les cellules voisines et réduisent la taille de l'espace intercellulaire. Il en résulte la première différenciation cellulaire avec la formation de 2 types cellulaires distincts au sein de l'embryon : les cellules externes polarisées vont former le

trophectoderme (futur placenta) tandis que les cellules internes formeront la masse cellulaire interne (MCI) ou bouton embryonnaire (futur individu). Entre le 5ème et le 6ème jour, une infiltration de liquide provoque la formation d'une cavité appelée blastocèle : l'embryon atteint alors le stade de blastocyste ou blastula. La formation du blastocèle s'accompagne d'une croissance du diamètre de l'embryon. Cette croissance entraînera la fragilisation puis l'ouverture de la zone pellucide et la sortie de l'embryon de cette « coquille », permettant ainsi son interaction avec la muqueuse utérine, étape primordiale pour la nidation.

## II. L'infertilité

### A. Généralités

Pour la première fois depuis la première guerre mondiale, l'âge des femmes à la maternité a dépassé les 30 ans en 2009 (Pison 2010). Cet âge plus tardif de la première grossesse résulte d'avancées médicales et de phénomènes sociologiques. Les progrès de la société en matière de démocratisation de la contraception depuis les années 1960, l'allongement de la durée des études et la progression de l'emploi féminin sont les facteurs majeurs de ce changement. Les femmes ont désormais un statut social égal à celui de l'homme et la grossesse peut être perçue comme un frein pour leur réussite professionnelle. Fonder une famille devient donc un projet réfléchi, volontaire et programmé dans le temps qui fait souvent intervenir des facteurs de stabilité, principalement affective et financière. Le recul de l'âge moyen de la grossesse pose inévitablement la question de la fertilité. En effet, ce retard s'accompagne d'une diminution des capacités fonctionnelles reproductrices du couple et de la femme en particulier, qui représentent une part non négligeable dans l'augmentation du recours aux techniques d'AMP (Dunson, Baird, et Colombo 2004). Certains indicateurs laissent penser que l'infertilité tend vers la hausse. En effet, une étude démographique montre par exemple que le nombre de femmes déclarant une incapacité à concevoir était de 3,6% en 1978, 6,3% en 1988 et 11,9% en 1994 (Leridon 2007).

L'infertilité est définie par l'OMS comme l'incapacité à engendrer une grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés. Cette incapacité est rapportée au fait que les facteurs cliniques et biologiques nécessaires pour parvenir à une grossesse ne sont pas réunis chez l'un ou l'autre des partenaires. L'infertilité est, à tort, souvent confondue avec l'infécondité, qui désigne plus un état : celui de ne jamais avoir été impliqué dans l'obtention d'une grossesse ou la naissance d'un enfant. Le terme d'infertilité ne peut donc être employé que s'il existe une

preuve de l'existence d'un facteur ou un ensemble de facteurs compromettant l'obtention d'une grossesse. Elle représente un problème de santé publique qui concerne 10 à 15% des couples (Boivin et al. 2007).

La fertilité décroît physiologiquement avec l'âge. Après 45 ans, les hommes mettent cinq fois plus de temps à concevoir qu'à 25 ans (Hassan et Killick 2003). Chez la femme, cette relation est plus prévisible et les chances de concevoir sont :

- A 20 ans : maximales et de l'ordre de 25% par cycle ;
- A 35 ans : 12% par cycle ;
- A 45 ans : 1% par cycle.

En dehors de cas extrêmes comme l'azoospermie ou l'obstruction tubaire bilatérale, il n'est pas possible d'assurer avec certitude qu'une grossesse ne pourra jamais survenir. Le facteur temps importe beaucoup. Pour 80% des couples fertiles, une grossesse spontanée sera obtenue dans les 6 premiers mois de rapports sexuels non protégés (Gnoth 2005). Pour les 20% de couples dits subfertiles, celle-ci n'arrivera que pour la moitié d'entre eux et seulement dans les 6 mois qui suivent. Pour l'autre moitié des couples dits hypofertiles (10%), 50% auront un enfant sans avoir recours à un traitement dans les 3 ans, les autres seront complètement infertiles avec seulement de rares grossesses sporadiques.

## B. Etiologies de l'infertilité

L'infertilité est dite primaire lorsqu'il n'y a jamais eu de grossesse ou secondaire lorsqu'il y en a déjà eu une au moins. Son origine peut être (Thonneau et al. 1991):

- Masculine (20%) ;
- Féminine (34%) ;
- Mixte (38%) ;
- Idiopathique (8%).

Parmi les étiologies féminines (figure 12), figurent principalement les troubles hormonaux, morphologiques, généraux et l'endométriose. Les troubles hormonaux engendrent principalement des anomalies de la production des gamètes. Le syndrome des ovaires polykystiques, l'insuffisance ovarienne, les anomalies de sécrétion hormonales et l'hyperprolactinémie en sont les causes principales. Les troubles morphologiques se manifestent au niveau tubaire, utérin ou cervical. Ils engendrent un défaut de transit des gamètes dans les obstructions tubaires et les anomalies de glaire cervicale ou un défaut de nidation embryonnaire lorsque l'anomalie concerne la cavité utérine. L'endométriose, localisation

anormale de la muqueuse utérine, peut être responsable suivant sa localisation d'obstruction tubaire, de troubles de l'ovulation (localisation ovarienne) ou de troubles de l'implantation (localisation utérine). D'autres causes plus générales peuvent également affecter la fertilité féminine. Elles sont le plus souvent liées à des troubles auto-immuns favorisant une altération prématurée de la fonction ovarienne tels que le lupus, les dysthyroïdies, le diabète, l'insuffisance surrénalienne...

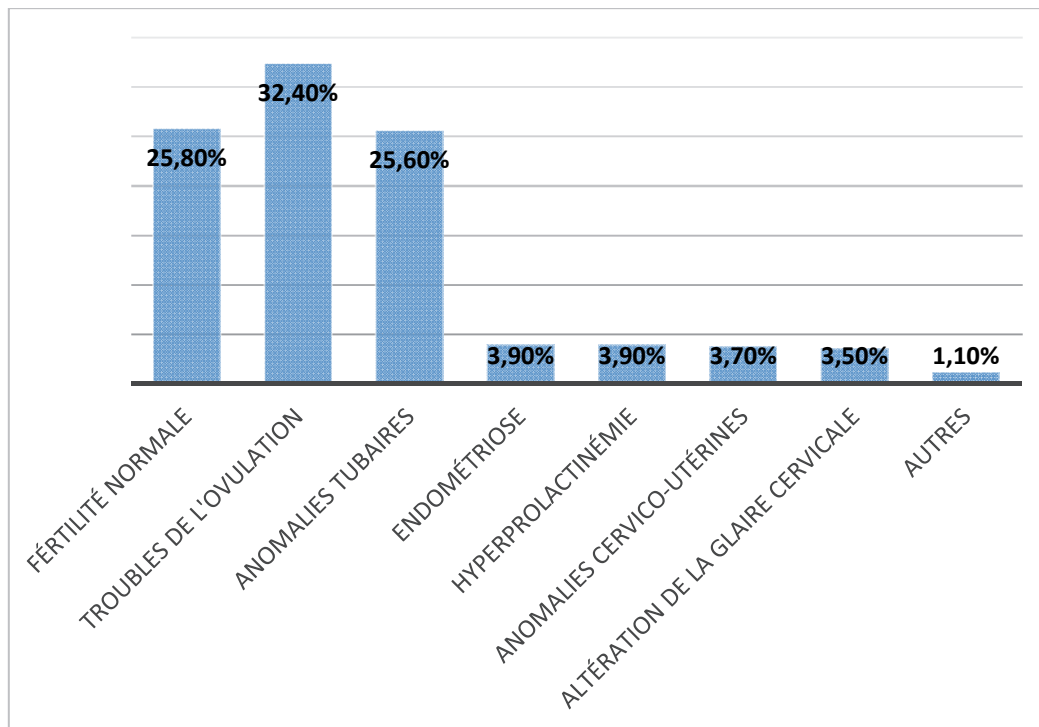


Figure 12 : Diagnostics médicaux chez 1551 femmes de couples infertiles (Thonneau et al. 1991).

Chez l'homme, des études indiquent que la concentration et la qualité du sperme (mobilité et morphologie) se dégradent dans certaines régions du monde et de la France (principalement dans le Sud-Ouest de la France) (Bujan et Auger 2012). Elles représentent les principales causes d'infertilité masculine (figure 13) et peuvent avoir diverses origines (Thonneau et al. 1991).

#### *Anomalies quantitatives des spermatozoïdes*

Il peut être total ou partiel. Lorsque la production est nulle on parle d'azoospermie. Celle-ci peut avoir une origine obstructive ou non obstructive (sécrétoire). Dans les cas d'azoospermie non obstructive, l'origine est due à un blocage de la spermatogénèse avec absence totale de production de spermatozoïdes matures. Son origine peut être centrale lorsqu'il



existe une atteinte hypothalamo-hypophysaire (hypogonadisme hypogonadotrope) ou périphérique lorsque l'atteinte est testiculaire (hypogonadisme hypergonadotrope). Cette dernière est la forme la plus fréquente d'hypogonadisme et une atteinte de l'intégrité testiculaire est le plus souvent retrouvée. Les causes les plus fréquentes sont le varicocèle, dilatation variqueuse responsable de la modification de la température testiculaire, la cryptorchidie uni ou bilatérale ou plus rarement l'orchite virale (virus des oreillons ou *Myxovirus parotidis*). On retrouve également des causes lésionnelles souvent ischémiques telles que les torsions testiculaires, les lésions vasculaires per opératoires subies lors de chirurgies d'une hernie testiculaire dans l'enfance ou les traumatismes testiculaires accidentels. Des causes génétiques sont retrouvées dans 20% des cas (Wosnitzer, Goldstein, et Hardy 2014). Elles sont dues à des anomalies du nombre de chromosomes tel que le syndrome de Klinefelter (47, XXY) ou des anomalies géniques telle que la microdélétion d'une partie du gène AZF sur le chromosome Y (5 à 10% des azoospermie et oligospermies sévères). Plus rarement, des translocations robertsoniennes, impliquant notamment les chromosomes 13, 14 et 21, peuvent être retrouvées dans 2 à 3% des cas (Siffroi 2010).

Lorsque la production de spermatozoïdes existe mais est insuffisante (<15M/ml ou <39M/éjaculat selon l'OMS 2010), on parle d'oligospermie. Les causes sont multiples et on retrouve assez souvent, des cas de cryptorchidie unilatérale, de varicocèle, la prise de toxiques ou de médicaments.

Lorsque la production quantitative des spermatozoïdes est normale, des altérations de la morphologie ou de la mobilité des spermatozoïdes peuvent alors être responsables de l'infertilité. Lorsque la morphologie est anormale, on parle de tératospermie, lorsque c'est la mobilité qui fait défaut, on parle d'asthénospermie. Elles peuvent être transitoires (secondaires à des épisodes résolutifs) ou permanentes lorsque la qualité spermatique est constitutionnellement diminuée.

#### *Anomalies quantitatives liées à un défaut de transit des spermatozoïdes dans les voies excrétrices*

Elles sont le plus souvent dues à une obstruction des voies excrétrices donnant ainsi une azoospermie obstructive (excrétoire). Dans ce cas, la production de spermatozoïdes matures est correctement assurée par les testicules mais leur acheminement dans les voies excrétrices est compromis et ce pour différentes raisons. Le plus souvent, l'obstruction est secondaire à une maladie infectieuse sexuellement transmissible (blennorragie gonococcique ou chlamydie) et

peut dans ce cas être associée à une leucospermie. Elle peut également être secondaire à un défaut anatomique un traumatisme testiculaire tel que la vasectomie ou la chirurgie inguinale. Lorsqu'elle est due à l'absence de canaux déférents (agénésie bilatérale), une origine constitutionnelle due à la mutation du gène CFTR (responsable de la mucoviscidose) est souvent retrouvée. Plus rarement, l'agénésie bilatérale vésiculo-déférentielle peut être mise en cause.

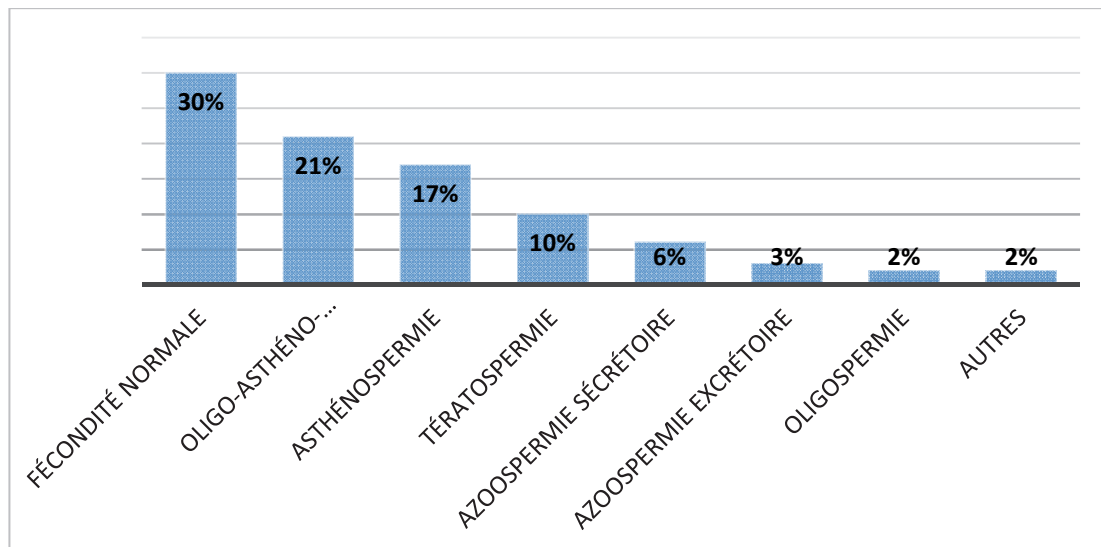


Figure 13 : Anomalies du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité (Thonneau et al. 1991).

Le défaut de transit des gamètes peut moins fréquemment être dû à un dysfonctionnement sexuel organique provoquant des troubles de l'éjaculation comme l'anéjaculation ou l'éjaculation rétrograde. Physiologiquement, le sperme est expulsé vers l'extérieur en passant par l'urètre vers le méat urétral, une voie anatomique également utilisée par l'urine lors de la miction. L'éjaculation rétrograde désigne une éjaculation qui ne se fait pas normalement vers l'extérieur, mais en direction de la vessie. Elle est due à une défaillance du sphincter vésical qui laisse ainsi passer le sperme dans la vessie lors de l'éjaculation. L'éjaculation rétrograde peut être provoquée suite à des interventions chirurgicales sur la prostate ou la vessie ou s'installer secondairement à des troubles neurologiques compliquant le diabète, la prise de certains médicaments (psychotropes, certains alpha-bloquants...) ou les atteintes médullaires. On retrouve de manière quasi constante un petit volume d'éjaculat voire une aspermie (absence de sperme). L'anéjaculation est définie par l'impossibilité pour l'homme d'émettre du sperme par le méat urétral en dépit d'une érection normale et de stimulations « appropriées ».

## C. Bilan d'infertilité

Le bilan d'infertilité est une étape importante dans la prise en charge d'un couple infertile en vue d'une prise en charge en AMP. La question qui se pose est celle de la part respective des facteurs féminins et masculins contribuant à cette infécondité. Les deux partenaires doivent être explorés de manière rationnelle et progressive. La première consultation est recommandée après un an de rapports sexuels réguliers mais ce délai peut être raccourci notamment en fonction de l'âge de la femme ou d'indications clairement établies.

### a. L'interrogatoire

L'interrogatoire est une partie importante dans la prise en charge du couple infertile. Il permet, par l'intermédiaire de questions ciblées, d'orienter le clinicien et le biologiste sur la démarche à suivre pour l'exploration de cette infertilité par des examens complémentaires. Les questions posées sont résumées dans le tableau suivant :

Questions	Femme	Homme
<b>Poids</b>	Le surpoids ou le sous-poids influent la fertilité et nécessitent une prise en charge nutritionnelle adéquate	Le surpoids ou le sous-poids influent la fertilité
<b>Fertilité antérieure</b>	Grossesses, grossesses extra-utérines, avortements et fausses-couches antérieurs avec le partenaire actuel ou un autre. Ces éléments orientent sur la fertilité potentielle. En fonction de ces événements il est possible de rechercher d'emblée une pathologie tubaire ou utérine.	Enfants, grossesses ou fausses couches avec la partenaire actuelle ou une autre.
<b>Qualité des cycles</b>	Cycles réguliers ou irréguliers, période d'aménorrhée...	
<b>Contraception antérieure</b>	Dispositif intra-utérin, ligature tubaire, contraception orale, date d'arrêt de la contraception.	Vasectomie
<b>Pathologies infectieuses</b>	La présence d'antécédents d'infections sexuellement transmissibles (IST) peut orienter vers une exploration de la perméabilité tubaire ( <i>Chlamydia</i> ,...)	Oreillons (orchite ourlienne), prostatite, IST ( <i>Chlamydia</i> , gonococcies, urétrite...)

<b>Antécédents de chirurgie abdomino-pelvienne et/ou d'endométriose</b>	Permet d'évaluer l'intégrité de l'appareil génital.	Hernie inguinale...
<b>Pathologies testiculaires</b>		Cryptorchidie (ectopie testiculaire), testicules ascenseurs, varicocèle, torsion testiculaire, hydrocèle.
<b>Pathologies sexuelles</b>	Troubles de la libido, vaginisme...	Troubles de l'érection, de l'éjaculation, hypospadias...
<b>Prise de médicaments</b>	Rechercher la prise de médicaments contre-indiqués pendant la grossesse lorsqu'un projet parental existe.	Recherche de médicaments affectant la spermatogenèse, la libido...
<b>Pathologies générales</b>	Diabète, cancer, maladies cardiovasculaires, troubles de la coagulation, dysthyroïdies...	Diabète, maladies cardiovasculaires, cancer...
<b>Habitudes de vie</b>	Tabac, alcool, toxiques (drogues), consommation de café... Activités et rythme professionnel, (travail de nuit...).	Tabac, alcool, toxiques (drogues), consommation de café... Activités et rythme professionnel, (travail de nuit...), professions en contact avec la chaleur, expositions professionnelles (herbicides, pesticides, perturbateurs endocriniens). Pratique de sports à risque de traumatisme testiculaire (rugby, hockey, équitation, vélo...). Pratique de musculation avec recours à des compléments alimentaires.
<b>Traumatismes</b>		Accident de la voie publique (moto), hématome testiculaire post-traumatique, traumatisme de la colonne vertébrale...
<b>Antécédents familiaux</b>	Problème de fertilité familiale, maladies génétiques.	Problème de fertilité familiale, maladies génétiques.

#### b. Les examens complémentaires

- Examens de 1<sup>ère</sup> intention

Chez la femme, la réalisation d'une échographie pelvienne permettant de déterminer le compte des follicules antraux (CFA), ainsi qu'un bilan hormonal au 3<sup>e</sup> jour du cycle par dosage de la FSH et de l'AMH permettent d'estimer la réserve ovarienne. Ces examens peuvent être complétés par un dosage de la LH et du taux d'œstradiol voire un bilan thyroïdien dans certains

cas. Un test post-coïtal peut dans certaines situations être proposé afin d'étudier la qualité de la glaire cervicale.

Chez l'homme, le spermogramme, associé au spermocytogramme, sont les examens de référence en première intention dans l'exploration d'une infertilité masculine. Ils permettent de déterminer plusieurs paramètres du sperme : volume, pH, viscosité, numération, concentration, mobilité, vitalité et morphologie des spermatozoïdes qui seront détaillés plus loin. Le sperme étant un liquide biologique fluctuant, en cas de résultats anormaux, les paramètres déterminés doivent être contrôlés afin de confirmer les anomalies identifiées. En effet, différents éléments peuvent interagir lors du cycle de spermatogénèse (fièvre, prise médicamenteuse) et compte tenu de la durée de la production des spermatozoïdes (74 jours), un délai de trois mois doit être respecté entre la réalisation de deux spermogrammes. Les méthodes de réalisation et les normes attendues sont détaillées dans le manuel de l'OMS 2010 (World Health Organization 2010).

- Examens de 2<sup>e</sup> intention

Chez la femme, il s'agit principalement d'examens d'imagerie permettant d'apprécier l'intégrité de l'appareil reproducteur interne. L'hystérocopie, examen permettant de visualiser l'intérieur de la cavité utérine, permet d'explorer le canal cervical, la cavité utérine et l'origine des trompes. L'hystérosalpingographie, consiste à opacifier et visualiser la cavité utérine et les trompes afin d'apprécier la perméabilité tubaire et de détecter une tumeur, un fibrome ou un rétrécissement des voies génitales. D'autres examens biologiques peuvent également être proposés dans certaines situations, notamment un caryotype et un bilan immunologique.

Chez l'homme, des examens complémentaires peuvent être nécessaires en fonction des résultats du spermogramme. Ainsi, suivant le contexte, la réalisation d'une biochimie du plasma séminal, des dosages hormonaux (FSH, Inhibine, testostérone...), une échographie testiculaire, des examens génétiques (caryotype, microdélétions du chromosome Y, mutation du gène CFTR), une biopsie testiculaire avec analyse anatomo-pathologique ou la recherche d'une éjaculation rétrograde peuvent aider à explorer les anomalies retrouvées au spermogramme.

## D. Le spermogramme

### a. Le recueil

Lors de la prise de rendez-vous le patient doit recevoir des informations claires sur les modalités du recueil. Il est impératif de recommander un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 5 jours sans éjaculation car les paramètres du sperme varient en fonction de l'abstinence sexuelle. Il est également recommandé de boire 1L d'eau la veille au soir afin de favoriser le nettoyage interne du tractus génital par miction avant le recueil. Ce dernier s'effectue au laboratoire en respectant des instructions d'hygiène strictes : désinfection des mains et de la verge à l'eau savonneuse puis rinçage à l'eau, séchage au papier puis désinfection des mains avec une solution hydro-alcoolique. Le recueil est réalisé par masturbation dans un réceptacle stérile à usage unique. Afin de favoriser une éjaculation rapide et complète, une salle de recueil aménagée dans une zone calme est vivement conseillée.

### b. L'examen macroscopique

Après le recueil, le sperme est placé 30 minutes dans une étuve à 37°C pour permettre la liquéfaction par les protéases prostatiques. Les paramètres initiaux sont alors déterminés :

- **Volume** : il est mesuré à 0,1ml près à l'aide d'une pipette graduée ou déterminé par pesée de l'éjaculat dans son réceptacle (recommandation de l'OMS). Il est considéré normal lorsqu'il est supérieur à 1,5 ml (OMS 2010). En dessous, on parle d'hypospermie.
- **Viscosité** : elle est évaluée après liquéfaction, semi-quantitativement (normale, augmentée ou forte), en observant la manière dont le sperme s'écoule à l'extrémité de la pipette.
- **pH** : il est mesuré à l'aide de papier pH et doit être compris entre 7,2 et 8. En dessous de 7, il évoque une atteinte des vésicules séminales (sécrétions basiques). Au-dessus de 8, il oriente vers une pathologie prostatique.

### c. L'examen microscopique

- **Evaluation globale** entre lame et lamelle à faible grossissement : elle permet d'avoir une vue d'ensemble et de noter la présence éventuelle d'agglutinats ou d'agrégats de spermatozoïdes ou d'éléments autres que les spermatozoïdes (cellules rondes, filaments muqueux, grains gélatineux...). Elle permet également d'évaluer le facteur de dilution

nécessaire pour la mesure de la concentration en fonction du nombre de spermatozoïdes observés par champs.

- **Numération des spermatozoïdes** : elle est mesurée en utilisant un hémocytomètre (cellule de Neubauer modifiée ou cellule de Mallassez). La numération normale doit être d'au moins 15 millions de spermatozoïdes par millilitre de sperme et/ou au moins 39 millions de spermatozoïdes par éjaculat. En dessous de ces valeurs on parle :
  - D'oligozoospermie si la concentration est inférieure à 15 M/ml ;
  - D'azoospermie si aucun spermatozoïde n'est retrouvé. Elle doit impérativement être contrôlée sur un deuxième spermogramme à au moins 3 mois d'intervalle et confirmée par la recherche de spermatozoïdes dans le culot de centrifugation de la totalité de l'éjaculat ;
  - De cryptozoospermie, forme d'oligozoospermie extrême qui désigne la présence de rares spermatozoïdes dans le culot de centrifugation de la totalité de l'éjaculat.
- **Numération des cellules rondes** (cellules urétrales, cellules immatures de la lignée germinale et leucocytes) : la présence de cellules de la lignée germinale à plus de 10% peut indiquer un trouble de la spermatogenèse. Un taux de leucocytes supérieur à 1M/ml définit une leucospermie et évoque une infection.
- **Agglutinats** : leur présence incite à rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes qui peuvent être dirigés contre la queue ou la tête des spermatozoïdes.
- **Vitalité** : elle est mesurée en colorant les spermatozoïdes par l'éosine, un colorant vital pénétrant la membrane des spermatozoïdes morts au niveau de la tête. Les spermatozoïdes vivants apparaissent avec une tête blanche sur un fond noir de nigrosine. Le taux de vitalité est déterminé sur au moins 200 spermatozoïdes, lorsqu'il est inférieur à 58%, on parle de nécrozoospermie.
- **Mobilité** : elle est appréciée par l'examen direct d'une goutte de sperme entre lame et lamelle au cours de la première heure après le recueil puis 4 heures après. On distingue 3 types de mobilités :
  - Mobiles progressifs (rapides (a) et lents (b)) : ils ont une trajectoire rectiligne ;
  - Mobiles non progressifs (c) : ils se déplacent de moins de deux longueurs de tête en une seconde ou réalisent des simples oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaires.
  - Immobiles (d) : aucun déplacement ni de la tête ni du flagelle.

Selon la classification de la dernière édition 2010 de l’OMS, le pourcentage normal de spermatozoïdes mobiles progressifs (a+b) doit être supérieur à 32% avec au moins 40% de spermatozoïdes mobiles (a+b+c). En dessous, on parle d’asthénospermie. Celle-ci doit être corrélée à la vitalité. En effet, un spermatozoïde immobile peut être mort, ou vivant mais porteur d’une anomalie flagellaire.

#### d. La spermoculture

Elle consiste à mettre le sperme en culture sur des milieux spécifiques (chocolat VCAT, chocolat polyvitex, milieu pour mycoplasmes) afin de mettre en évidence la présence de germes pathogènes (bactéries et mycoplasmes). Elle est pratiquée devant tout signe clinique ou biologique évocateur d’infection des glandes annexes masculines. L’arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation recommande la réalisation d’une spermoculture avant toute tentative d’AMP. Les seuils de positivité varient selon les auteurs et les germes identifiés (Boitrelle et al. 2012).

#### e. Le test de migration-survie

C’est l’examen pronostique fondamental pour définir l’attitude thérapeutique vis-à-vis du sperme. Il détermine le nombre et la mobilité des spermatozoïdes après une sélection, le plus souvent par centrifugation dans un gradient de densité croissante. Ce dernier est réalisé à partir d’une solution mère colloïdale de particules de silice recouvertes de silane dont la dilution dans le milieu de culture choisi détermine les caractéristiques des phases utilisées. Le gradient comporte 2, 3, voire 6 couches. Lorsque le test est réalisé à visée diagnostique, le gradient est préparé à base de percoll (plus économique mais plus toxique pour les spermatozoïdes du fait de la présence de PVP (polyvinylpyrrolidone), lorsqu’il est réalisé à visée thérapeutique, des solutions adaptées aux techniques d’AMP (Puresperm) sont alors utilisées. Le test permet de récupérer, après centrifugation, un culot contenant les spermatozoïdes les plus denses (les plus morphologiquement normaux), les plus mobiles et ceux qui survivent in vitro entre 18 et 24h. Il détermine également le NSMI : nombre de spermatozoïdes mobiles théoriquement inséminables. Son résultat reflète le nombre de spermatozoïdes capables de se trouver dans l’utérus et aptes à féconder l’ovocyte.



## f. Le spermocytogramme

Le spermocytogramme correspond à l'analyse morphologique des spermatozoïdes. Il s'agit de l'examen le plus long et fastidieux du spermogramme. Son objectif est d'évaluer les anomalies morphologiques et notamment le pourcentage de formes typiques (FT). Les spermatozoïdes sont étudiés au microscope à partir de frottis fixés et colorés où au moins 200 spermatozoïdes sont comptés et analysés. À l'issue de la spermiogénèse, des spermatozoïdes présentant des aspects morphologiques variés sont produits chez l'homme. L'étude des spermatozoïdes récupérés après migration dans le mucus cervical préovulatoire a permis de définir les caractéristiques du spermatozoïde morphologiquement normal. Au sein d'un éjaculat normal, les spermatozoïdes qualifiés de morphologiquement normaux et supposés féconds peuvent être en minorité si l'on se réfère aux valeurs de référence de l'OMS (seuils de 4% à 23% en fonction de la classification utilisée). Les spermatozoïdes morphologiquement anormaux ont un potentiel fécondant réduit voire aboli dans certains cas, et ce d'autant plus qu'ils cumulent des anomalies. Il est maintenant bien établi, que le pourcentage de spermatozoïdes normaux, a une valeur pronostique *in vivo* et *in vitro*. Plusieurs classifications cytologiques sont utilisées dans le monde dont la classification de David, largement utilisée en France et la classification de Krüger, classification internationale recommandée par l'OMS.

### *La Classification de David (David et al. 1975) et ses modifications*

La classification de David a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité masculine puis a été publiée en 1975. Cette classification comportait au départ treize anomalies : sept pour la tête et six pour le flagelle. Elle repose sur la prise en compte de toutes les anomalies observées grâce à un système de classification à entrées multiples : un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est défini par l'ensemble de ses anomalies c'est-à-dire qu'il figure plusieurs fois dans la grille de classement à chacune des anomalies concernées. Depuis les années 1970, de nombreux laboratoires français, publics et privés, ont adopté cette classification qui a initialement établi à 30 le pourcentage de formes typiques requis dans un éjaculat. À l'initiative de plusieurs biologistes, la classification de David a été modifiée et améliorée. Au début des années 1990, Jouannet (Jouannet et al. 1988) introduit l'index d'anomalies multiples. C'est un indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal qui est calculé par le rapport du nombre total d'anomalies recensées sur le nombre total de spermatozoïdes anormaux. En 2000, Auger et Eustache (Auger, Eustache, et

David 2000) redéfinissent des catégories d'anomalies et en incorporent deux nouvelles puis en 2010, L'OMS révisé le pourcentage minimum de formes typiques à 15% a été récemment ramené à 23% en 2016 selon la classification de David (Auger, Jouannet, et Eustache 2016).

L'analyse morphologique des spermatozoïdes selon la classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

- 7 anomalies de la tête : allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, acrosome anormal ou absent, base (région post-acrosomique) anormale ;
- 3 anomalies de la pièce intermédiaire : reste cytoplasmique, grêle, angulée ;
- 5 anomalies de la pièce principale : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée et multiple.

En 2016, Auger détermine l'intervalle de confiance de la proportion des anomalies morphologiques pour chaque catégorie d'anomalie chez des individus fertiles (Auger, Jouannet, et Eustache 2016) (figure 14).

Anomalies morphologiques	Intervalle de distribution (95 <sup>e</sup> percentile)
Tête allongée	3 [2-4]
Tête amincie	14 [12-16]
Microcéphales	7 [5-9]
Macrocéphales	1 [0-2]
Têtes multiples	2 [1-3]
Anomalie de la région post-acrosomale	42 [39-45]
Anomalie de l'acrosome	60 [57-63]
Résidu cytoplasmique	4 [3-5]
Pièce intermédiaire amincie	0
Angulation	13 [11-15]
Flagelle absent	5 [4-6]
Flagelle court	1 [0-2]
Flagelle irrégulier	2 [1-3]
Flagelle enroulé	17 [15-19]
Flagelles multiples	1 [0-2]

Figure 14 : Intervalle de distribution au 95<sup>e</sup> percentile des principales catégories d'anomalies morphologiques observées chez 926 hommes fertiles (Auger, Jouannet, et Eustache 2016).

Pour être considéré comme normal, un spermatozoïde doit répondre à des critères morphologiques bien établis (figure 15) :

- La tête doit avoir un contour très régulier ovalaire avec un grand axe mesurant 5µm et un petit axe mesurant 3µm. (rapport grand axe/petit axe=1,66). L'acrosome doit couvrir 40 à 70% de la surface de la tête, avoir un contour régulier et une texture homogène.
- La pièce intermédiaire doit mesurer 1,5 fois la longueur de la tête et avoir un diamètre de 0,6 à 0,8µm. Son grand axe doit être dans le prolongement du grand axe de la tête. Elle doit également présenter un contour régulier et une texture homogène.
- La pièce principale, c'est-à-dire le reste du flagelle mesure environ 45µm (soit environ 10 fois la longueur de la tête), a un diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,5µm et doit avoir un contour régulier et un aspect homogène.

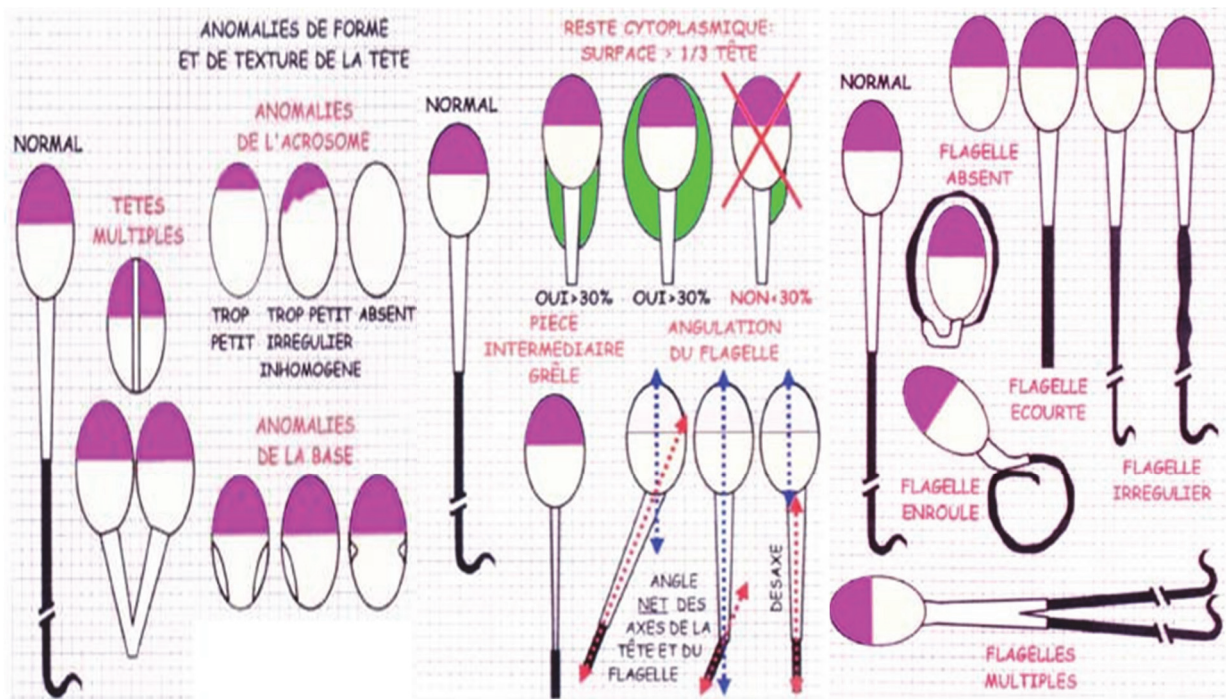


Figure 15 : Anomalies morphologiques selon la classification de David.

### *Classification de Krüger*

La classification de Krüger a été établie à l'hôpital de Tygerberg (Afrique du Sud) par l'équipe du Dr. Krüger. Elle définit des critères très stricts pour considérer un spermatozoïde normal et est devenue la classification de référence recommandée par l'OMS. Elle est considérée comme ayant la meilleure corrélation avec le pronostic des techniques d'AMP et, pour certains auteurs, avec la fertilité. Par ordre d'importance, l'anomalie est recensée d'abord

sur la tête, puis viennent les anomalies de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle (figure 16) :

- La tête doit être lisse, avec un contour régulier, ovalaire et symétrique. Elle doit mesurer 3 à 5 $\mu\text{m}$  de grand axe et de 2,5 à 3,5 $\mu\text{m}$  de petit axe. La région acrosomique doit représenter 40 à 70% de la tête, ne doit contenir aucune grande vacuole et ne pas dépasser deux petites vacuoles n'occupant pas plus de 20% de la tête du spermatozoïde. La région post acrosomique ne doit contenir aucune vacuole.
- La pièce intermédiaire doit être mince, régulière et implantée dans l'axe médian de la tête du spermatozoïde. Elle doit mesurer de 5 à 8 $\mu\text{m}$  et avoir une épaisseur de 0,5 $\mu\text{m}$ . Le résidu cytoplasmique est considéré comme anormal lorsqu'il est supérieur au tiers de la taille de la tête du spermatozoïde.
- La pièce principale doit avoir un calibre uniforme sur toute sa longueur, plus mince que la pièce intermédiaire et mesure environ 45 $\mu\text{m}$  de long.

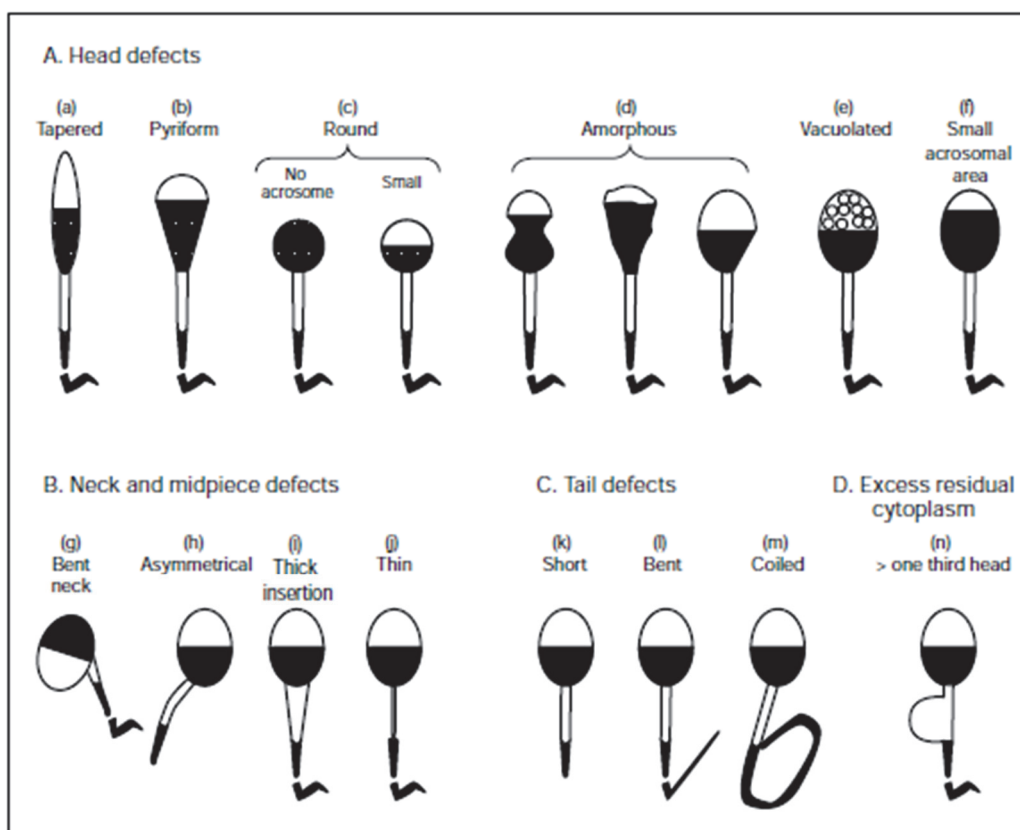


Figure 16 : Schémas de quelques anomalies morphologiques des spermatozoïdes selon Krüger (extrait du Manuel de l'OMS 2010).

L'index de tératozoospermie (TZI), correspondant au nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde anormal, peut être calculé. Une valeur supérieure à 1,46 va dans le sens d'une

hypofertilité (Menkveld et al. 2001). Trois groupes ont ainsi été individualisés en fonction du pourcentage de spermatozoïdes typiques et la valeur pronostic sur leur pouvoir fécondant (Kruger et al. 1988; Menkveld et al. 1990) :

- FT > 14 % : sperme normal ;
- 4 % < FT < 14 % : groupe G-pattern (groupe de bon pronostic) ;
- FT < 4 % : groupe P-pattern (groupe de mauvais pronostic).

g. Examen de la maturité nucléaire par coloration au bleu d'aniline acétifié

Il s'agit d'un examen complémentaire qui peut être réalisé lorsqu'une anomalie de la condensation de la chromatine est suspectée. Le bleu d'aniline colore les nucléoprotéines d'histone qui ne devraient pas subsister dans le spermatozoïde mature car remplacées par les protamines lors de la spermiogénèse afin d'assurer une condensation extrême de la chromatine des spermatozoïdes. Il n'existe pas de valeur normale clairement établie mais selon plusieurs publications, un seuil à 70% de spermatozoïdes matures normalement condensés (non colorés) doit être attendu à l'examen (Auger et al. 1990). Ce test présente un intérêt pronostic (Zini et Sigman 2009) et diagnostique dans les infertilités inexplicables, les échecs de fécondation ou l'absence de grossesse répétée en fécondation in vitro (Larson-Cook et al. 2003).

### III. L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP)

Elle est définie par l'article L.2141-2 du Code de la santé publique comme ayant « pour objet de remédier à l'infertilité d'un couple ou d'éviter la transmission à l'enfant ou à un membre du couple d'une maladie d'une particulière gravité ». Contrairement à d'autres pays d'Europe (Belgique, Royaume-Uni), où l'AMP constitue un mode alternatif de procréation laissé à la convenance des individus et conçue comme une réponse au désir de chacun, en France, elle s'inscrit exclusivement dans un cadre thérapeutique : ce sont les indications médicales liées à l'infertilité du couple qui sont déterminantes dans l'accès à l'AMP. Elle est calquée sur le schéma de l'engendrement naturel et l'hétéronomie naturaliste. Par conséquent, l'AMP ne peut s'adresser qu'à un couple constitué d'un homme et d'une femme, vivants, en âge de procréer et devant consentir préalablement au transfert des embryons ou à l'insémination. Le cadre exigé par la loi française pour accéder à l'AMP est supposé offrir la meilleure garantie de l'intérêt de l'enfant à naître. La décision de s'engager dans une démarche d'AMP s'effectue entre le couple et une équipe de professionnels de santé (principalement gynécologues, biologistes, sages-femmes et psychologues).

## A. La stimulation ovarienne

La stimulation ovarienne a pour but de compenser une hypofertilité du couple en augmentant le nombre d'ovocytes matures obtenus et/ou en synchronisant la rencontre et la fécondation des gamètes. Des traitements hormonaux sont utilisés afin de contrôler le cycle ovarien et contourner partiellement le contrôle neuroendocrinien.

Selon la technique d'AMP choisie, en fonction de l'étiologie d'infertilité du couple, la stimulation ovarienne vise à obtenir 1 à 2 ovocytes matures dans le cadre des inséminations ou au moins 3 (idéalement 10 ovocytes) dans le cadre de la fécondation in vitro (FIV). Après une phase de blocage de l'hypophyse faisant appel à des agonistes ou des antagonistes de la GnRH, la production d'ovocytes matures est stimulée, selon divers protocoles, par l'utilisation de deux catégories de molécules : les gonadotrophines FSH et LH, ou les anti-estrogènes. Dans tous les cas, une surveillance tout au long de la stimulation hormonale par des mesures échographiques régulières du nombre et de la taille des follicules en croissance, et des dosages sanguins des taux d'œstradiol, de LH et de progestérone, permet d'ajuster la dose et la durée du traitement afin de déterminer le moment approprié pour le déclenchement de l'ovulation. Celui-ci a lieu en fin de phase folliculaire stimulée par la gonadotrophine chorionique d'origine placentaire à activité LH (hCG) ou par de la LH recombinante. Enfin, le soutien de la phase lutéale par la progestérone et ses dérivés permet d'améliorer la nidation de l'embryon dans l'utérus en favorisant le développement de l'endomètre.

## B. Inséminations intra-utérines (IIU)

Historiquement la technique la plus ancienne, elle a d'abord été utilisée par les arabes dès le XIV<sup>e</sup> siècle sur des juments avant d'être appliquée à l'Homme en 1789 par John Hunter. Elle consiste à déposer dans l'utérus, au terme d'une légère stimulation de l'ovulation dont le but est d'induire la maturation d'un à deux ovocytes (voire 3 exceptionnellement) et au moment le plus opportun à une rencontre avec l'ovocyte, une préparation contenant les spermatozoïdes les plus féconds du partenaire (insémination artificielle avec sperme de conjoint ou IAC), ou d'un donneur (insémination artificielle avec sperme de donneur ou IAD) fournis par un centre gérant le don de spermatozoïdes, le plus souvent CECOS (Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du Sperme).

## *Indications*

Les inséminations intra-utérines sont indiquées dans les situations d'infertilités :

- Féminines liées à des troubles de l'ovulation, la présence d'un obstacle cervical au passage des spermatozoïdes ou d'endométriose légère à trompes saines ;
- Masculines liées à des troubles de l'éjaculation ou une oligo-astheno-teratospermie (OATS) modérée ;
- Idiopathiques ;
- Liées à un risque viral de contamination du partenaire en cas d'infection sexuellement transmissible (VIH, VHB, VHC).

## *Recueil et préparation du sperme*

Après le recueil au laboratoire le jour de l'insémination, la préparation de sperme est réalisée par centrifugation sur gradient de densité. Le but est de séparer les spermatozoïdes du liquide séminal, sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles en éliminant les spermatozoïdes morts, immobiles ou anormaux et réaliser la capacitation in vitro des spermatozoïdes en éliminant les protéines de surface accumulées lors de leur maturation. Afin d'augmenter les chances de grossesse, 1 million à 10 millions de spermatozoïdes mobiles progressifs seront inséminés. Un second recueil peut parfois être nécessaire pour atteindre cette concentration.

## *L'insémination*

Elle est réalisée dans les 36h après le déclenchement de l'ovulation. La préparation de sperme est aspirée dans un cathéter d'insémination en plastique qui est inséré dans la cavité utérine par un gynécologue afin de procéder à la libération des spermatozoïdes. Il s'agit d'un geste simple et indolore qui ne nécessite ni anesthésie ni prémédication. 56468 inséminations ont été réalisées en France en 2014 (rapport médical et scientifique de l'agence de biomédecine de 2015) avec des taux de grossesse variant selon l'origine du sperme entre 12,5% (IAC) et 21% (IAD) et survenant en majorité dans les 3 ou 4 premiers cycles d'insémination.

## C. Fécondation in vitro (FIV)

La fécondation in vitro consiste à reproduire, à l'extérieur du corps humain, dans un laboratoire, ce qui se passe naturellement dans les trompes utérines : la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire. C'est en 1978, en Grande-Bretagne, qu'est née Louise Brown, premier « bébé éprouvette », fruit de la collaboration entre le Dr. Edwards et le Dr. Steptoe pour laquelle ils recevront le prix Nobel en 2010. Amandine, premier enfant né par FIV en France verra le jour en 1982 grâce au Pr. Frydman et au Dr. Testart. La découverte de cette technique raisonnera comme une révolution dans la prise en charge de l'infertilité.

### a. FIV conventionnelle

#### *Indications*

La fécondation in vitro conventionnelle est indiquée dans les situations d'infertilités :

- Féminines liées à la diminution de la réserve ovarienne, l'obstruction tubaire, l'endométriase ou des troubles sévères de l'ovulation ;
- Masculines liées à des anomalies importantes mais non sévères de la numération, mobilité ou morphologie laissant peu de chances de succès aux autres traitements ;
- Liées à l'échec des inséminations lorsqu'elles sont possibles.

#### *Stimulation ovarienne et ponction ovocytaire*

L'objectif du traitement hormonal administré par injection est d'induire le développement simultané de plusieurs follicules afin d'augmenter les chances de prélever, avant une ovulation spontanée, un grand nombre d'ovocytes matures susceptibles d'être fécondés. La ponction a lieu environ 36h après le déclenchement hormonal de l'ovulation. Elle est réalisée par un gynécologue dans un bloc opératoire sous anesthésie locale ou générale et dure en moyenne 15 minutes. Une sonde endovaginale couplée à une aiguille adaptée permet, sous contrôle échographique, de ponctionner chaque follicule visible et d'en aspirer le contenu en liquide folliculaire dans lequel baigne l'ovocyte. Ce liquide est récupéré dans des tubes via une tubulure branchée à l'aiguille de ponction, maintenus à 37°C, et transmis au laboratoire pour la recherche des cumulus ovocytaires. Le nombre moyen d'ovocytes récupéré lors de la



ponction varie entre 5 et 10. Tous les follicules ne contiennent pas forcément un ovocyte, et tous les ovocytes ne sont pas fécondables.

### *Recueil et préparation de sperme*

La préparation du sperme est réalisée le jour de la ponction au laboratoire à partir de sperme frais ou congelé du conjoint ou à partir de sperme de donneur fourni par un CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme). Comme pour les inséminations, le but est de sélectionner par gradient de densité les spermatozoïdes les plus féconds.

### *Mise en fécondation et culture embryonnaire*

Tous les cumulus contenant un ovocyte retrouvés dans le liquide folliculaire sont mis en fécondation le jour de la ponction (J0), par paquets ou de manière individuelle, dans un plot en plastique contenant un milieu de culture avec 80 000 à 100 000 spermatozoïdes mobiles progressifs par ovocyte à féconder. L'ensemble est placé dans une étuve à atmosphère contrôlée mimant les conditions de température (37°C), d'humidité (85%) et de gazométrie de la trompe utérine (CO<sub>2</sub> à 5,5%, O<sub>2</sub> inférieur à 20% (idéalement à 5%)). A ce stade, aucune information sur le degré de maturité des ovocytes n'est accessible, les cellules du cumulus empêchant d'observer la présence du globule polaire ou de la vésicule germinale. Le lendemain de la ponction (J1), à la 18<sup>e</sup> heure ( $\pm$  1h), le biologiste retire les cellules du cumulus par décoronisation enzymatique et recherche au microscope la présence de signes de fécondation normale : le zygote présente au centre de son cytoplasme 2 pronucléi (PN) rapprochés et de taille identique contenant chacun 3 à 8 nucléoles polarisés ou pronuclear bodies (PNBs). L'aspect des pronucléi détermine un Z-score permettant de prédire le potentiel évolutif des embryons (Scott 2003). Environ 50 à 80% des ovocytes seront fécondés. Les zygotes sont remis en culture jusqu'au clivage précoce donnant 2 blastomères à la 25<sup>e</sup> heure ( $\pm$  1h) post-fécondation (figure 17).



Figure 17 : Zygote à 2 PN (à gauche) et embryon à 2 cellules (à droite).

Les embryons continuent leur développement pour atteindre le stade de 4 cellules à la 44<sup>e</sup> heure ( $\pm$  4h) au 2<sup>e</sup> jour puis le stade de 8 cellules au 3<sup>e</sup> jour (figure 18). L'observation des embryons aux 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jours permet de les typer selon différentes classifications afin de prédire leur potentiel évolutif et implantatoire et sélectionner le ou les meilleurs embryons à transférer. Les classifications sont basées sur le nombre et la morphologie des blastomères ainsi que sur la quantité de fragments présents dans l'embryon. La classification que nous utilisons actuellement au centre de procréation médicalement assistée (CPMA) de la Conception a été établie par M. Plachot (figure 19).



Figure 18 : Evolution des embryons entre le 2<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après mise en fécondation.

La culture embryonnaire peut être prolongé jusqu'au 6<sup>e</sup> jour afin de permettre aux embryons d'atteindre le stade de blastocyste. A partir de 4<sup>e</sup> jour, les blastomères se compactent et fusionnent ; l'embryon est alors au stade de morula et procède à l'activation de son propre génome pour prendre le relai de la production d'éléments nutritifs nécessaires à la poursuite de sa croissance. Il s'agit d'une étape cruciale que tous les embryons n'ont pas la capacité de réaliser. On observe alors entre le 5<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour la première différenciation cellulaire donnant un blastocyste composé de 3 parties : les cellules du trophoblaste ou trophectoderme (TE) en

périphérie, les cellules du bouton embryonnaire regroupées à un pôle ou masse cellulaire interne (MCI) et une cavité de segmentation ou blastocèle.

Types embryonnaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Type I : embryon à blastomères égaux, réguliers et sans fragments</li> <li>- Type II : embryons à blastomères égaux, réguliers avec fragments</li> <li>- Type III : embryons à blastomères inégaux, réguliers sans fragments</li> <li>- Type IV : embryons à blastomères inégaux, réguliers avec fragments</li> <li>- Type V : blastomères non individualisables</li> </ul>
Nombre de blastomères	Indiqué par un chiffre arabe à côté du type embryonnaire
Quantité de fragments (indiqué en pourcentage de volume occupant l'embryon)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- (1) : &lt; 10% de fragments</li> <li>- (2) : 10% à 30% de fragments</li> <li>- (3) : 30% à 50% de fragments</li> <li>- (4) : &gt; 50% de fragments</li> </ul>

Figure 19 : Classification de Plachot pour le typage embryonnaire à J2-J3.

De la même manière que les embryons J2-J3, la classification des blastocystes selon Gardner (Gardner et Schoolcraft 1999) permet d'évaluer leur potentiel évolutif (figure 20).

Type	Stade de développement et blastocèle
<b>B1</b>	Blastocyste jeune et volume du blastocèle < 50% du volume total de l'embryon
<b>B2</b>	Blastocyste jeune et volume du blastocèle > 50% du volume total de l'embryon
<b>B3</b>	Blastocyste en expansion
<b>B4</b>	Blastocyste expansé et zone pellucide amincie
<b>B5</b>	Blastocyste en éclosion et rupture de la zone pellucide
<b>B6</b>	Blastocyste éclos et dégagé de la zone pellucide

	MCI	TE
<b>A</b>	Nombreuses cellules regroupées densément (meilleur score)	Nombreuses cellules formant un épithélium cohésif (meilleur score)
<b>B</b>	Nombreuses cellules moins densément regroupées.	Peu de cellules formant un épithélium fin et irrégulier
<b>C</b>	Très peu de cellules, dégénératives (aspect lysé)	Epithélium fin, très peu de cellules, cellules larges voire dégénératives

Figure 20 : Classification des blastocystes selon Gardner (Gardner et Schoolcraft 1999).

## b. FIV par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)

L'ICSI est une technique de fécondation in vitro consistant à introduire un spermatozoïde directement dans le cytoplasme d'un ovocyte mature. Elle a été mise au point en Belgique en 1990 par les professeurs Van Steirteghem et Devroey, permettant le traitement d'infertilités masculines sévères. Elle fait appel à un microscope, couplé à deux micromanipulateurs de grande précision, contrôlant chacun un bras relié à une micropipette : une micropipette de contention, servant à maintenir l'ovocyte, et une micropipette d'injection, servant à aspirer un spermatozoïde pour l'injecter dans l'ovocyte mature (figure 21).



Figure 21 : Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI).

### *Indications*

La fécondation in vitro par ICSI est indiquée dans les situations d'infertilités :

- Féminines lorsqu'il y a recours à des ovocytes préalablement vitrifiés ;
- Masculines liées à des anomalies sévères de la numération, mobilité ou morphologie des spermatozoïdes laissant peu de chances de succès à la FIV conventionnelle ou en cas de prélèvement chirurgical des spermatozoïdes ;
- Liées à des échecs de fécondation ou paucifécondation en FIV conventionnelle.

### *Déroulement*

Pour le couple pris en charge en ICSI, le recours à cette technique ne comporte aucune différence dans leur parcours de soin (stimulation, ponction recueil de sperme, transfert embryonnaire). La différence réside au niveau du laboratoire uniquement dans le traitement des

gamètes et la mise en fécondation. En effet, lorsque les ovocytes sont réceptionnés, la décoronisation a lieu 1h à 2h après la ponction afin d'identifier les ovocytes matures. Un biologiste expérimenté procédera par la suite à la microinjection d'un spermatozoïde sélectionné dans chaque ovocyte mature. Les étapes suivantes sont identiques à celles de la FIV conventionnelle. Le taux de fécondation en ICSI est plus élevé que celui de la FIV conventionnelle et se situe aux alentours de 70 à 80%. 41177 ICSI ont été réalisées en France en 2014 (rapport médical et scientifique de l'agence de biomédecine de 2015) avec un taux de grossesse échographique à 24,9%.

### *Transfert embryonnaire après FIV ou ICSI*

Le transfert embryonnaire consiste à replacer un ou deux embryons obtenus par culture dans l'utérus. Il peut théoriquement être réalisé entre le 1<sup>er</sup> et le 6<sup>e</sup> jour de développement. En pratique, il est réalisé soit au stade précoce, au 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour, soit au stade tardif (blastocyste), entre le 5<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour. Chaque centre établit ses propres critères de nombre et stade d'embryon à transférer afin de donner le plus de chances au couple d'obtenir une grossesse en leur faisant courir le plus faible risque de grossesse multiple. En fonction des critères liés à l'âge maternel, le rang de la tentative, les antécédents de grossesse, la morphologie utérine, la cause d'infertilité et le potentiel implantatoire de l'embryon, 1 ou 2 embryons sont choisis sur des critères morphologiques pour être transférés. Le transfert est un geste simple, rapide et non douloureux réalisé par un gynécologue expérimenté à l'aide d'un cathéter de transfert fin et souple introduit dans l'utérus par voie vaginale le plus souvent sous contrôle échographique. L'embryon est déposé dans l'utérus et s'y développe jusqu'à son implantation. Un test de grossesse par dosage sanguin de  $\beta$ -HCG est réalisé 10 à 14 jours après le transfert. En cas de positivité, une échographie, 6 semaines après le transfert, confirme la grossesse, vérifie qu'elle est bien intra-utérine et le nombre d'embryons en développement.

En 2014, 20717 tentatives d'AMP par FIV (toutes origines de gamètes confondues) ont été réalisées avec un taux de grossesse échographique de 23,4% (rapport médical et scientifique de l'agence de biomédecine de 2015).

### *Cryoconservation embryonnaire*

Lorsque le transfert embryonnaire ne peut être réalisé ou lorsque subsistent des embryons surnuméraires après le transfert, ceux ayant une qualité suffisante pour survivre à un

cycle de congélation-décongélation peuvent être conservés avec l'accord du couple pour d'éventuels transferts ultérieurs d'embryons congelés. Les embryons peuvent être cryoconservés à J2, J3, J5 ou J6 par congélation lente ou vitrification. La vitrification est une technique récente de conservation des embryons qui empêche la formation de cristaux intracellulaires en remplaçant l'eau par un agent cryoprotecteur. Elle consiste en une descente en température, ultra rapide, de 20°C à - 196°C dans de l'azote liquide, à une vitesse de - 2500°C/minute. Actuellement ce procédé permet d'obtenir des taux de survie à la décongélation des embryons de plus de 90% dans notre laboratoire.

#### IV. Les tératospermies monomorphes : une origine génétique d'infertilité masculine

##### A. Tératospermies monomorphes

Lorsque le pourcentage de formes typiques est inférieur à la normale, dans la plupart des cas, les spermatozoïdes présentent plusieurs types d'anomalies et la tératospermie est dite polymorphes. Plus rarement, la tératospermie peut se présenter sous la forme d'une anomalie monomorphe, où la quasi-totalité des spermatozoïdes anormaux présentent la même anomalie. Certains points communs font alors suspecter une origine génétique de la tératospermie :

- La majorité des spermatozoïdes du patient présente la ou les mêmes anomalies, exceptionnellement quelques spermatozoïdes échappent à l'effet de la mutation.
- La ou les anomalies observées ne varient pas avec le temps. Les spermogrammes successifs révèlent les mêmes aspects et les mêmes pourcentages de spermatozoïdes présentant le morphotype d'intérêt.
- L'interrogatoire révèle une notion de consanguinité des parents et/ou d'infertilité chez les apparentés.

Quatre formes de tératospermies monomorphes représentent moins de 1% des étiologies d'infertilité masculine : la globozoospermie, le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales ou SSM, le syndrome des spermatozoïdes décapités et le syndrome des spermatozoïdes à flagelles courts.

La variabilité des formes cliniques observées pour chaque syndrome suggère que différentes mutations affectant différents gènes sont probablement impliquées dans ces pathologies de la spermatogenèse. La découverte en 2007 (Dieterich et al. 2007) de la mutation du gène AURKC dans le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales irréguliers polyflagelles, première cause

génétiq ue de tératospermie identifiée, a ouvert la voie à d'autres investigations. L'utilisation des nouvelles techniques de génotypage a ainsi permis d'impliquer de nouveaux gènes dans des phénotypes spécifiques d'infertilité masculine prouvant ainsi l'existence d'une composante génétique de l'infertilité masculine avec notamment la mutation des gènes SPATA16, PICK1 et DPY19L2 dans la globozoospermie, SUN5 dans le syndrome des spermatozoïdes décapités (Elkhatib et al. 2017) et DNAH1 dans le syndrome des spermatozoïdes à flagelle court (Ben Khelifa et al. 2014). Pour les patients concernés, ces avancées permettent de réaliser un diagnostic, d'affiner le pronostic et donc de mieux orienter leur prise en charge.

Deux risques sont à considérer lors de la prise en charge de ces couples en ICSI : les échecs de fécondation et le risque génétique pour la descendance, chromosomique ou génique. Excepté la forme classique du syndrome des spermatozoïdes macrocéphales polyflagellés, exclue de l'ICSI en raison des anomalies chromosomiques des spermatozoïdes, les autres syndromes sont compatibles avec la prise en charge en AMP intraconjugale, mais avec des taux de fécondation et de grossesse parfois très faibles. Deux tératospermies monomorphes touchant la tête du spermatozoïde sont plus largement décrites et explorées : la globozoospermie et le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales.

## B. Globozoospermie

Il s'agit d'une tératospermie monomorphe très rare affectant moins de 0,1% de la population masculine infertile (A. Perrin et al. 2013) caractérisée par la présence de spermatozoïdes microcéphales à têtes globuleuses dépourvues d'acrosomes. Elle peut être totale (100% des spermatozoïdes sont atteints) ou partielle. Deux types de globozoospermies ont été décrites à l'aide de la microscopie électronique (Singh 1992). Le type I est caractérisé par une tête sphérique et l'absence complète d'acrosome tandis que persistent des résidus de vésicules acrosomiques dans le type II. En dehors de la tératospermie, le reste du spermogramme peut être normal.

La globozoospermie résulte d'anomalies touchant des étapes clés de la formation de l'acrosome et l'élongation du noyau lors de la spermiogénèse. Des études immunocytochimiques et ultrastructurales de l'acrosome des cellules germinales immatures ont permis de montrer que l'acrosome est présent mais non ancré au pôle antérieur du noyau, ce qui permet de le retrouver dans le cytoplasme totalement dissocié du noyau (Alvarez Sedó, Rawe, et Chemes 2012). Ces anomalies résultent à la fois de la synthèse des vésicules acrosomiques anormalement petites,

et d'une déstructuration du réseau protéique recouvrant l'enveloppe nucléaire et ne permettant pas l'ancrage de ces vésicules et l'étalement de l'acrosome.

La présence de cas familiaux a rapidement orienté vers une pathologie génétique (Flörke-Gerloff et al. 1984; Kilani et al. 2004; Dirican et al. 2008). Des mutations dans trois gènes ont jusqu'à présent été identifiées comme pouvant expliquer ce phénotype : SPATA16 (Spermatogenesis Associated 16), PICK1 (Protein Interacting with C Kinase 1) et DPY19L2 (Protein DPY-19 homolog 2).

Localisé dans l'appareil de Golgi des spermatides, SPATA16 est impliqué dans le trafic vésiculaire et dans la formation de l'acrosome. Une mutation homozygote du gène (c.848G>A) a été identifiée pour la première fois en 2007 (Dam et al. 2007) dans une fratrie juive ashkénaze présentant une tératospermie monomorphe avec des spermatozoïdes globocéphales.

PICK1, impliqué dans le trafic vésiculaire golgien par l'interaction avec d'autres protéines lors de la formation de l'acrosome, a initialement été découvert par l'étude d'une souris knock-out (KO) pour ce gène présentant un phénotype de spermatozoïdes comparable aux globocéphales humains (Xiao et al. 2009). Une mutation homozygote faux sens (G198A) dans l'exon 13 a été identifiée chez une famille chinoise (Liu, Shi, et Lu 2010).

Plus récemment en 2011, une large délétion homozygote de 200kb sur le gène DPY19L2 a été identifiée chez 4 patients non apparentés (Koscinski et al. 2011) ainsi que chez 15 autres originaires de Tunisie tous atteints de globozoospermie (Radu Harbuz et al. 2011). Cette délétion a rapidement été confirmée par d'autres études montrant ainsi que DPY19L2 est impliqué dans plus de 70% des cas de globozoospermie quelle que soit l'origine ethnique ou géographique.

### C. Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales

#### a. Description du phénotype

La macrozoospermie est une anomalie morphologique rare observée chez moins de 1% des hommes infertiles. Des études menées sur le sperme de patients présentant des spermogrammes normaux (selon les normes de l'OMS et de David modifiées), ont permis d'estimer à moins de 2% le taux de spermatozoïdes macrocéphales pouvant être présents dans un éjaculat (Guichaoua et al. 2009a; Auger, Jouannet, et Eustache 2016). C'est en 1977 que l'équipe de Nistal rapporte pour la première fois un cas de tératospermie affectant tous les spermatozoïdes de l'éjaculat associant plusieurs anomalies morphologiques caractéristiques des



spermatozoïdes macrocéphales (Nistal, Paniagua, et Herruzo 1977) : une augmentation du volume nucléaire qui peut atteindre 4 fois le volume d'un noyau de spermatozoïde normal, une tête et un acrosome très irréguliers et la présence inconstante de plusieurs flagelles (compris entre 0 et 4) (figure 22). D'autres cas présentant les mêmes anomalies ont depuis été signalés (D. Escalier 1983; Aurore Perrin et al. 2008; Chelli et al. 2010). Les patients présentent pour la plupart une infertilité primaire avec des spermogrammes révélant un pourcentage constamment élevé de spermatozoïdes macrocéphales polyflagellés. On distingue une forme classique, où 80 à 100% des spermatozoïdes sont macrocéphales irréguliers polyflagellés, et une forme partielle où coexistent des spermatozoïdes de taille normale et des spermatozoïdes macrocéphales irréguliers polyflagellés.

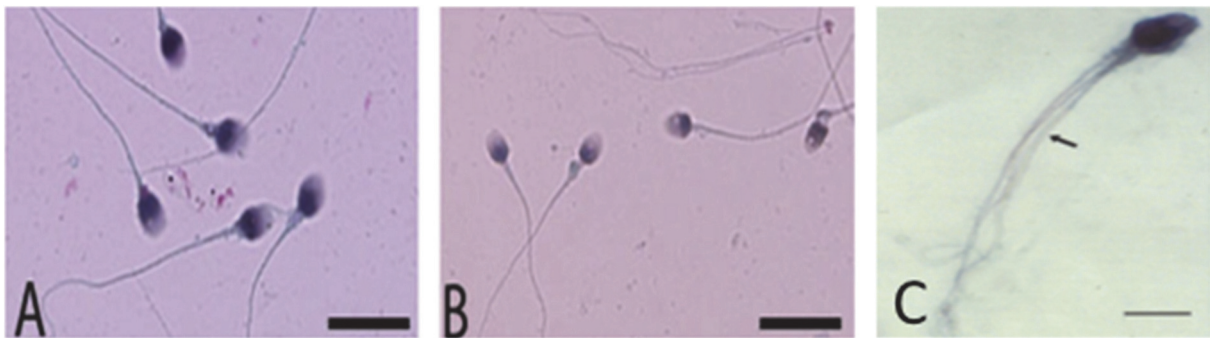


Figure 22 : Spermatozoïdes macrocéphales réguliers (A) et spermatozoïdes normaux (B) au même grossissement ; spermatozoïde macrocéphale polyflagellés irréguliers (C).

#### b. Premières explications du mécanisme de formation

L'utilisation d'un marqueur cytoplasmique de la spermatogénèse tel que la proacrosine (pro-enzyme apparaissant dans l'appareil de golgi dès le stade pachytène) a permis de suggérer que plusieurs situations, telles que l'échec de division pendant la méiose ou des événements cytoplasmiques résultant d'une perturbation du centriole ou d'un défaut de cytokinèse (Denise Escalier et al. 1992) peuvent aboutir à la formation de spermatozoïdes macrocéphales. Les spermatocytes à l'origine de spermatozoïdes macrocéphales échappent à deux points de contrôle de la méiose provoquant une déficience de division méiotique : le contrôle de l'intégrité de l'ADN au stade pachytène (pachytene checkpoint) et le contrôle d'assemblage du fuseau méiotique (spindle-assembly checkpoint) lors de la métaphase (figure 23).

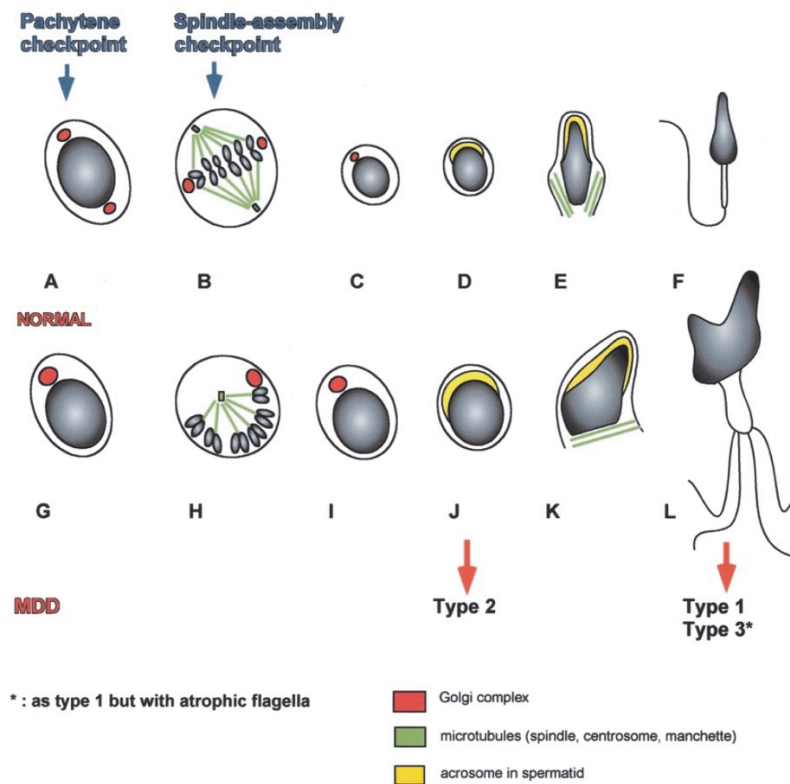


Figure 23 : Anomalies méiotiques et post-méiotique caractérisant la Déficience de Division Méiotique (Meiotic Division Deficiency MDD). (A à F) des évènements de la spermatogenèse normale, (G à L) MDD ; (G) Défaut de division des organites dans les spermatocytes à la fin du stade pachytène, néanmoins les spermatocytes réussissent à échapper au point de contrôle (H) la rupture de l'enveloppe nucléaire s'est produite et les chromosomes sont condensés et disposés en pré-métaphase. Les spermatocytes ne parviennent pas à construire un fuseau méiotique bipolaire. (I) Les cellules germinales MDD sont capables de reconstituer un noyau et d'exécuter des évènements de spermiogénèse donnant lieu à des spermatozoïdes macrocéphales. (J) Dans le type 2 la spermiogénèse est arrêtée durant l'étape de l'acrosome. (K) Les types 1 et 3 sont capables d'une certaine mise en forme de la tête du spermatozoïde mais la présence unilatérale de microtubules conduit à une forme nucléaire asymétrique. (L) Pour ces mêmes types, la spermatogenèse évolue afin de donner naissance à des spermatozoïdes matures caractérisés par la présence d'un noyau géant et 4 flagelles. Dans le type 3 une anomalie de la spermatogenèse supplémentaire est observée au niveau de la croissance axonémale qui conduit à la réduction de la taille de l'axonème ainsi que la désorganisation de sa structure (D. Escalier 1999).

Au stade pachytène, la présence de dommages sur l'ADN est reconnue par Cdc2 (cell division cycle protein 2 homolog) et la protéine kinase Wee1, deux protéines intervenant dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et qui inactivent le Cdc28, induisant ainsi l'apoptose des spermatocytes I défectueux. Le fait que ces spermatocytes I arrivent à passer ce contrôle suggère l'absence de dommages de leur ADN. Aussi, lors de la métaphase, un assemblage défectueux du fuseau méiotique engendre un signal inhibiteur bloquant le passage à l'anaphase jusqu'à ce que les bivalents soient correctement attachés au fuseau méiotique par les

kinétochores. Un défaut d'assemblage prolongé du fuseau entraîne l'activation du contrôle d'assemblage du fuseau méiotique et provoque l'élimination des spermatocytes anormaux. Des études ont rapporté chez la drosophile et la souris (Mori et al. 1999) puis chez l'homme (D. Escalier 1999) que le développement des spermatides pouvait progresser sans l'achèvement de la méiose : les perturbations de la méiose n'entraînent pas le blocage de la différenciation des spermatides qui donnent lieu à des spermatozoïdes dysmorphiques macrocéphales polyflagellés.

#### c. Premières approches génétiques par FISH (Fluorescent In Situ Hybridation)

Yurov réalise pour la première fois en 1996 une analyse par FISH sur sperme provenant d'un patient atteint d'un syndrome des spermatozoïdes macrocéphales (Yurov et al. 1996) qui montre un contenu chromosomique diploïde pour les spermatozoïdes macrocéphale et haploïde pour les spermatozoïdes morphologiquement normaux issus de cet éjaculat. Dans la première observation de cas familiaux (Kahraman 1999), la majorité des patients (10/17) présentaient une histoire familiale d'infertilité masculine. La seconde observation, s'est basée sur une forme familiale chez deux frères infertiles avec une forme homogène de spermatozoïdes macrocéphales (Benzacken 2001). L'exploration génétique par caryotype somatique n'a révélé aucune anomalie chez les patients concernés par ces deux études. En 2001, Benzacken réalise à son tour une exploration par FISH à 3 sondes (chromosomes 18, X et Y) sur les spermatozoïdes d'un patient présentant une forme avec 50% de spermatozoïdes macrocéphales. Tous les spermatozoïdes analysés (1148) présentaient des aneuploïdies avec 21,6% de noyaux diploïdes, 62,4% triploïdes 13,3% tétraploïdes et 2,7% hyperploïdes. D'autres études ont ensuite confirmé par FISH le taux élevé d'aneuploïdies des spermatozoïdes macrocéphales (Devillard et al. 2002; Guthäuser et al. 2006; Mateu 2006; Aurore Perrin et al. 2008) avec 0 à 8% de formes haploïdes, 20 à 60% de formes diploïdes, 10 à 62% de formes triploïdes et 5,1 à 36% de formes tétraploïdes. Le SSM est ainsi la seule anomalie morphologique des spermatozoïdes directement et constamment corrélée à la présence d'aneuploïdies dans les spermatozoïdes.

#### d. Des spermatozoïdes en réalité tétraploïdes

Devant l'hétérogénéité des résultats issus des explorations par FISH des spermatozoïdes macrocéphales et la difficulté de compréhension du mécanisme pouvant aboutir à une telle hétérogénéité chromosomique gamétique, une technique de mesure de l'ADN des spermatozoïdes a été développée (Dieterich et al. 2009). Elle montre qu'en réalité, tous les spermatozoïdes macrocéphales sont tétraploïdes (figure 24).

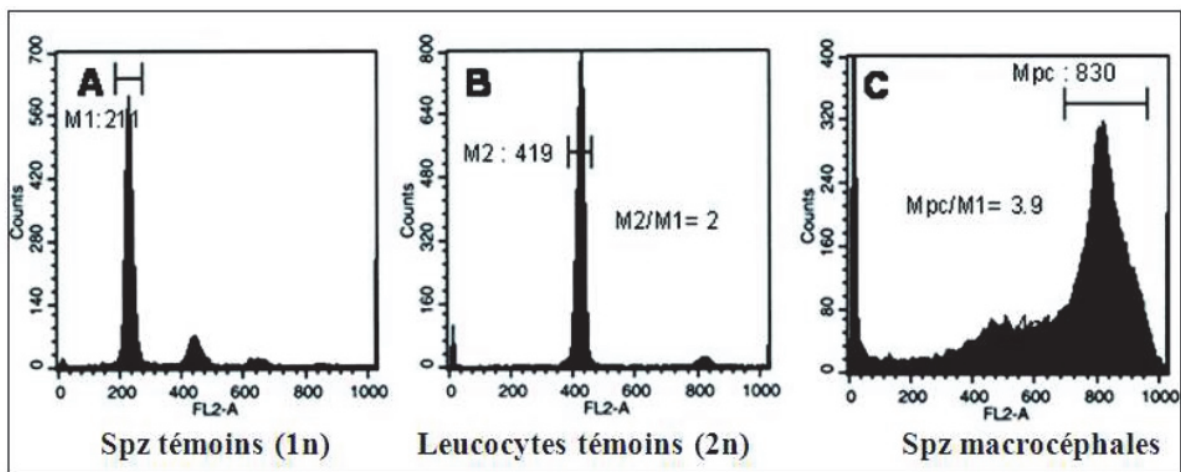


Figure 24 : Histogramme de cytométrie en flux obtenu après décondensation et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. A) spermatozoïdes normaux provenant d'un donneur fertile (1n). B) Leucocytes témoins (2n). C) spermatozoïdes de patients porteurs de la mutation c.144delC à l'état homozygote (4n). L'axe des abscisses (FL2-A) représente l'intensité de la fluorescence sur une échelle linéaire. Il est directement proportionnel à la quantité d'ADN fixée par chaque cellule analysée. L'axe des ordonnées représente le nombre de cellules et événements analysés sur une échelle linéaire. (Dieterich et al. 2009)

La discordance entre les résultats de l'analyse par FISH et par cytométrie en flux met en évidence les limites de la FISH et montre que dans des situations particulières comme celle-ci, la superposition des signaux peut conduire à une sous-estimation très importante du nombre de chromosomes/chromatides. En effet, Une majorité des spermatozoïdes analysés par FISH apparaît comme diploïdes, indiquant que la majorité des chromosomes homologues a initié sa ségrégation mais que les deux chromatides sont restées à proximité et apparaissent comme un seul signal en FISH. Un petit pourcentage de spermatozoïdes apparaissant comme haploïde après l'analyse, indique que les bivalents ne sont pas séparés et que les quatre chromatides adjacents donnent un seul signal après l'hybridation par FISH. Enfin des spermatozoïdes tétraploïdes ont également été détectés par FISH indiquant que pour ces gamètes les

chromatides et les bivalents sont suffisamment séparés pour permettre l'identification de quatre signaux distincts.

En réalité, dans la forme classique, tous les spermatozoïdes sont tétraploïdes. Dans la forme partielle, le taux d'aneuploïdie est toujours supérieur au taux de spermatozoïdes macrocéphales (Guthauser et al. 2006).

- e. L'apport du séquençage génomique : découverte de l'implication du gène AURKC (Aurora Kinase C) dans le phénotype des spermatozoïdes macrocéphales

Devant l'aspect homogène des spermatozoïdes présents dans un même éjaculat et la présence fréquente d'une histoire familiale d'infertilité masculine, une origine génétique du SSM a été suspectée. En 2007, l'équipe de Dieterich utilise une approche positionnelle avec un kit de 400 marqueurs microsatellites, afin d'effectuer une analyse du génome entier sur neuf hommes d'origine nord-africaine présentant 100 % de spermatozoïdes macrocéphales. La même mutation homozygote a été identifiée sur le gène AURKC (c.144delC) chez l'ensemble des patients testés. Situé sur le chromosome 19, le gène AURKC comporte 7 exons codants pour une protéine de 309 acides aminés (Bernard et al. 1998) exprimée préférentiellement dans les testicules et impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire lors de la méiose (Kimura et al. 1999). La mutation c.144delC introduit un décalage du cadre de lecture qui conduit à la terminaison prématurée de la traduction et à la production d'une protéine non fonctionnelle tronquée de son domaine kinase. Ceci va entraîner la non ségrégation des chromosomes durant la méiose et un échec de la cytokinèse (figure 25) qui conduit à un blocage de la division (Dieterich et al. 2009).

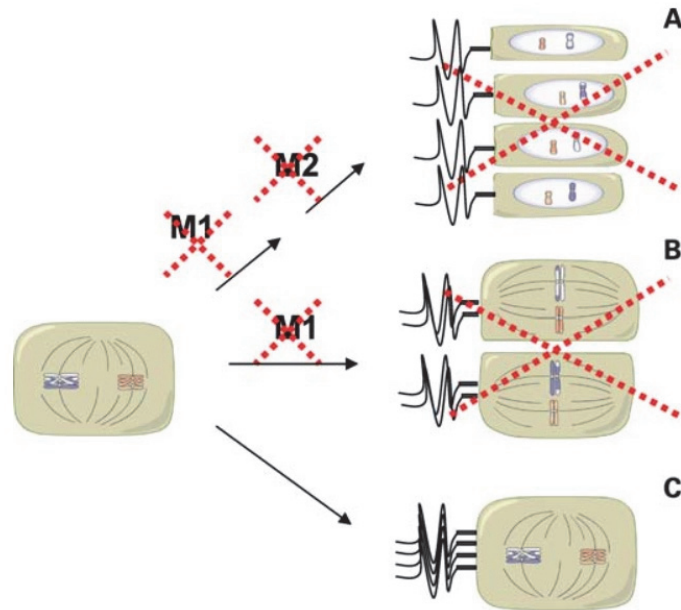


Figure 25 : Représentation schématique de la spermatogenèse chez (A) un homme fertile ; (C) patient homozygote pour la mutation c.144delC. Chez l'homme fertile le spermatocyte va subir deux divisions méiotiques (M1, M2) qui vont permettre de produire quatre gamètes haploïdes. L'absence d'une protéine fonctionnelle AURKC entraîne un blocage de la division après la synthèse de l'ADN mais avant la 1ère division méiotique (B) (Dieterich et al. 2009).

La mutation est le plus souvent retrouvée chez des hommes d'origine nord-africaine où sa fréquence allélique est estimée entre 1% et 2%, soit une fréquence de la maladie de l'ordre de 1-2/10 000 (R. Harbuz et al. 2009; El Kerch et al. 2011; Eloualid et al. 2014). Dans cette population, cette fréquence est comparable à celle des microdélétions du chromosome Y, considérées à ce jour comme l'événement génétique non-chromosomique le plus fréquent altérant la spermatogenèse. L'étude des haplotypes a permis de montrer que cette mutation a dérivé d'un ancêtre commun apparu il y a environ 15 siècles au Maghreb (Dieterich et al. 2009).

#### f. La protéine Aurora Kinase C (AURKC)

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent les réactions de phosphorylation des acides aminés ayant une fonction alcool : serine, thréonine et tyrosine. De nombreuses protéines kinases sont essentielles au déroulement du cycle cellulaire. Parmi celles-ci, les protéines de la famille Aurora sont des sérine/thréonine kinases qui ont des rôles importants dans la régulation du cycle cellulaire (Kimmins et al. 2007). Elles sont classées sous les noms d'Aurora-A, -B et -C, selon leur degré d'homologies de séquence et de fonction. Le nom attribué à cette famille correspond au nom du premier gène cloné chez la *D. melanogaster*, qui

muté, entraîne la formation de fuseaux de divisions monopolaires évoquant des figures d'aurore boréale (Glover et al. 1995; Bolton et al. 2002). Ces protéines kinases participent à la régulation centrosomale et aux fonctions microtubulaires en assurant la ségrégation correcte des chromosomes et l'achèvement efficace de la cytokinèse. La partie N-terminale est un domaine riche en résidus basiques, de longueurs et de séquences très variables d'une Aurora à l'autre. Des études ont permis de montrer que c'est cette partie amino-terminale des protéines Aurora qui détermine leur localisation (Giet et Prigent 2001). En effet, chaque kinase possède une localisation cellulaire spécifique aux étapes de la division cellulaire :

- La protéine Aurora-A est présente au niveau des centrosomes et des pôles du fuseau mitotique ;
- La protéine Aurora-B se localise au niveau des kinétochores jusqu'à la transition métaphase/anaphase, puis sur la partie centrale du fuseau ;
- La protéine Aurora-C s'exprime principalement dans les cellules germinales mâles, dans lesquelles elle a une localisation centrosomale en anaphase uniquement (Nigg 2001).

Au cours du cycle cellulaire, les trois gènes des Aurora kinases subissent une forte régulation d'expression pour chacun des trois gènes, l'abondance au niveau de l'ARNm comme au niveau protéique est faible en phase G1, augmente fortement lors de la phase G2 pour atteindre un pic au cours de la division cellulaire et décroître rapidement après celle-ci.

Chez les mammifères, chacune des trois kinases assure des fonctions mitotiques différentes, illustrées par des localisations distinctes, mais toutes en relation directe avec le processus de ségrégation des chromosomes.

Le niveau d'expression de la protéine AURKC est faible durant la phase S et atteint son maximum pendant la transition G2 /M, ce qui indique son implication dans la régulation de la division cellulaire. Elle est fortement exprimée au cours de la spermatogenèse et plus particulièrement au cours de la formation des deux fuseaux méiotiques en méiose I et II et lors des deux étapes de transitions entre l'anaphase I/télophase I et l'anaphase II/télophase II (Tang, Lin, et Tang 2006). Des analyses par immunofluorescence ont révélé qu'Aurora-C est localisée au niveau des centromères des spermatocytes durant l'anaphase, plus précisément au niveau des centrosomes, et y persiste jusqu'à la cytokinèse. Un défaut d'activité de l'Aurora kinase C perturbe la division cellulaire et entraîne des anomalies de polyploïdie. De ce fait, dans tous les cas de forme classique de ce syndrome, l'AMP avec ces spermatozoïdes est formellement contre-indiquée. Des ICSI ont été tentées pour des couples dont les hommes présentaient une proportion élevée de spermatozoïdes macrocéphales associés à des flagelles multiples. Elles

ont permis à l'équipe de Kahraman d'obtenir des embryons et quelques grossesses, mais avec des taux nettement inférieurs à ceux obtenus chez des couples dont l'homme présentait une tératospermie polymorphe d'importance équivalente (9,1% contre 40%) (Kahraman 1999). Malgré l'obtention de ces rares embryons issus de tentatives acharnées d'ICSI, toutes les grossesses se sont soldées par des fausses-couches spontanées. Du fait du déséquilibre chromosomique gamétique chez les patients porteurs de la mutation AURKC, le recours à l'ICSI avec le sperme de ces patients est contre-indiqué.

#### g. Formes partielles et prise en charge en AMP

Parallèlement à la forme classique du SSM, et de manière plus fréquente, il existe des formes partielles dans lesquelles on retrouve des taux plus faibles de spermatozoïdes macrocéphales irréguliers tous monoflagellés (entre 20% et 80%). La coexistence de formes typiques et macrocéphales peut résulter soit de la présence d'une mosaïque germinale, soit de l'expression variable et de la pénétrance incomplète d'une mutation pas encore identifiée, qui présenterait une sensibilité au microenvironnement testiculaire. La technique de FISH réalisée chez certains patients montre que dans ces formes partielles, le pourcentage d'anomalies chromosomiques est toujours supérieur au pourcentage de spermatozoïdes macrocéphales (Achard et al. 2007), ce qui suggère que des spermatozoïdes de morphologie apparemment normale et susceptibles d'être féconds sont porteurs d'aneuploïdies ou même de diploïdies, avec les conséquences néfastes que l'on connaît sur le développement embryonnaire. On retrouve d'ailleurs dans les antécédents de certains couples de patients atteints, des antécédents de fausses couches à répétition ou de morts périnatales (Benzacken 2001) soulevant l'hypothèse d'une atteinte somatique associée à l'atteinte méiotique.

Des équipes ont tenté des prises en charge par ICSI chez des couples où les hommes présentaient un taux de spermatozoïdes macrocéphales irréguliers monoflagellés compris entre 20% et 80% (Guichaoua et al. 2009a). Comme pour Kahraman, les taux de grossesse (13%) étaient nettement inférieurs à ceux obtenus chez les autres couples (28%) présentant des tératospermies polymorphes d'intensité équivalente. Sur les 20 dernières années, 18 publications ont rapporté les issues de prises en charge en AMP chez 124 patients présentant un syndrome des spermatozoïdes macrocéphales (Bruno Guthauser et al. 2016). Une prise en charge par ICSI a été possible pour 101 patients présentant une forme partielle et contre-indiquée pour 23 présentant une forme totale. Au total, 5 naissances ont été obtenues sur 111 tentatives d'ICSI réalisées, donnant un espoir de prise en charge aux patients présentant une



forme partielle du SSM. Une révision récente de la littérature a permis de proposer une stratégie d'exploration des patients afin d'adapter leur prise en charge en AMP (Guthauser et al. 2006) (figure 26). Elle propose de distinguer les formes avec des spermatozoïdes macrocéphales irréguliers polyflagelles à des taux élevés, des formes avec des taux modérés de spermatozoïdes macrocéphales monoflagellés. En effet, la première est associée à une infertilité masculine sévère du fait des aneuploïdies et polyplœidies observées. Une recherche de la mutation AURKC, très fréquemment associée à cette forme, doit être réalisée. Un résultat positif contre-indique l'utilisation en ICSI du sperme du patient du fait des anomalies chromosomiques impliquant tous les spermatozoïdes du patient. Une orientation vers le don de sperme est alors la seule issue de prise en charge en AMP. Dans le cas où il existe quelques spermatozoïdes morphologiquement normaux, une analyse par FISH sur sperme peut être proposée afin de vérifier le taux d'aneuploïdies. La détection de spermatozoïdes euploïdes permet, en cas de recherche négative pour la mutation AURKC, d'envisager l'utilisation des spermatozoïdes du patient en ICSI avec sélection pour l'injection des spermatozoïdes morphologiquement normaux.

Dans les formes avec des taux modérés de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés, affiner le diagnostic par des tests génétiques complémentaires longs et coûteux n'est pas toujours nécessaire. En effet, il peut arriver que des taux atteignant 20% de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés soient observés sans que cela n'impacte les résultats de la prise en charge en AMP du fait d'une concentration élevée en spermatozoïdes morphologiquement normaux. L'exploration des patients avec des taux modérés doit donc être soumise à l'appréciation du biologiste qui détermine en fonction des autres paramètres du spermogramme et de la technique envisagée la nécessité de réaliser ou pas ces explorations. Dans le cas où celles-ci s'avèrent nécessaires, une exploration par FISH sur sperme déterminant le taux d'aneuploïdies doit d'abord être réalisé. Lorsque son résultat est normal, c'est à dire inférieur à 1% d'aneuploïdies (Morel et al. 1997), l'exploration de la condensation de l'ADN des spermatozoïdes oriente le choix de la technique d'AMP à utiliser : lorsque la condensation de l'ADN des spermatozoïdes est normale, toutes les techniques d'AMP peuvent être envisagées, lorsque seuls les spermatozoïdes à têtes normales présentent un ADN normalement condensé, une ICSI avec sélection des spermatozoïdes morphologiquement normaux doit être préférée. Lorsque la FISH révèle un taux d'aneuploïdie anormal, l'ICSI avec recours au diagnostic préimplantatoire (lorsqu'il est possible) peut être proposée par quelques centres agréés pour la pratique du diagnostic génétique préimplantatoire.

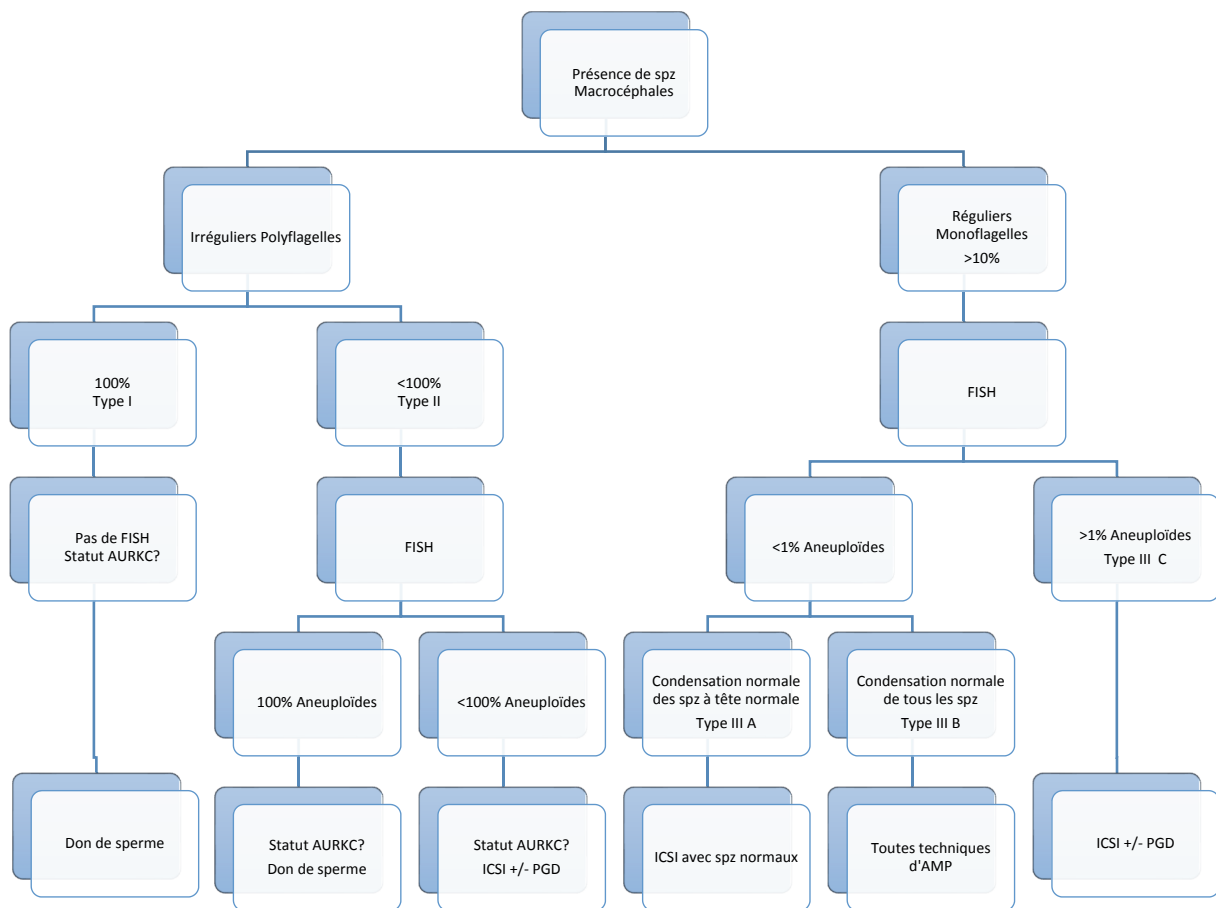


Figure 26 : Arbre décisionnel de prise en charge en AMP pour les patients présentant un taux de spermatozoïdes macrocéphales > 10%

#### h. Un phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales : les macrocéphales réguliers monoflagellés

Un phénotype plus rare de spermatozoïdes macrocéphales a récemment été rapporté (Guthauser et al. 2011; Molinari et al. 2013). Ils ont la particularité d'être monoflagellés et présentent un contour céphalique régulier (figure 22). L'exploration génétique des patients connus à ce jour avec ce phénotype ne retrouve pas de mutation AURKC. Dans le premier cas (B. Guthauser et al. 2011), aucune anomalie chromosomique n'a été retrouvée par FISH sur sperme, en revanche dans le second cas, la majorité des spermatozoïdes apparaissaient aneuploïdes par FISH et cytométrie de flux. Les deux cas ont pu bénéficier d'une prise en charge en AMP par ICSI. Une naissance vivante a été obtenue pour l'un (Guthauser et al. 2011) et trois fausses couches avant la 12<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée pour l'autre (Molinari et al. 2013).

Bien que le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales polyflagellés soit la seule anomalie morphologique des spermatozoïdes directement et constamment corrélée à la présence d'anomalies chromosomiques des spermatozoïdes, il n'existe à ce jour aucun critère permettant d'établir avec certitude la normalité cytogénétique d'un spermatozoïde à partir de sa morphologie. Il n'existe que des facteurs de risques, des probabilités, avec les conséquences que cette remarque peut avoir lors de la sélection du spermatozoïde en ICSI. L'amélioration des connaissances sur ce sujet doit permettre une meilleure évaluation des risques afin de proposer une prise en charge adaptée à la situation. L'identification d'une étiologie pour l'anomalie apporte au patient un confort non négligeable dans une question aussi sensible que la fertilité. Elle permet également de préciser la conduite à tenir pour l'enfant potentiel dans le cas où une prise en charge par ICSI est envisagée.

En s'appuyant sur l'ensemble de ces données, l'objectif de ce travail est de :

- 1) Dresser un état des lieux des spermatozoïdes macrocéphales observés chez les patients ayant bénéficié d'un spermogramme avec spermocytogramme dans le laboratoire de spermologie du centre de procréation médicalement assistée de l'hôpital de la Conception à Marseille ;
- 2) Explorer par séquençage de nouvelle génération les échantillons d'ADN de 3 patients présentant un phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés afin d'identifier des mutations pouvant être à l'origine de ce phénotype puis d'investiguer les mutations retrouvées par des tests fonctionnels.

## **PARTIE 2 : Notre étude**

## I. Rétrospective de près de 10 ans sur les spermatozoïdes macrocéphales au CPMA de la Conception à Marseille entre le 01/01/2008 et le 19/09/2017

### A. Les chiffres

Entre le 01/01/2008 et le 12/09/2017, 10626 spermogrammes avec spermocytogrammes ont été réalisés chez 7666 patients au laboratoire de spermologie du CPMA de l'hôpital de la Conception à Marseille. 3737 spermocytogrammes, soit 35% des examens, étaient considérés comme normaux, c'est à dire avec des valeurs de formes typiques supérieures à 23%, seuil défini par Auger (Auger, Jouannet, et Eustache 2016). Un taux de spermatozoïdes macrocéphales inférieur ou égal à 2% a été retrouvé sur 2959 (valeur seuil au 95<sup>e</sup> percentile selon Auger) soit 79% des examens et 3552 montraient un taux inférieur ou égal à 7% (soit 95% des examens). Contrairement à la valeur seuil de 2% définie par d'Auger, le seuil normal de spermatozoïdes macrocéphales dans notre centre se situe donc à 7%. Nous nous sommes ensuite intéressés à la répartition du taux de spermatozoïdes macrocéphales au sein de l'ensemble de la population d'hommes fréquentant notre centre (figure 27).

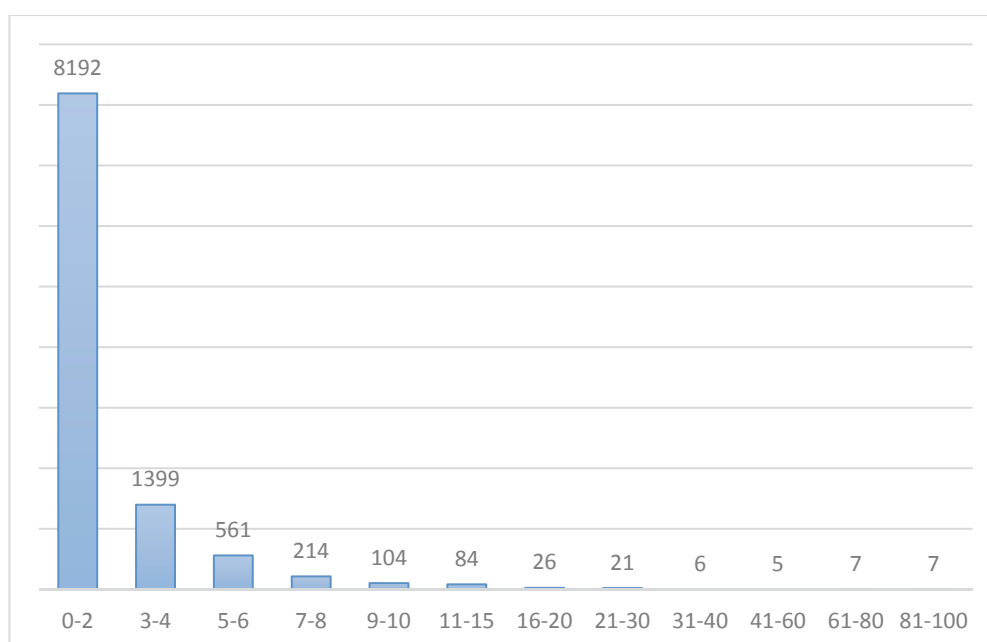


Figure 27 : Répartition des spermocytogrammes en fonction du pourcentage de spermatozoïdes macrocéphales entre le 01/01/2008 et le 12/09/2017 au laboratoire de spermologie du CPMA de la Conception à Marseille.

L'analyse morphologique a révélé un taux de spermatozoïdes macrocéphales supérieur à 2% sur 2434 spermocytogrammes (soit 23% des examens) chez 1662 patients (soit 22% des patients).

Un taux de spermatozoïdes macrocéphales au moins égal à 20% a été retrouvé sur 46 spermocytogrammes (0,43%) chez 35 patients (0,46%) (Tableau 1). Lorsque l'analyse du spermocytogramme a été répétée sur un 2<sup>e</sup> recueil, une normalisation du taux de spermatozoïdes macrocéphales a été observée chez 11 patients sur 21 soit 52% des patients (N°4, 5, 9, 11, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 25) et une diminution de plus de 50% de ce taux chez un patient (N°8). Tous ces patients présentaient une forme irrégulière monoflagellée de spermatozoïdes macrocéphales. Cette observation permet d'émettre l'hypothèse que la présence de spermatozoïdes macrocéphales irréguliers monoflagellés, même à des taux relativement élevés, pourrait être transitoire et dépendre de variations dans le microenvironnement testiculaire justifiant ainsi le contrôle systématique des spermogrammes des patients présentant ce genre de profil avant toute prise en charge en AMP ou d'examens complémentaires.

Patient	Age	Origine	Spz/éjac (M)	Mobilité a+b+c (%)	FT (%)	TM (%)	FM (%)	M (%)	Info complémentaires
1	29	Maghreb	16	40	0	4	6	20	1 seul R
2	29	Europe	240	60	18	3	14	21	1 seul R
3	33	Maghreb	38	60	7	11	23	21	1 seul R
4	30	Turquie	24	0	5	0	4	22	5% sur 2 <sup>e</sup> R
5	36	Europe	13	5	0	10	13	22	4% sur 2 <sup>e</sup> R
6	32	Europe	164	70	24	9	17	22	1 seul R
7	44	Europe	419	70	8	8	7	23	1 seul R
8	26	Europe	122	60	40	0	5	23	11% sur 2 <sup>e</sup> R
9	37	Maghreb	65	40	15	3	10	23	7% sur 2 <sup>e</sup> R
10	43	Europe	152	80	21	2	9	23	18% sur 2 <sup>e</sup> R
11	32	Europe	107	60	12	2	1	24	2% sur 2 <sup>e</sup> R
12	31	Europe	75	50	25	1	3	25	24% sur 2 <sup>e</sup> R
13	45	Europe	46	50	4	3	8	25	1 seul R
14	47	Europe	253	40	6	2	0	26	6% sur 2 <sup>e</sup> R
15	41	Maghreb	160	30	9	1	1	26	2% sur 2 <sup>e</sup> R

16	43	Maghreb	147	60	21	7	6	26	1% sur 2 <sup>e</sup> R
17	42	Europe	48	50	25	6	17	27	1 seul R
18	37	Europe	26	40	2	0	20	29	AURKC Négatif, FISH 23% aneup. 1 seul R
19	41	Maghreb	47	55	17	3	5	30	1 seul R
20	47	Europe	287	70	39	3	22	31	1 seul R
21	40	Europe	15	10	9	1	5	33	1% sur 2 <sup>e</sup> R
22	38	Europe	12	70	2	9	8	34	4% sur 2 <sup>e</sup> R
23	41	Europe	23	40	3	12	17	36	7% sur 2 <sup>e</sup> R
24	47	Europe	45	60	33	3	7	38	1 seul R
25	49	Europe	63	35	8	3	2	38	3% sur 2 <sup>e</sup> R
26	41	Europe	30	40	12	2	32	54	1 seul R
27	29	Maghreb	5	40	0	6	4	61	AURKC Négatif, FISH Normale 44% sur 2 <sup>e</sup> R
28	31	Maghreb	28	20	0	3	50	65	1 seul R
29	32	Maghreb	0.85	15	1	3	14	68	58% sur 2 <sup>e</sup> R
30	37	Maghreb	13	85	0	5	5	77	AURKC Négatif, FISH Normale 70% sur 2 <sup>e</sup> R
31	40	Europe	7	15	0	7	41	71	AURKC Négatif, 43% sur 2 <sup>e</sup> R
32	34	Maghreb	3	25	0	11	45	90	50% sur 2 <sup>e</sup> R
33	38	Maghreb	24	20	0	7	25	91	1 seul R
34	36	Syrie	37	10	0	5	82	92	AURKC Positif
35	37	Maghreb	137	15	0	11	70	93	AURKC Négatif 92% sur 2 <sup>e</sup> R

Tableau 1: Paramètres du spermogramme et spermocytogramme de 35 patients présentant un taux de spermatozoïdes macrocéphales d'au moins 20%. (FT=formes typiques ; TM=têtes multiples ; FM=flagelles multiples ; M=macrocéphales ; R=recueil).

## B. Prises en charge en AMP

18 patients présentant un taux de spermatozoïdes macrocéphales d'au moins 20% ont pu bénéficier d'une prise en charge en AMP avec leur propre sperme (tableau 2) dont 16 dans notre centre. Ces prises en charge ont permis d'obtenir 9 naissances vivantes. Dans le groupe de patients présentant des spermatozoïdes macrocéphales irréguliers monoflagellés (MIM), le taux de fécondation moyen était de 54%, le taux de transfert par ponction de 71% avec 1,4 embryon par transfert permettant ainsi d'atteindre un taux de grossesse par transfert de 28%. Ces taux ne sont pas significativement différents de ceux observés pour des patients présentant des tératospermies polymorphes de même intensité. Dans le groupe des patients présentant des spermatozoïdes macrocéphales irréguliers polyflagellés (MIP), des prises en charge par AMP dans d'autres centres ont été réalisées malgré la contre-indication à l'utilisation de ce genre de gamètes. Comme attendu, le taux de fécondation moyen (7,7%) était bien inférieur au groupe MIM et aucun transfert d'embryon n'a été possible. Une prise en charge en don de sperme dans notre centre a été réalisée pour le patient 32 et une naissance vivante a été obtenue. Deux patients ont retenu notre attention (patient 27 que nous appellerons BY et patient 30 que nous appellerons BB). Il s'agit de deux frères d'origine maghrébine présentant un profil rare et particulier de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés. Ils feront l'objet d'une étude plus approfondie (Cf. infra).

	Patient	Tech	Ovo	MII	2PN	% féc	Emb diplo	Emb vitrifiés	E/Tf	hCG+	Naissances
<b>MIM</b>	<b>8</b>	FIV	18	6	5	83%	5	3	2	1	2
	<b>9</b>	FIV	6	4	1	25%	1	0	1	0	0
		ICSI	6	4	1	25%	1	0	1	1	1
	<b>10</b>	ICSI	5	5	3	60%	3	0	2	0	0
		ICSI	15	5	2	40%	2	2	0	0	0
	<b>11</b>	FIV	7	7	2	29%	2	0	2	0	0
	<b>13</b>	ICSI	nr	nr	nr	nr	nr	nr	1	1	1
	<b>14</b>	ICSI	4	4	2	50%	2	2	0	0	0
		TEC							1	0	0
	<b>15</b>	ICSI	12	8	6	75%	6	2	1	1	0
		TEC							1	1	1
		TEC							1	0	0
	<b>16</b>	ICSI	7	7	6	86%	6	0	2	0	0
ICSI		4	4	4	100%	2	0	2	0	0	
ICSI		10	9	7	78%	7	0	2	0	0	
<b>17</b>	ICSI	27	19	12	63%	12	4	1	0	0	



		TEC							1	0	0
		TEC							1	0	0
	22	ICSI	3	3	2	67%	2	0	2	1	1
	24	FIV	6	6	3	50%	3	0	2	1	1
	25	FIV	12	12	0	0%	0	0	0	0	0
		ICSI	4	3	0	0%	0	0	0	0	0
	26	FIV	4	3	0	0%	0	0	0	0	0
		ICSI	9	7	4	57%	4	2	2	0	0
		TEC							1	0	0
		TEC							1	0	0
	29	ICSI	7	5	4	80%	4	1	2	1	1
		TEC							1	0	0
		ICSI	15	15	9	60%	9	6	0	0	0
<b>MIP</b>	32	ICSI	5	4	0	0%	0	0	0	0	0
	35	FIV	11	10	1	10%	1	0	0	0	0
		ICSI	21	12	1	8%	1	0	0	0	0
<b>MRM</b>	27	ICSI	16	10	4	40%	4	0	2	1	1
	30	ICSI	17	12	8	67%	8	0	2	0	0

Tableau 2: Issues des prises en charge par AMP des 18 couples dont les hommes présentent un taux de macrocéphales à au moins 20%. Les numéros des patients correspondent à ceux donnés sur le tableau 1. (MIM=macrocéphales irréguliers monoflagellés, MIP=macrocéphale

### C. Discussion

Les tératospermies représentent une part importante dans les étiologies d'infertilité masculine avec un impact plus important lorsqu'elles sont monomorphes. Le diagnostic de ces tératospermies monomorphe concerne tous les laboratoires réalisant des spermogrammes et spermocytogrammes et ce dépendamment de leur recrutement géographique avec une prédominance dans le bassin méditerranéen et plus précisément en Afrique du Nord ou dans toute région avec une forte consanguinité. Les laboratoires doivent être attentifs et réactifs face à ce genre d'anomalies en orientant les patients concernés vers des centres spécialisés afin que des explorations complémentaires adaptées à chaque profil puissent y être menées. Face à la rareté des tératospermies monomorphes, les centres spécialisés se doivent de collaborer en réseau afin d'optimiser les prises en charge et d'améliorer les connaissances sur chacun de ces syndromes. L'utilisation des spermatozoïdes macrocéphales en AMP nécessite des explorations préalables afin d'affiner le diagnostic. Dans le cas de notre étude parmi les patients de l'hôpital de la Conception, le profil le plus fréquent de spermatozoïdes macrocéphales rencontré est irrégulier monoflagellé (SMIM) avec des taux variant dans le temps voire se normalisant chez 11 patients sur 21 ayant réalisé un nouveau recueil. Lorsque le contrôle du spermogramme

confirme la présence à des taux élevés d'un clone de SMIM, des possibilités de prise en charge en AMP intraconjugale peuvent être proposées après exploration du sperme afin de vérifier l'absence d'aneuploïdies des spermatozoïdes. Nos résultats de prises en charge montrent des taux de fécondation et de grossesse équivalents à ceux observés chez le reste de la population et 8 naissances pour 14 couples ont été obtenues. Pour les patients présentant des pourcentages compris entre 7% et 20%, la conduite à tenir dépend des autres paramètres du spermogramme, notamment la concentration et la mobilité. En effet, dans cette tranche, un nombre suffisant de spermatozoïdes morphologiquement normaux permet de compenser l'anomalie morphologique.

Dans les cas, plus rares, où les patients présentent des spermatozoïdes macrocéphales polyflagellés, l'AMP intraconjugale est formellement contre-indiquée du fait des déséquilibres chromosomiques constamment présents sur tous les spermatozoïdes et objectivés par FISH sur sperme. La recherche de la mutation du gène AURKC, retrouvée dans près de 70% des cas, permet de fournir une étiologie aux patients concernés. Une information claire du couple sur la pathologie doit être donnée afin de les orienter sur les possibilités de recours au don de sperme ou à l'adoption. Dans tous les cas, face à une tératospermie monomorphe, l'identification d'autres cas familiaux doit faire suspecter une origine génétique de l'infertilité et les patients adressés à des équipes de recherche spécialisées dans l'infertilité.

## II. Exploration génétique par séquençage de nouvelle génération d'un phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés

### A. Matériels et méthodes

#### *Patients et échantillons*

##### **Deux frères atteints**

Les deux premiers patients recrutés sont deux frères d'origine maghrébine, BB 37 ans et BY 29 ans (figure 28), qui ont consulté chacun en couple pour une infertilité et pour laquelle le clinicien a demandé un bilan spermatique. Le recueil de sperme a été effectué au laboratoire par masturbation après un délai d'abstinence compris entre 2 et 7 jours. Après 30 minutes à 37°C permettant la liquéfaction du sperme, l'analyse des paramètres spermatiques a été réalisée selon les normes OMS 2010 (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010) et l'analyse morphologique effectuée selon la classification de David modifiée (Auger, Eustache, et David 2000). Les patients ont reçu une information et donné leur consentement éclairé pour l'inclusion et le stockage de leurs prélèvements dans le centre de ressource biologique dans le cadre d'analyses génétiques.

Les deux frères présentaient une infertilité primaire du couple et de chacun. Ils n'avaient aucun antécédent de torsion testiculaire, cryptorchidie, testicule ascenseur ou de fièvre récente. Les résultats de deux spermogrammes à 3 mois d'intervalle montraient la persistance d'une oligospermie (13M/éjaculat pour BB et 5M/éjaculat pour BY) et d'une tératospermie majeure (0% de formes typiques chez BB et BY) avec la présence importante de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés (77% pour BB et 61% pour BY) (figure 29). Les mobilités à 1h (progressifs + non progressifs) étaient normales avec 85% pour BB et 40% pour BY. Des explorations complémentaires ont été réalisées pour les deux patients. La recherche de la mutation AURKC était négative et la FISH sur spermatozoïdes utilisant 3 sondes montrait un taux d'aneuploidie normal chez les deux frères (<1%) (tableau 3). Une prise en charge en AMP par FIV-ICSI a été réalisée pour Mr BY et a donné lieu à une naissance vivante.

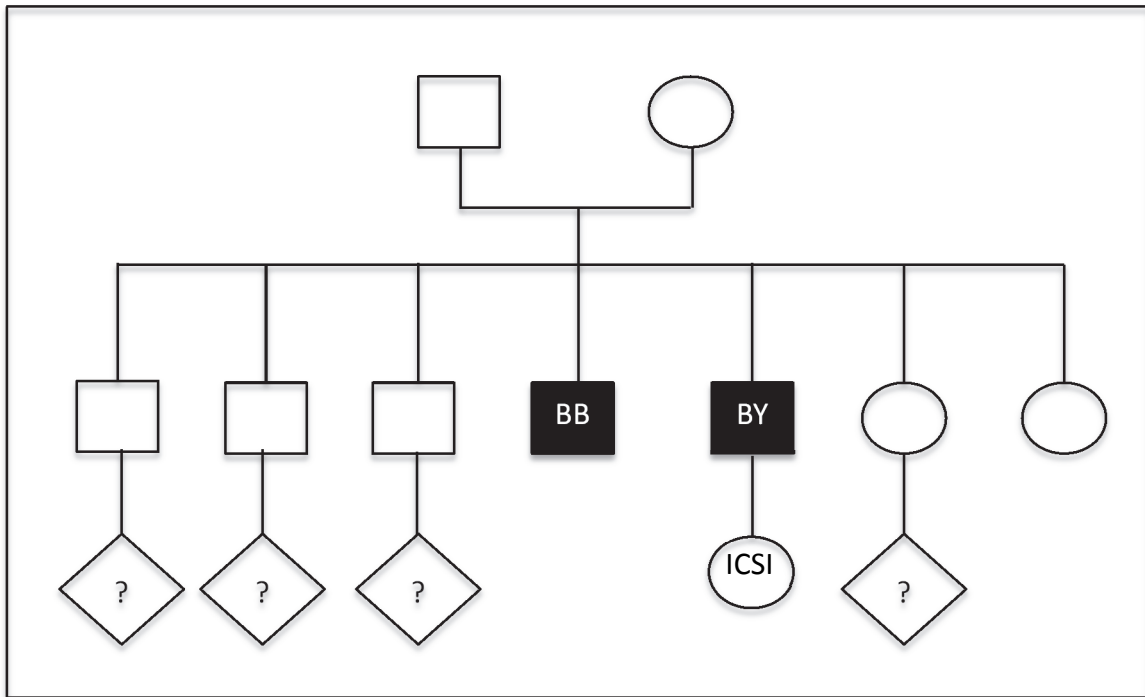


Figure 28: Arbre généalogique des deux premiers patients (BB et BY).

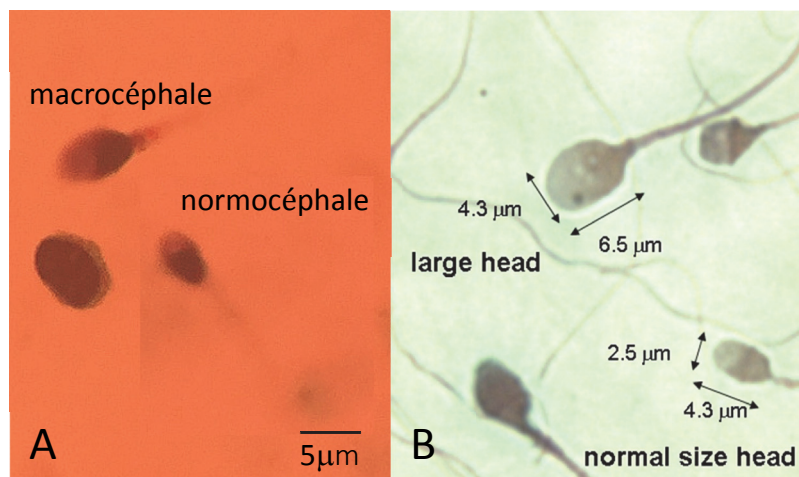


Figure 29: Spermatozoïdes des patients BB (A) et LB (B) après coloration au Papanicolaou.

### Un troisième patient non apparenté

Le troisième patient que nous avons recruté a fait l'objet de la première description de ce phénotype rare de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés par Guthauser en 2011 (Guthauser *et al.*, 2011). Nous avons contacté cette équipe qui avec l'accord du patient a accepté de nous transmettre un échantillon de son ADN. Il s'agit d'un patient de 51 ans en couple avec une femme de 35 ans ayant consulté pour infertilité secondaire du couple de 3 ans. Leur premier enfant est né après deux tentatives par FIV-ICSI. Le patient est d'origine

maghrébine et n'avait aucun antécédent de torsion testiculaire, cryptorchidie, testicule ascenseur, de fièvre récente. Le spermogramme réalisé selon les mêmes normes présentait une numération normale (135 millions de spermatozoïdes/éjaculat). On retrouvait cependant la présence d'asthénospermie (mobilité progressive à 8%) et tératospermie sévères (2% de formes typiques) avec la présence à 47% de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés (figure 29). La recherche de la mutation AURKC est négative et l'analyse par FISH sur sperme (sondes 18, X, Y) révèle un taux d'aneuploïdie à 2,8%. La condensation chromatinienne a été évaluée par coloration au bleu d'aniline. Elle montre une décondensation chromatinienne pour 46% des spermatozoïdes.

Nous n'avons pas obtenu d'informations nous permettant de retracer l'histoire familiale de Mr LB.

	<b>BB</b>	<b>BY</b>	<b>LB</b>	<b>Normes</b>
<b>Antécédents testiculaires</b>	Aucun			
<b>Numération (Millions/éjaculat)</b>	13	5	135	>39
<b>Mobilité (progressifs + non progressifs)</b>	85%	40%	8%	>40%
<b>Formes typiques</b>	0%	0%	2%	>23%
<b>Macrocéphales réguliers monoflagellés</b>	77%	61%	47%	-
<b>Examen au Bleu d'aniline</b>	-	-	46%	<20%
<b>Mutation AURKC</b>	Absente			
<b>Taux d'aneuploïdie par FISH sur sperme</b>	<1%	<1%	2,8%	<1%

Tableau 3 : Principaux paramètres clinico-biologiques des patients recrutés.

### *Echantillons*

L'ensemble des analyses a été réalisé à partir d'échantillons d'ADN extraits de sang EDTA pour les patients LB et BY et à partir d'un prélèvement de salive pour le patient BB. Ces échantillons ont été stockés au centre des ressources biologiques avec le consentement des patients.

### *Séquençage exomique de nouvelle génération sur 2 patients BB et BY*

Il a été réalisé sur Illumina NextSeq 500 par la plateforme Helixio. Il s'agit d'une société privée basée à Clermont-Ferrand qui propose une large gamme de services en génomique dans le domaine de la santé, de la biologie animale ou végétale pour répondre aux besoins des scientifiques. Elle fournit des services pour du séquençage de nouvelle génération (génomome entier Seq, Exome Seq, ADN ciblé Seq, ARN Seq, Methyl Seq...), microarrays (Gene Expression, CGH, CNV, Génotypage...), RT-QPCR, PCR. Nous avons transmis deux échantillons d'ADN des patients BB et BY pour un séquençage exomique. Les résultats bruts nous ont été transmis dans un disque dur externe sous forme de fichiers «.bam ». Nous avons également reçu un rapport sur la qualité du séquençage. Les contrôles qualité par base, par séquence et sur la distribution des nucléotides sont dans les normes. Le pourcentage de nucléotides non déterminés est de 0%. L'ensemble de ces contrôles nous permet d'affirmer que le séquençage est de bonne qualité.

### *Analyse bioinformatique des exomes*

Nous avons réalisé à partir des données brutes du séquençage une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel VarAFT 1.61 avec application des filtres suivants :

- Variant type : exonic, splicing, exonic ;splicing, NonSynonymous, StopLoss, StopGain, Frameshift.
- Frequency : ESP6500 <0,0001 ; 1000G <0,0001 ; ExAC <0,0001
- Prediction : UMD-Predictor : probable pathogenic ; pathogenic  
Mutation Taster : Disease causing ; Disease causing automatic

### *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Nous avons réalisé des PCR en utilisant des enzymes Taq-labo (Taq de fabrication interne au laboratoire) ou Taq-Q5 (Taq-Pol Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase 2U/100µl New England BioLabs) avec les couples d'amorces spécifiques pour chaque transcrits (tableau 1 en annexe). Pour Taq-labo, 100µl de prémix sont préparés avec 10µl de tampon 10x, 3µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µl de dNTP (20mM), 5µl de primers 5µM, 2µl de Taq-Pol-labo (fabriquée au laboratoire 1U/50µl) et de l'eau distillée QSP 100µl. Pour Taq-Q5, 100µl de prémix sont préparés avec 20µl de tampon 5x, 1µl de dNTP (20mM), 5µl de primers (5µM), 0,5 µl de Taq-Q5, si besoin

20µl de GC enhancer et de l'eau distillée QSP 100µl. Les amorces ont été construites à l'aide des logiciels SnapGene et Sequencher 5.0.1 puis commandées chez Eurogentec. Les températures d'alignement de chaque couple d'amorces ont été calculées par le logiciel Tm Calculator (New England Biolabs). 1ng d'ADNc de patients sont ajoutés à 10µl de prémix. Les réactions de PCR sont effectuées sur un thermocycler Eppendorf Mastercycler EP S thermo-module. La migration des PCR sur un gel 2 à 3% d'agarose (fonction de la taille des séquences) en utilisant l'échelle 1kb+ (Invitrogen). Les produits de PCR ont été traités par Exonucléase I 20U/µl M0293S Ozyme et Rapid Alkaline Phosphatase 1U/µl 04899813301 Roche. Cette réaction permet de détruire les amorces et d'inactiver les dNTP. Un mix est préparé avec 3U d'exonucléase et 1U de rapid alcaline phosphatase et de l'eau qsp 2µl. 2µl de ce mix sont ajouté pour 10µl de PCR puis placés 30 minutes à 37°C et 15 minutes à 80°C.

#### *Test du variant c.300G>A de TMEM239 par digestion enzymatique*

Nous avons amplifié TMEM239 chez les 3 patients par PCR en utilisant le couple d'amorces 5047/5048 (tableau 1 en annexe). Les produits amplifiés ont été digérés pendant 2h à 37°C en ajoutant l'enzyme de restriction *NarI* dans son tampon de digestion (Cut smart – New England Biolabs). Les produits ont été migrés sur gel d'agarose 3%.

#### *Séquençage Sanger*

Nous avons confirmé les mutations identifiées au séquençage exomique par méthode Sanger sur séquenceur Applied Biosystems Hitachi 3130x Genetic Analyzer.

- Réaction de séquençage :

Les réactions sont réalisées dans un volume total de 5µl. On mélange 0,5µl de Premix, 0,5µl de Tampon 5X pour big dye, 1µl d'amorce à 2,5µM et 1µl d'ADN produit de PCR (pour 100-200pb 1 à 3ng, pour 200-500pb 3 à 10ng, pour 500-1000pb 3 à 10ng, pour 1000- 2000pb 10 à 20ng, pour plus de 2000pb 20 à 30ng d'ADN). Ajouter de l'eau distillée QSP 5µl.

Programme de PCR : 25 cycles avec 1 min à 94°C puis 30 sec à 94°C puis 30 sec à la température d'annealing puis 4 minutes à 60°C. Terminer le programme par 5 minutes à 16°C.

- Purification de la réaction de séquençage :

En utilisant une plaque de purification Millipore MAHVN45-10 plus une plaque pour collecter l'éluât. Mettre 450 $\mu$ L de G50 Sephadex 5% dans du TE (Sephadex G50 fine 100g 17-0573-02 Amersham biosciences). Centrifuger 5 min à 1000g. Retirer l'éluât de la plaque. Mettre 250 $\mu$ L de G50 Sephadex. Centrifuger 3min à 1000g. Retirer l'éluât de la plaque soigneusement à la pipette. Compléter les 5 $\mu$ L de la réaction de séquençage avec 15 $\mu$ L d'eau. Déposer les 20 $\mu$ L au centre du puits. Centrifuger 5min à 1000g. Collecter l'éluât et le mettre dans un tube. Compléter le volume à 20 $\mu$ L si nécessaire.

### *Transfection en Lab-Tek de cellules HeLa*

Deux inserts de l'exon codant sauvage du gène cible ont été préparés avec un marquage Flag en N et C-terminal ainsi qu'un insert muté produisant la protéine tronquée avec un marquage Flag N-terminal. Ces plasmides ont été préparés à partir de vecteurs pcDNA3.1. Une digestion des sites de restriction *HindIII* et *KpnI* a permis de retirer les inserts initialement présents sur le vecteur. Nous avons ensuite amplifié les inserts d'intérêt en utilisant des amorces introduisant des sites *HindIII* et *KpnI* aux extrémités. Après purification nous avons réalisé une ligation entre le vecteur ouvert et les inserts produits. Après électroporation des vecteurs dans des bactéries compétentes et mise en culture, différents clones bactériens ont été criblés pour en extraire les plasmides d'intérêt. Les séquences des plasmides obtenus ont été vérifiées.

La transfection a été réalisée de la manière suivante : 24h avant de transfecter, mettre dans chaque puit 70 000 cellules avec 1ml de milieu de culture. Le jour de la transfection mettre 75 $\mu$ L de jetPRIME buffer dans un tube de 1,5ml, ajouter 500ng de plasmide, mélanger, ajouter 1,5 $\mu$ L de jetPRIME, mélanger et incuber 10min à température ambiante. Ajouter 1ml de milieu sans antibiotiques, mélanger, remplacer le milieu du puit par ce mix. Après 4h, retirer le milieu, mettre du milieu avec antibiotiques. Le lendemain, retirer le milieu et rincer avec du DPBS. Fixer la lame avec de la PAF 4% pendant 5min puis rincer avec du DPBS. Sécher un peu mais pas complètement et mettre le vectashield plus DAPI. Terminer en ajoutant une lamelle.

### *Immunofluorescence sur cellules HeLa*

Préparer 50 ml de DPBS + 0,5% Triton + inhibiteurs de protéases (Roche) et 50ml de DPBS + 1% BSA fraction V + inhibiteurs de proteases.



- Perméabilisation

Pour une lame 100ul de DPBS 0,5% Triton + inhibiteurs. Pour une chambre d'une lame 4 puits mettre 25ul. Couvrir de parafilm et laisser 10min. Enlever le tampon.

- Saturation des sites non spécifiques :

Mettre 100ul de DPBS 1% BSA + inhibiteurs. Couvrir de parafilm et laisser 30 min.

- Marquage par l'anticorps primaire :

Nous avons utilisé un anticorps anti-Flag Sigma SAB 4301135.

Diluer l'anticorps au 100e dans du DPBS 1% BSA + inhibiteurs. Laisser 3 heures puis rincer 10 min dans du DPBS

- Marquage par l'anticorps secondaire :

Nous avons utilisé un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin Invitrogen Alexa Fluor 488 A11008. Diluer l'anticorps secondaire au 400e dans du DPBS 1% BSA + inhibiteurs. Laisser 1h. Rincer 10 min dans du DPBS. Fixer dans de la PAF 4 % pendant 5 min. Rincer 10 min dans du DPBS. Egoutter brièvement puis mettre 50ul de vectashield 25ng de DAPI. Si la lame a déjà été colorée au DAPI, mettre le vectashield seul.

## B. Résultats

### *Séquençage de nouvelle génération et analyse bio-informatique*

Devant la rareté de ce phénotype de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés et sa présence chez deux frères nous avons voulu explorer l'hypothèse d'une origine génétique de cette anomalie. Le séquençage de nouvelle génération des deux patients apparentés (BB et BY) a été réalisé par la société Helixio. Nous avons ensuite recherché par analyse bioinformatique des variants communs aux deux patients. La recherche de variants communs homozygote n'a révélé aucun variant potentiellement pathogène. L'analyse en duos hétérozygotes révèle la présence de 32947 variants sur 9565 gènes. En ne conservant que les variants retrouvés dans les régions exoniques ou des sites introniques impliqués dans l'épissage il reste 9185 variants sur 4822 gènes. En se focalisant sur les variants issus de substitutions, perte ou gain de codon stop, insertions ou délétion, nous retrouvons 4553 variants sur 2924 gènes. Le phénotype observé est beaucoup plus rare que le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales avec une mutation AURKC dont la fréquence à l'état homozygote est de 1% dans la population d'origine maghrébine (Guichaoua et al. 2009b). Nous avons estimé qu'un filtre de variants dont la fréquence est inférieure à 1/10000 est adapté à notre situation. Ainsi, en ajoutant ce filtre

supplémentaire, nous retrouvons 160 variants sur 114 gènes. En éliminant les variants prédits comme polymorphismes, tolérés ou bénins dans les bases de données les plus connues (UMD predictor et Mutation Taster) nous arrivons à une liste de 56 variants sur 48 gènes. Ces 56 variants ont été étudiés un par un in silico. Nos patients étant phénotypiquement sains, nous avons éliminé les variants impliqués dans des pathologies connues (cardiaque, neuronales, cutanées). Les variants prédits comme affectant l'épissage avec des mutations distantes de plus de 6pb du début ou fin d'exon ou n'impliquant pas de modification de la séquence reconnue par le spliceosome n'ont pas été retenus. Au terme de cette analyse bioinformatique, nous obtenons deux gènes candidats potentiels pour expliquer le phénotype observé : TMEM239 et BRWD1.

#### *TMEM239 – un variant rare tronqué hétérozygote*

TMEM239 (Transmembrane protein 239), est un petit gène situé sur le bras court du chromosome 20 (20p13) qui appartient à la superfamille des protéines transmembranaires. Plusieurs transcrits sont décrits dans les bases de données avec des régions codantes distinctes réparties sur un ou deux exons. Seule la région codante du transcrit ENST00000380585 est conservée chez les autres mammifères et code une protéine de 152 acides aminés. ENST00000380585 est le transcrit majoritairement produit avec un RPKM (reads par kilobase par million de reads lus) médian à 136,5 par rapport au transcrit ENST00000361033 avec un RPKM médian à 0,7 (<http://www.gtexportal.org/home/gene/TMEM239>) (figure 30). C'est le transcrit ENST00000380585 que nous retiendrons pour le reste de cette étude.

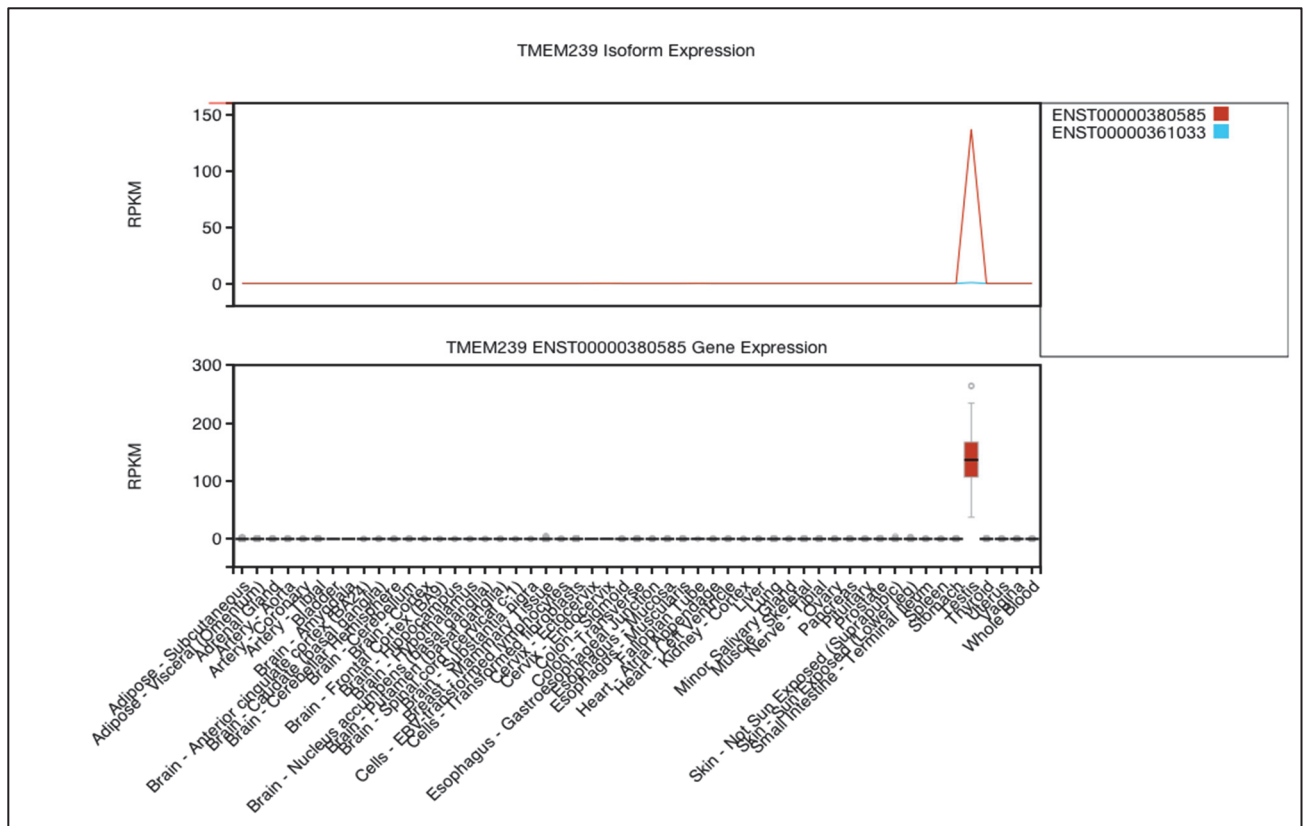


Figure 30 : Profil d'expression de TMEM239 révélant un pic exclusivement testiculaire. Le RPKM médian est de 136,5 pour ENST00000380585 et de 0,7 pour ENST00000300361033 (sur la ligne de base).

Les résultats du séquençage exomique montrent un taux de couverture à 30x de 100% pour TMEM239. Il est retrouvé muté à l'état hétérozygote chez les deux patients apparentés (BB et BY). La mutation touche l'exon 2 (exon codant) en position c.300G>A (p.W100X) et provoque l'apparition d'un codon STOP. La protéine se retrouve tronquée de 52 acides aminés dans sa partie C-terminale. L'étude structurale de TMEM239 montre quatre éléments : un domaine riche en tryptophane (position 24-54), un domaine riche en leucine (position 58-138) et deux domaines transmembranaires (en position 62-82 et 102-128) (figure 31). La protéine tronquée à partir du 100<sup>e</sup> acide aminé est privée d'un domaine transmembranaire ainsi que de 47,5% du domaine riche en leucine (perte de 18 Leucines sur les 32 du domaine).

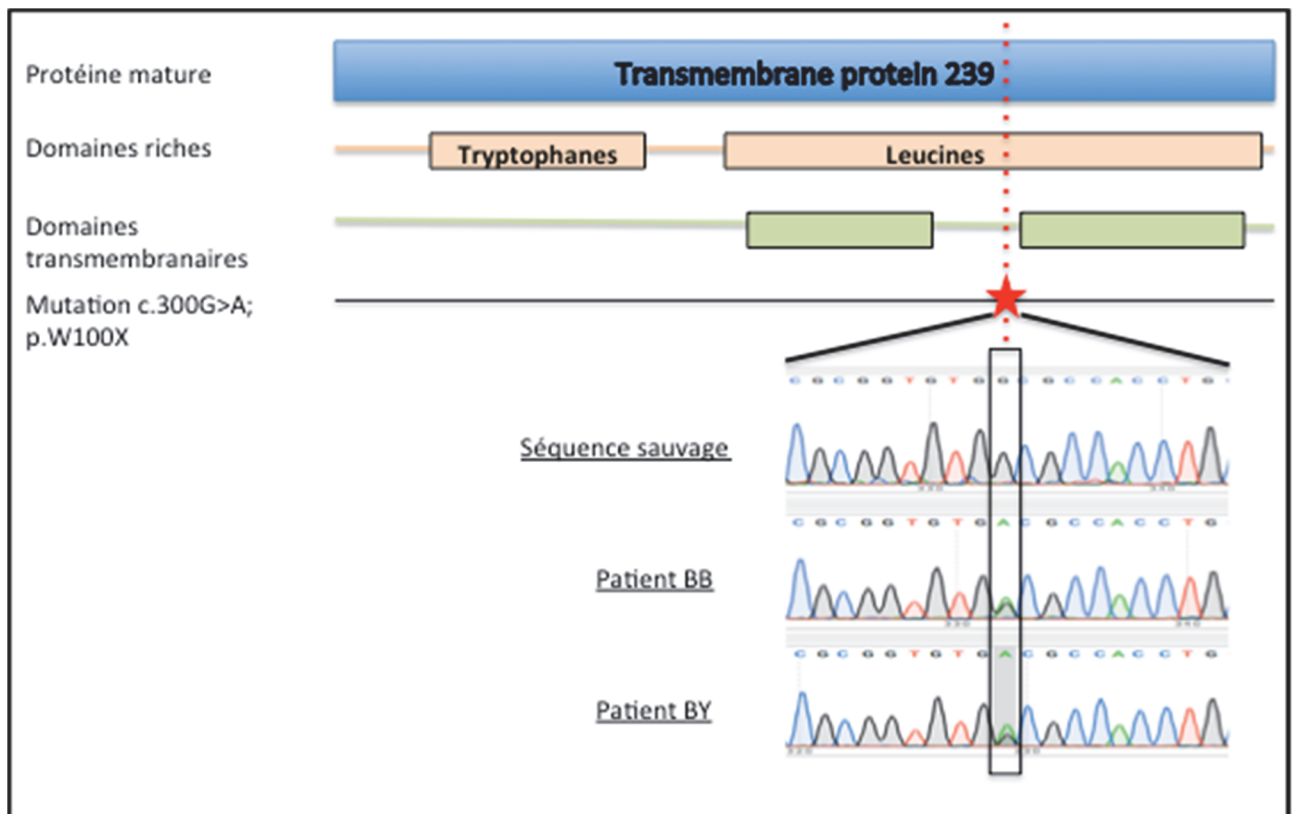


Figure 31: Représentation de la protéine TMEM239 (152aa). On retrouve deux régions riches en tryptophane (position 24-54) et Leucine (position 58-138) ainsi que deux domaines transmembranaire (position 62-82 et 102-128). La mutation c.300G>A est confirmée par séquençage Sanger chez les patients BB et BY. Le patient LB n'a pas cette mutation.

L'ensemble de ces éléments nous a donc motivés pour explorer plus en détail cette protéine qui n'a jamais été étudiée jusqu'à présent.

La particularité de TMEM239 qui en fait de c.300g>A un bon candidat pour la mutation causale de la tératospermie retrouvé chez les deux frères BB et BY est qu'il possède une expression exclusivement testiculaire (figure 30). En effet, le fait que seuls les spermatozoïdes des patients soient atteints nous oriente vers une mutation touchant spécifiquement une protéine de la spermatogenèse et donc ne s'exprimant qu'au niveau testiculaire. Les études de conservation entre les différentes espèces apportent aussi un argument supplémentaire en faveur de TMEM239. En effet, elles montrent que TMEM239 possède une forte homologie de séquence entre les différentes espèces avec une conservation de 86% entre l'homme et la souris. Sur les 242 variants décrits dans les bases de données ExAC pour le transcrite ENST00000380585, il n'existe aucune variation introduisant un codon STOP ou perte de fonction (LoF Loss of Function) de la protéine. Cette donnée est aussi un argument en faveur de l'intolérance de TMEM239 à une mutation perte de fonction.

Pour confirmer cette mutation nous avons eu recours dans un premier temps à une digestion enzymatique par l'endonucléase de restriction *NarI*. En effet, la mutation c.300G>A détruit un site de *NarI* (5'GGCGCC qui devient 5'GACGCC). La digestion incomplète des produits de PCR de l'exon 2 issus de l'ADN des patients BB et BY (figure 32) montre que la mutation est bien présente à l'état hétérozygote et que seul le brin non muté est digéré. En revanche, la digestion totale du produit de PCR provenant de l'ADN du patient non apparenté (LB) montre que celui-ci n'est pas porteur de cette mutation. Nous avons procédé dans un second temps au séquençage par méthode Sanger des produits de PCR de l'exon 2 obtenus à partir d'amorces spécifiques (figure 31). Elle confirme à nouveau la présence de la mutation à l'état hétérozygote chez BB et BY mais pas chez LB.

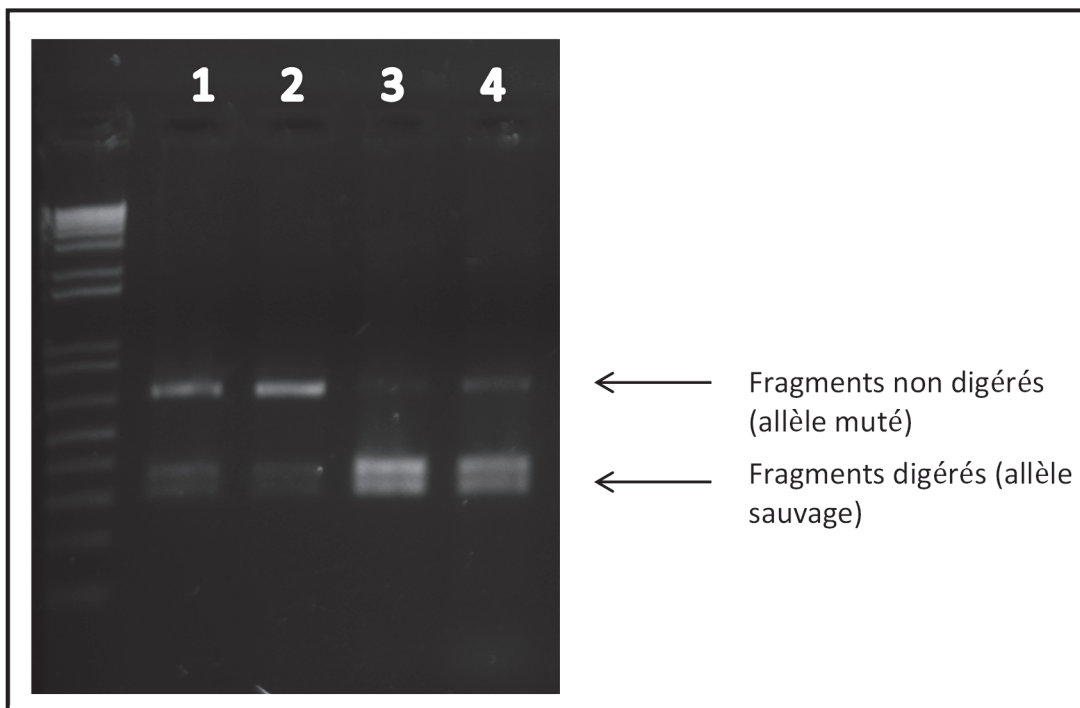


Figure 32 : Migration sur gel 3% d'agarose des produits de PCR de TMEM239 après digestion par *NarI* (5'GGCGCC). Les puits 1 (BB) et 2 (BY) montrent une digestion incomplète du produit de PCR. Les puits 3 (LB) et 4 (ADN témoin) montrent une digestion complète.

Afin de savoir si la mutation modifie la localisation subcellulaire nous avons réalisé la transfection d'une lignée cellulaire HeLa par des plasmides contenant des inserts avec la séquence sauvage et la séquence mutée de TMEM239.

Les cellules transfectées par la séquence sauvage révèlent une localisation cytoplasmique de la protéine TMEM239 avec une plus forte concentration périnucléaire (figure 33). Les cellules transfectées par la séquence mutée ne présentent pas d'anomalie morphologique. La

localisation de la protéine tronquée ne semble pas différer de la protéine sauvage. En effet, on observe le même signal cytoplasmique périnucléaire qu'avec la séquence sauvage.

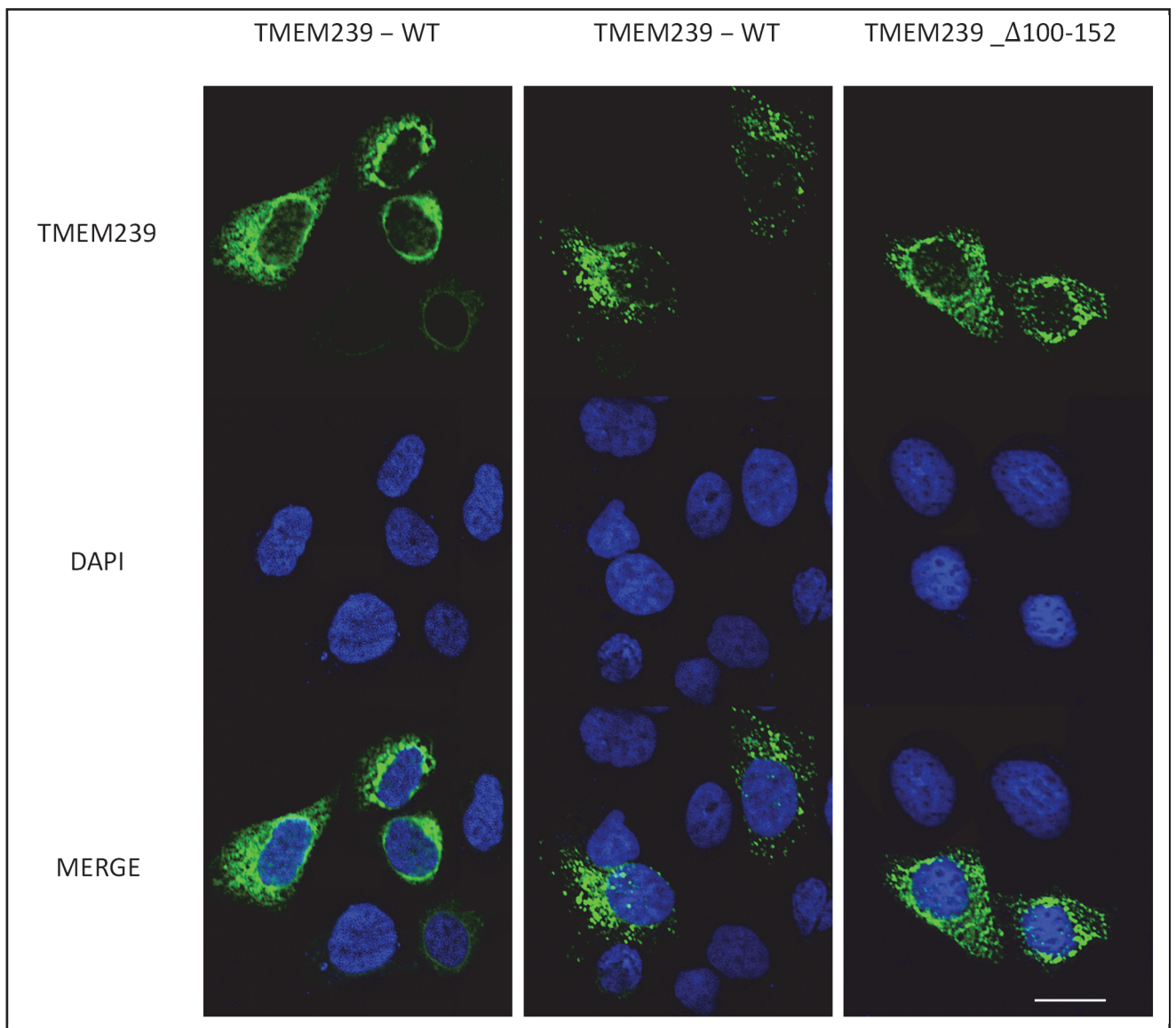


Figure 33 : Localisation de TMEM239 fusionné à un tag Flag par immunofluorescence sur cellules HeLa après transfection. De gauche a droite : protéine sauvage marquée Flag C-terminal, protéine sauvage marquée Flag N-terminal, protéine tronquée de 52 acides aminés marquée Flag N-terminal (barre=10um).



BRWD1 possède 8 motifs répétés Tryptophane-Asparagine (WD1 à WD8 respectivement en position 184 à 223, 226 à 265, 268 à 311, 322 à 365, 366 à 405, 424 à 463, 466 à 506 et 514 à 553) et 2 bromodomaines (BRD1 position 1177 à 1247 et 1330 à 1400) (figure 35). Deux paralogues de BRWD1 sont décrits dans la littérature chez la souris: PHIP et BRWD3 (Philipps et al. 2008). Aucune variation n'a été retrouvée dans PHIP et BRWD3 chez les patients BB et BY.

#### *BRWD1 – un deuxième variant rare associé aux spermatozoïdes macrocéphales*

Pour déterminer si une mutation dans TMEM239 ou BRWD1 chez LB pourrait expliquer le phénotype spermatique similaire à celui des deux frères, nous avons entrepris le séquençage de ces deux gènes chez LB. Pour TMEM239 nous avons pu séquencer tous les exons du gène, mais aucun variant rare n'a été identifié (figure 31). Pour BRWD1 nous avons pu séquencer avec succès 38 de ses 42 exons codants (exons 5 à 42). L'analyse des séquences de BRWD1 a révélé la présence d'une duplication hétérozygote de 3 bases (GAA) sur l'exon 13 c.1235dupGAA prédit d'insérer un arginine entre les acides aminés 412 et 413 de la protéine BRWD1 (p.R412\_I413insR). Elle se situe dans la protéine dans l'espace situé entre les motifs répétés WD5 et WD6 (figure 33). Cette duplication n'est pas décrite dans les bases de données et aucune insertion/délétion n'est répertoriée dans la région contenant les répétitions WD (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000185658>). De plus, il existe une conservation parfaite de l'espacement des répétitions WD dans BRWD1 à travers l'évolution et ce jusqu'aux reptiles. La duplication retrouvée n'a pas d'impact sur l'épissage de l'exon et ne crée pas de décalage dans le cadre de lecture du transcrit. Cependant, il faut noter que pour tout le gène BRWD1, une seule insertion (duplication) est décrite dans les bases de données ExAC. De plus, elle se situe en dehors des domaines WD de la protéine (en C-terminal des bromodomaines) avec une fréquence de  $8,3 \cdot 10^{-6}$ .

La découverte de deux variants rares sur BRWD1 chez des patients présentant le même phénotype de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés suggère son implication dans l'anomalie morphologique observée.



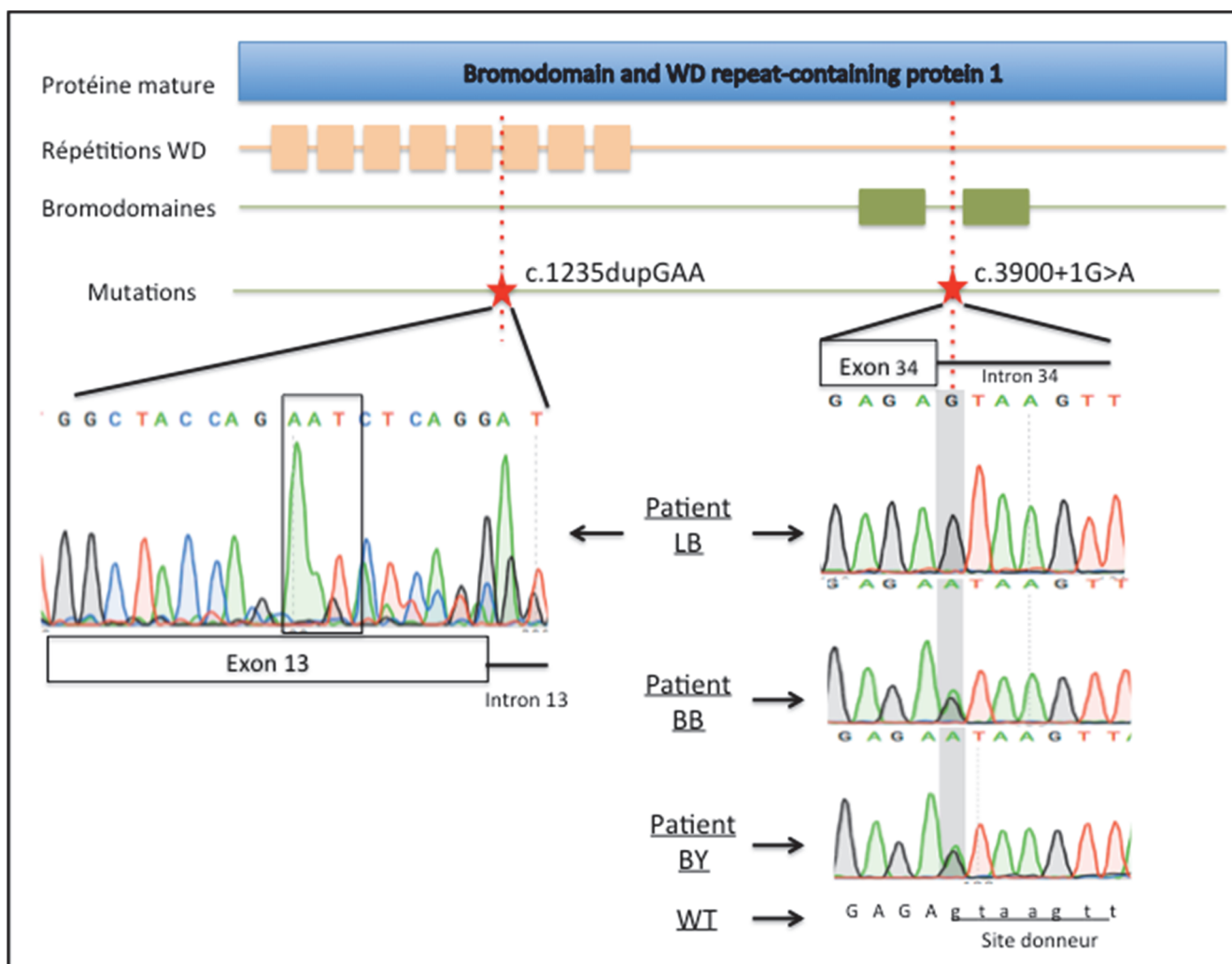


Figure 35 : Représentation schématique de BRWD1. On retrouve une région contenant 8 motifs WD (Tryptophane-Asparagine) entre les positions 184 et 553 ainsi que deux bromodomaines (BRD) entre les positions 1177 et 1400. Deux mutations sont retrouvées et confirmées par séquençage Sanger : c.1235dupGAA dans l'exon 13 chez LB et c.3900+1G>A dans l'exon 34 chez BB et BY.

## C. Discussion

Cette étude est la première à rechercher une cause génétique dans le phénotype rare des spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés. Elle est aussi la première à inclure et explorer par séquençage de nouvelle génération deux frères atteints présentant ce même phénotype. Deux candidats potentiellement impliqués dans cette anomalie morphologique ont été explorés. BRWD1 est particulièrement intéressant du fait de la présence d'un variant rare et probablement pathogène à l'état hétérozygote chez les deux frères ainsi que chez le 3<sup>e</sup> patient non apparenté.

### *TMEM239*

Une mutation non-sens hétérozygote c.300G>A (p.W100X) sur *TMEM239* chez les deux frères BB et BY a été identifiée et confirmée. Il s'agit de la première mutation perte de fonction décrite pour *TMEM239*. La protéine tronquée de 52 acides aminés en C-terminal perd un des deux domaines transmembranaires ainsi que la moitié de la région riche en Leucine. La présence de domaines transmembranaires n'est probablement pas fortuite et la perte d'une aussi grande partie de la protéine doit provoquer une altération de sa fonction. Cette fonction est pour le moment inconnue. Cependant, le fait que cette protéine soit très conservée dans l'évolution et qu'elle ne tolère pas de mutation perte de fonction, suggère fortement un rôle important de *TMEM239* dans la reproduction et donc dans le phénotype observé. L'expression exclusivement testiculaire de *TMEM239* est un argument fort et doit nous faire envisager l'utilisation d'un autre modèle cellulaire. Nous n'observons pas de différence dans la localisation entre la protéine sauvage et mutée. Néanmoins, on ne peut pas conclure à l'heure actuelle que l'haplo-insuffisance de *TMEM239* ne contribue pas au phénotype observé. Une localisation autre que celle observée lors de la transfection des vecteurs plasmidiques doit être envisagée. Nous pouvons imaginer que les partenaires de *TMEM239* ne sont également exprimés qu'au niveau testiculaire et que leur absence dans le type cellulaire utilisé ne nous permet pas d'observer le véritable effet attendu de la protéine tronquée sur la morphologie cellulaire.

## *BRWD1*

Deux variants rares hétérozygotes non décrits dans les bases de données ExAC ont été identifiés et confirmés chez nos 3 patients. Le variant retrouvé chez les deux frères BB et BY implique l'exon 34 de BRWD1. Il introduit une mutation c.3900+1G>A qui provoque l'altération du site d'épissage. Cette mutation survient dans une région très conservée se trouvant entre les bromodomaines de la protéine. Ces bromodomaines sont des motifs impliqués dans des mécanismes épigénétiques en interagissant avec la chromatine via la reconnaissance de motifs lysine N-acétylés sur les histones (Filippakopoulos et Knapp 2012). L'organisation du bromodomaine dans les protéines est hautement conservée au cours de l'évolution et le motif BRD est le plus souvent associé dans sa partie N-terminale à d'autres domaines de régulation épigénétique (Goodwin et Nicolas 2001). Dans le cas de BRWD1 il s'agit d'une région contenant 8 répétitions de motifs Tryptophane-Asparagine. La deuxième mutation identifiée sur BRWD1 chez le patient LB intervient dans cette région dans l'espace entre WD5 et WD6. Il s'agit d'une duplication hétérozygote de 3 bases (GAA) sur l'exon 13 c.1235dupGAA prédit d'insérer un arginine entre les acides aminés 412 et 413 de la protéine BRWD1 (p.R412\_I413insR). Aucune insertion/délétion n'est décrite dans cette région où l'espacement des répétitions WD est extrêmement conservé à travers l'évolution. Les protéines contenant des motifs répétés WD sont décrites comme jouant un rôle dans une grande variété de fonctions cellulaires telles que la régulation de la transcription, la transduction de signaux, l'épissage de l'ARNm, l'assemblage du cytosquelette et la régulation du cycle cellulaire (Smith et al. 1999; Li et Roberts 2001). L'association des deux domaines (BRD et WD) permet à BRWD1 de jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine (Huang et al. 2003).

Une étude récente a démontré que BRWD1 joue un rôle majeur dans la fertilité chez la souris. Il est décrit comme indispensable lors de la spermiogénèse et nécessaire à la maturation ovocytaire lors de l'initiation du développement embryonnaire (Philipps et al. 2008). Une mutation sur BRWD1 entraîne des anomalies en prophase de la méiose I, étape critique dans laquelle on retrouve le plus d'anomalies génétiques conduisant à une infertilité dans les deux sexes (Matzuk et Lamb 2002). Les mâles porteurs de la mutation à l'état homozygote sont phénotypiquement normaux mais infertiles. Ils présentent une oligoasthénospermie avec de nombreuses anomalies morphologiques touchant principalement la tête des spermatozoïdes (Philipps et al. 2008). Il s'agit d'une substitution (T en C) altérant l'épissage en 5' du site donneur de l'exon 10. La délétion de l'exon 10 lors de l'épissage de l'ARNm provoque l'apparition prématurée d'un codon STOP responsable de la dégradation par les mécanismes

de contrôle cellulaires de l'ARNm non-sens produit. Si les variants, c.1235dupGAA et c.3900+1G>A, à l'état hétérozygote sont responsables du phénotype des spermatozoïdes macrocéphales chez ces hommes infertiles, il faut pouvoir expliquer pourquoi les souris hétérozygotes pour une mutation dans le gène BRWD1 conservent une fertilité comparable aux souris non mutées. Cette différence entre homme et souris pourrait être expliquée par le fait que les mutations décrites chez la souris empêchent la production de BRWD1 alors que chez l'homme les mutations peuvent engendrer la production d'une protéine anormale : duplication d'une arginine dans la région contenant les répétitions WD, perte de 14 acides aminés due à l'exclusion de l'exon 34 dans le transcrit variant. Une autre possibilité concerne l'existence de paralogues à BRWD1 : PHIP et BRWD3. De même que BRWD1, ces deux gènes sont largement exprimés dans de nombreux tissus, ce qui est cohérent avec l'idée que l'un ou les deux fournissent une fonction redondante. Le fait que nos patients soient porteurs de mutations sur BRWD1 à l'état hétérozygote laisse présager que celle-ci n'est pas compensée au niveau testiculaire par des fonctions redondantes. L'existence d'une mutation altérant l'épissage de l'exon 34 (c.3900+1G>A) peut entraîner l'utilisation d'un site cryptique dans l'intron 34 et provoquer, comme dans le cas de la souris, l'apparition d'un codon STOP entraînant la dégradation de l'ARNm produit. Une autre conséquence possible de cette mutation est le saut de l'exon 34 qui respecterait le cadre de lecture et engendrerait la production d'une protéine délétée de 14 acides aminés. Ainsi, un autre argument concernant la position des mutations retrouvées sur BRWD1 doit être évoqué. On peut suggérer que l'impact des mutations rares non décrites sur la conformation tridimensionnelle de la protéine altère des sites actifs. En effet, la mutation de l'exon 13 (c.1235dupGAA) intervient dans l'espace entre WD5 et WD6. Ce motif très conservé ne tolère aucune insertion ou délétion de base comme en attestent les bases de données (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000185658>). La mutation de l'exon 34 (c.3900+1G>A) intervient quant à elle dans l'espace compris entre les deux bromodomains. De nombreux variants portant des mutations silencieuses ou faux-sens sont décrits mais aucun n'entraîne de perte de fonction de la protéine. Ainsi, on peut évoquer la possibilité que ces deux mutations engendrent un gain de fonction avec un effet dominant négatif.

Enfin, une dernière hypothèse pourrait suggérer que l'existence d'une mutation sur BRWD1 associée à une mutation sur un deuxième gène comme TMEM239 dans le cas des patients BB et BY, pourrait entraîner l'apparition du phénotype de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés. Cette hypothèse suggère qu'une autre mutation non identifiée chez le patient LB (non muté sur TMEM239) reste à identifier.

## D. Perspectives

Toutes ces données nous offrent des perspectives prometteuses pour la compréhension des mécanismes à l'origine de phénotypes macrocéphales réguliers monoflagellés des spermatozoïdes. Nous envisageons pour la suite de nos travaux de séquencer plus largement les régions non codantes de BRWD1. En effet, l'exploration des régions 5'-UTR et 3'-UTR pourrait révéler des mutations non identifiées lors de cette étude. L'effet de la mutation d'épissage de l'exon 34 (c.3900+1G>A) doit être exploré soit par la construction d'un plasmide encadrant la mutation et transfecté dans des cellules HeLa, soit par l'étude des transcrits produits *in vivo* à partir des spermatozoïdes conservés de l'un des deux frères. Il serait également intéressant de pouvoir se procurer des échantillons d'ADN provenant de patients présentant le même phénotype observé afin de confirmer la présence des mutations sur TMEM239 et/ou BRWD1.

Nous envisageons dans un futur proche de nous procurer l'ADN provenant des parents de BB et BY afin de vérifier la présence des mutations identifiées. Une publication récente par une équipe italienne décrit ce phénotype de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés ne portant pas de mutation AURKC (Molinari et al. 2013b). Il nous paraît important devant la rareté de ce phénotype de collaborer avec cette équipe pour pouvoir déterminer des variants dans TMEM239 et BRWD1 chez ce patient.

## Conclusion :

Les tératospermies monomorphes sont une cause évidente d'infertilité masculine. Une origine génétique doit être suspectée devant le caractère monomorphe de la tératospermie. Depuis 2007 et la découverte du premier gène impliqué dans l'infertilité masculine (AURKC), les avancées de la recherche ont permis d'identifier d'autres gènes responsables de tératospermies monomorphes permettant ainsi une meilleure compréhension des risques liés à l'utilisation de ces gamètes et de la transmission de gènes défectueux à la descendance. Pour le moment, le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales polyflagelles est la seule anomalie du sperme contre-indiquant son utilisation en AMP. Son identification lors du spermocytogramme permet d'épargner à de nombreux couples infertiles des dépenses inutiles et la succession d'échecs en cas de recours à l'assistance médicale à la procréation. La mutation c.del144C du gène AURKC à l'origine d'un arrêt de la méiose I est la seule anomalie génétique connue à ce jour dans le SSM et permet, lorsqu'elle est identifiée par biologie moléculaire, d'apporter un diagnostic aux patients concernés. Devant des profils rares et particuliers de spermatozoïdes pouvant être morphologiquement proches de ce syndrome, une attention particulière doit être portée avant l'utilisation de ces gamètes par différentes techniques d'AMP notamment par l'exploration quantitative du contenu chromosomique des spermatozoïdes. Nous avons montré dans notre étude rétrospective sur près de 10 ans que des patients porteurs de spermatozoïdes macrocéphales pouvaient, lorsque cela était possible, avoir recours à des techniques d'AMP intraconjugales avec l'obtention de grossesses et de naissances vivantes. Cette possibilité est uniquement envisageable lorsque les spermatozoïdes sont monoflagellés et nécessite de confirmer l'absence d'aneuploïdie des spermatozoïdes par la réalisation d'une FISH sur sperme.

Avec la diminution des coûts liés à l'utilisation des techniques de séquençage haut débit, l'exploration de certains profils rares de tératospermies monomorphes devient de plus en plus envisageable. Nous avons ainsi pu réaliser un séquençage exomique complet à partir de l'ADN de 3 patients (dont 2 frères) présentant une forme rare de spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés. Deux gènes candidats, BRWD1 et TMEM239, pouvant être à l'origine de cette anomalie ont été identifiés. La mutation non-sens sur TMEM239 est à l'origine d'une perte de fonction de la protéine. Des explorations complémentaires ont été entreprises sans pouvoir apporter d'arguments en faveur de son implication dans le phénotype observé. Concernant BRWD1, les explorations ont permis d'émettre des hypothèses sur l'impact des

variants identifiés sur le phénotype de spermatozoïdes observé. En effet, ce gène dont le KO chez la souris mâle est responsable d'infertilité et notamment de tératospermie, est retrouvé muté au niveau de deux régions fonctionnelles distinctes (l'une chez LB et l'autre chez BB et BY). Des prélèvements de salive des parents des deux frères BB et BY ont été récupérés et de l'ADN a pu être extrait chez le père. Le séquençage de BRWD1 à partir de son ADN a permis de montrer qu'il était à l'origine de la transmission de la mutation d'épissage identifiée dans notre étude. Nous en avons déduit que l'allèle porteur du variant 5'-UTR était d'origine maternelle. Une étude complémentaire du variant rare 5'-UTR a été réalisée plus tard par deux transfections sur cellules HeLa de deux constructions vectorielles contenant le 5'-UTR d'origine paternelle pour l'une et le 5'-UTR d'origine maternelle pour l'autre avec chacun un promoteur viral CMV. L'étude par cytométrie en flux des niveaux d'expression de BRWD1 n'a montré aucune différence entre l'allèle paternel et l'allèle maternel. Le séquençage du promoteur de BRWD1 a par la suite permis de retrouver 3 variants sur l'allèle maternel dont 1 rare. Une nouvelle construction vectorielle incluant le variant rare identifiée sur le promoteur est en cours de transfection sur des cellules érythrolymphoblastiques (seule lignée cellulaire disponible pour les expérimentations exprimant BRWD1). Nous en attendons les résultats afin de vérifier si l'anomalie morphologique rare des spermatozoïdes macrocéphales réguliers monoflagellés est due à une hétérozygotie composite avec une mutation héritée du père et une autre héritée de la mère.

Cette étude permet de montrer à la fois la puissance et les limites du séquençage exomique haut débit. En effet, il est fort probable que l'anomalie morphologique des spermatozoïdes observés chez les 2 frères soit d'origine génétique. Cependant l'identification du gène impliqué nécessite le traitement de données de séquençage d'un très grand volume requérant l'utilisation de plateformes bio-informatiques. De nombreuses mutations exclues par les filtres bio-informatiques sur des bases probabilistes pourraient être à l'origine de cette anomalie des spermatozoïdes et ainsi échapper à notre analyse. Ces résultats sont donc émis soumis sous réserve de l'efficacité des systèmes de traitement de l'information dont nous disposons au moment de nos analyses. Le développement de ces outils bio-informatiques doit donc permettre une lecture plus efficace des résultats obtenus par séquençage. Cette étude permet également de montrer la difficulté d'interprétation des résultats d'expression de protéines retrouvées exclusivement au niveau testiculaire avec les lignées cellulaires dont nous disposons actuellement.

## Bibliographie :

- Achard, Vincent, Odile Paulmyer-Lacroix, Georges Mercier, Geraldine Porcu, Jacqueline Saias-Magnan, Catherine Metzler-Guillemain, et Marie Roberte Guichaoua. 2007. « Reproductive Failure in Patients with Various Percentages of Macronuclear Spermatozoa: High Level of Aneuploid and Polyploid Spermatozoa ». *Journal of Andrology* 28 (4): 600-606. doi:10.2164/jandrol.106.001933.
- Alvarez Sedó, Cristian, Vanesa Y. Rawe, et Héctor E. Chemes. 2012. « Acrosomal Biogenesis in Human Globozoospermia: Immunocytochemical, Ultrastructural and Proteomic Studies ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (7): 1912-21. doi:10.1093/humrep/des126.
- Auger, J., F. Eustache, et G. David. 2000. « Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée ». *Andrologie* 10 (4): 358-73. doi:10.1007/BF03034491.
- Auger, J., P. Jouannet, et F. Eustache. 2016. « Another Look at Human Sperm Morphology ». *Human Reproduction* 31 (1): 10-23. doi:10.1093/humrep/dev251.
- Auger, J., M. Mesbah, C. Huber, et J. P. Dadoune. 1990. « Aniline Blue Staining as a Marker of Sperm Chromatin Defects Associated with Different Semen Characteristics Discriminates between Proven Fertile and Suspected Infertile Men ». *International Journal of Andrology* 13 (6): 452-62.
- Ben Khelifa, Mariem, Charles Coutton, Raoudha Zouari, Thomas Karaouzène, John Rendu, Marie Bidart, Sandra Yassine, et al. 2014. « Mutations in DNAH1, Which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella ». *American Journal of Human Genetics* 94 (1): 95-104. doi:10.1016/j.ajhg.2013.11.017.
- Benzacken, B. 2001. « Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: Case report ». *Human Reproduction* 16 (12): 2646-51. doi:10.1093/humrep/16.12.2646.
- Bernard, M., P. Sanseau, C. Henry, A. Couturier, et C. Prigent. 1998. « Cloning of STK13, a Third Human Protein Kinase Related to Drosophila Aurora and Budding Yeast Ipl1 That Maps on Chromosome 19q13.3?ter ». *Genomics* 53 (3): 406-9. doi:10.1006/geno.1998.5522.
- Boitrelle, F., G. Robin, C. Lefebvre, M. Bailly, J. Selva, R. Courcol, J. Lornage, et M. Albert. 2012. « Les bactériospermies en AMP : comment réaliser et interpréter une spermoculture ? Qui traiter ? Pourquoi ? Comment ? ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 40 (4): 226-34. doi:10.1016/j.gyobfe.2012.01.003.
- Boivin, J., L. Bunting, J. A. Collins, et K. G. Nygren. 2007. « International Estimates of Infertility Prevalence and Treatment-Seeking: Potential Need and Demand for Infertility Medical Care ». *Human Reproduction* 22 (6): 1506-12. doi:10.1093/humrep/dem046.
- Bolton, Margaret A., Weijie Lan, Shannon E. Powers, Mark L. McClelland, Jian Kuang, et P. Todd Stukenberg. 2002. « Aurora B Kinase Exists in a Complex with Survivin and INCENP and Its Kinase Activity Is Stimulated by Survivin Binding and Phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (9): 3064-77. doi:10.1091/mbc.E02-02-0092.
- Bujan, Louis, et Jacques Auger. 2012. « Évolution temporelle et géographique des caractéristiques du sperme en France et dans le monde. Quo vadis ? ». *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*.
- Chelli, Mohamed Hassen, Martine Albert, Pierre F. Ray, Bruno Guthauser, Vincent Izard, Ibrahim Hammoud, Jacqueline Selva, et François Vialard. 2010. « Can Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection Be Used to Select Normal-Sized Sperm Heads in Infertile Patients with Macrocephalic Sperm Head Syndrome? ». *Fertility and Sterility* 93 (4): 1347.e1-5. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.059.



- Czyba, Jean-Claude, et Andrea Montella. 1993. *Biologie de la reproduction humaine*. France: Sauramps médical.
- Dam, A. H. D. M., I. Feenstra, J. R. Westphal, L. Ramos, R. J. T. van Golde, et J. a. M. Kremer. 2007. « Globozoospermia Revisited ». *Human Reproduction Update* 13 (1): 63-75. doi:10.1093/humupd/dml047.
- David, G., F. Czyglik, P. Jouannet, et et al. 1975. « Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1) Propositions pour un système de classification. », 17-36.
- Devillard, F., C. Metzler-Guillemain, R. Pelletier, C. DeRobertis, U. Bergues, S. Hennebicq, M. Guichaoua, B. Sèle, et S. Rousseaux. 2002. « Polyploidy in Large-Headed Sperm: FISH Study of Three Cases ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 17 (5): 1292-98.
- Dieterich, Klaus, Ricardo Soto Rifo, Anne Karen Faure, Sylviane Hennebicq, Baha Ben Amar, Mohamed Zahi, Julia Perrin, et al. 2007. « Homozygous Mutation of AURKC Yields Large-Headed Polyploid Spermatozoa and Causes Male Infertility ». *Nature Genetics* 39 (5): 661-65. doi:10.1038/ng2027.
- Dieterich, Klaus, Raoudha Zouari, Radu Harbuz, François Vialard, Delphine Martinez, Hanane Bellayou, Nadia Prisant, et al. 2009. « The Aurora Kinase C c.144delC Mutation Causes Meiosis I Arrest in Men and Is Frequent in the North African Population ». *Human Molecular Genetics* 18 (7): 1301-9. doi:10.1093/hmg/ddp029.
- Dirican, Enver K., Ahmet Isik, Kubilay Vicdan, Eran Sozen, et Zekiye Suludere. 2008. « Clinical Pregnancies and Livebirths Achieved by Intracytoplasmic Injection of Round Headed Acrosomeless Spermatozoa with and without Oocyte Activation in Familial Globozoospermia: Case Report ». *Asian Journal of Andrology* 10 (2): 332-36. doi:10.1111/j.1745-7262.2008.00248.x.
- Dunson, David B., Donna D. Baird, et Bernardo Colombo. 2004. « Increased Infertility with Age in Men and Women ». *Obstetrics and Gynecology* 103 (1): 51-56. doi:10.1097/01.AOG.0000100153.24061.45.
- El Kerch, F., A. Lamzouri, F.Z. Laarabi, M. Zahi, B. Ben Amar, et A. Sefiani. 2011. « Confirmation de la forte prévalence au Maroc de la mutation homozygote c.144delC du gène aurora kinase C (AURKC) dans les térazoospermies avec spermatozoïdes macrocéphales ». *Journal de Gyn?cologie Obst?trique et Biologie de la Reproduction* 40 (4): 329-33. doi:10.1016/j.jgyn.2010.09.003.
- Elkhatib, Razan A., Marine Paci, Guy Longepied, Jacqueline Saias-Magnan, Blandine Courbière, Marie-Roberte Guichaoua, Nicolas Lévy, Catherine Metzler-Guillemain, et Michael J. Mitchell. 2017. « Homozygous Deletion of SUN5 in Three Men with Decapitated Spermatozoa ». *Human Molecular Genetics* 26 (16): 3167-71. doi:10.1093/hmg/ddx200.
- Eloulid, Abdelmajid, Hassan Rouba, Houria Rhaissi, Abdelhamid Barakat, Noureddine Louanjli, Anu Bashamboo, et Ken McElreavey. 2014. « Prevalence of the Aurora Kinase C c.144delC Mutation in Infertile Moroccan Men ». *Fertility and Sterility* 101 (4): 1086-90. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.040.
- Escalier, D. 1983. « Human Spermatozoa with Large Heads and Multiple Flagella: A Quantitative Ultrastructural Study of 6 Cases ». *Biology of the Cell* 48 (1): 65-74.
- . 1999. « Mammalian Spermatogenesis Investigated by Genetic Engineering ». *Histology and Histopathology* 14 (3): 945-58.
- Escalier, Denise, Diego Bermúdez, Jean-Marc Gallo, Annick Viellefond, et Joseph Schrével. 1992. « Cytoplasmic Events in Human Meiotic Arrest as Revealed by Immunolabelling of Spermatozoa Proacrosin ». *Differentiation* 51 (3): 233-43. doi:10.1111/j.1432-0436.1992.tb00701.x.
- Filippakopoulos, Panagis, et Stefan Knapp. 2012. « The Bromodomain Interaction Module ».

- FEBS Letters* 586 (17): 2692-2704. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.045.
- Flörke-Gerloff, S., E. Töpfer-Petersen, W. Müller-Esterl, A. Mansouri, R. Schatz, C. Schirren, W. Schill, et W. Engel. 1984. « Biochemical and Genetic Investigation of Round-Headed Spermatozoa in Infertile Men Including Two Brothers and Their Father ». *Andrologia* 16 (3): 187-202.
- Gardner, D. K., et W. B. Schoolcraft. 1999. « Culture and Transfer of Human Blastocysts ». *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 11 (3): 307-11.
- Giet, R., et C. Prigent. 2001. « The Non-Catalytic Domain of the Xenopus Laevis auroraA Kinase Localises the Protein to the Centrosome ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 11): 2095-2104.
- Glover, D. M., M. H. Leibowitz, D. A. McLean, et H. Parry. 1995. « Mutations in Aurora Prevent Centrosome Separation Leading to the Formation of Monopolar Spindles ». *Cell* 81 (1): 95-105.
- Gnoth, C. 2005. « Definition and Prevalence of Subfertility and Infertility ». *Human Reproduction* 20 (5): 1144-47. doi:10.1093/humrep/deh870.
- Goodwin, G. H., et R. H. Nicolas. 2001. « The BAH Domain, Polybromo and the RSC Chromatin Remodelling Complex ». *Gene* 268 (1-2): 1-7.
- Guichaoua, M.-R., G. Mercier, C. Geoffroy-Siraudin, O. Paulmyer-Lacroix, A. Lanteaume, C. Metzler-Guillemain, J. Perrin, et V. Achard. 2009a. « Les spermatozoïdes macrocéphales. Quels risques pour la fonction de reproduction?? » *Gyn?cologie Obst?trique & Fertilit?* 37 (9): 703-11. doi:10.1016/j.gyobfe.2009.05.011.
- . 2009b. « [Macrocephalic spermatozoa. What would be the impact on reproduction?] ». *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité* 37 (9): 703-11. doi:10.1016/j.gyobfe.2009.05.011.
- Guthauser, B., M. Albert, F. Ferfour, P. F. Ray, G. Rabiey, J. Selva, et F. Vialard. 2011a. « Inverse Correlation between Chromatin Condensation and Sperm Head Size in a Case of Enlarged Sperm Heads ». *Reproductive Biomedicine Online* 23 (6): 711-16. doi:10.1016/j.rbmo.2011.07.011.
- . 2011b. « Inverse Correlation between Chromatin Condensation and Sperm Head Size in a Case of Enlarged Sperm Heads ». *Reproductive Biomedicine Online* 23 (6): 711-16. doi:10.1016/j.rbmo.2011.07.011.
- Guthauser, Bruno, Xavier Pollet-Villard, Florence Boitrelle, et Francois Vialard. 2016. « Is Intracouple Assisted Reproductive Technology an Option for Men with Large-Headed Spermatozoa? A Literature Review and a Decision Guide Proposal ». *Basic and Clinical Andrology* 26 (1). doi:10.1186/s12610-016-0035-6.
- Guthauser, François Vialard, Mbarka Dakouane, Vincent Izard, Martine Albert, et Jacqueline Selva. 2006. « Chromosomal Analysis of Spermatozoa with Normal-Sized Heads in Two Infertile Patients with Macrocephalic Sperm Head Syndrome ». *Fertility and Sterility* 85 (3): 750.e5-750.e7. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.07.1334.
- Harbuz, R., R. Zouari, K. Dieterich, Y. Nikas, J. Lunardi, S. Hennebicq, et P.-F. Ray. 2009. « [Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction] ». *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité* 37 (6): 546-51. doi:10.1016/j.gyobfe.2009.04.002.
- Harbuz, Radu, Raoudha Zouari, Virginie Pierre, Mariem Ben Khelifa, Mahmoud Kharouf, Charles Coutton, Ghaya Merdassi, et al. 2011. « A Recurrent Deletion of DPY19L2 Causes Infertility in Man by Blocking Sperm Head Elongation and Acrosome Formation ». *American Journal of Human Genetics* 88 (3): 351-61. doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.007.
- Hassan, Mohamed A. M., et Stephen R. Killick. 2003. « Effect of Male Age on Fertility: Evidence for the Decline in Male Fertility with Increasing Age ». *Fertility and Sterility* 79 Suppl 3 (juin): 1520-27.

- Huang, He, Isabel Rambaldi, Eugene Daniels, et Mark Featherstone. 2003. « Expression of the Wdr9 Gene and Protein Products during Mouse Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 227 (4): 608-14. doi:10.1002/dvdy.10344.
- Jouannet, P., B. Ducot, D. Feneux, et A. Spira. 1988. « Male Factors and the Likelihood of Pregnancy in Infertile Couples. I. Study of Sperm Characteristics ». *International Journal of Andrology* 11 (5): 379-94.
- Kahraman, S. 1999. « Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection ». *Human Reproduction* 14 (3): 726-30. doi:10.1093/humrep/14.3.726.
- Kilani, Zaid, Radwan Ismail, Samer Ghunaim, Hossam Mohamed, David Hughes, Ian Brewis, et Christopher L. R. Barratt. 2004. « Evaluation and Treatment of Familial Globozoospermia in Five Brothers ». *Fertility and Sterility* 82 (5): 1436-39. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.03.064.
- Kimmins, Sarah, Claudia Crosio, Noora Kotaja, Jun Hirayama, Lucia Monaco, Christer Höög, Marcel van Duin, Jan A. Gossen, et Paolo Sassone-Corsi. 2007. « Differential Functions of the Aurora-B and Aurora-C Kinases in Mammalian Spermatogenesis ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (3): 726-39. doi:10.1210/me.2006-0332.
- Kimura, M., Y. Matsuda, T. Yoshioka, et Y. Okano. 1999. « Cell Cycle-Dependent Expression and Centrosome Localization of a Third Human Aurora/Ipl1-Related Protein Kinase, AIK3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (11): 7334-40.
- Koscinski, Isabelle, Elias Elinati, Camille Fossard, Claire Redin, Jean Muller, Juan Velez de la Calle, Françoise Schmitt, et al. 2011. « DPY19L2 Deletion as a Major Cause of Globozoospermia ». *American Journal of Human Genetics* 88 (3): 344-50. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.018.
- Kruger, T. F., A. A. Acosta, K. F. Simmons, R. J. Swanson, J. F. Matta, et S. Oehninger. 1988. « Predictive Value of Abnormal Sperm Morphology in in Vitro Fertilization ». *Fertility and Sterility* 49 (1): 112-17.
- Larson-Cook, Kjersten L, John D Brannian, Keith A Hansen, Kay M Kasperson, Edward T Aamold, et Donald P Evenson. 2003. « Relationship between the Outcomes of Assisted Reproductive Techniques and Sperm DNA Fragmentation as Measured by the Sperm Chromatin Structure Assay ». *Fertility and Sterility* 80 (4): 895-902. doi:10.1016/S0015-0282(03)01116-6.
- Leridon, Henri. 2007. « Studies of Fertility and Fecundity: Comparative Approaches from Demography and Epidemiology ». *Comptes Rendus Biologies* 330 (4): 339-46. doi:10.1016/j.crv.2007.02.013.
- Li, D., et R. Roberts. 2001. « WD-Repeat Proteins: Structure Characteristics, Biological Function, and Their Involvement in Human Diseases ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58 (14): 2085-97.
- Liu, Gang, Qiu-Wen Shi, et Guang-Xiu Lu. 2010. « A Newly Discovered Mutation in PICK1 in a Human with Globozoospermia ». *Asian Journal of Andrology* 12 (4): 556-60. doi:10.1038/aja.2010.47.
- Mateu, E. 2006. « High Incidence of Chromosomal Abnormalities in Large-Headed and Multiple-Tailed Spermatozoa ». *Journal of Andrology* 27 (1): 6-10. doi:10.2164/jandrol.05033.
- Matzuk, Martin M., et Dolores J. Lamb. 2002. « Genetic Dissection of Mammalian Fertility Pathways ». *Nature Cell Biology* 4 Suppl (octobre): s41-49. doi:10.1038/ncb-nm-fertilityS41.
- Menkveld, R., F. S. Stander, T. J. Kotze, T. F. Kruger, et J. A. van Zyl. 1990. « The Evaluation of Morphological Characteristics of Human Spermatozoa according to Stricter Criteria ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 5 (5): 586-92.

- Menkveld, R., W. Y. Wong, C. J. Lombard, A. M. Wetzels, C. M. Thomas, H. M. Merkus, et R. P. Steegers-Theunissen. 2001. « Semen Parameters, Including WHO and Strict Criteria Morphology, in a Fertile and Subfertile Population: An Effort towards Standardization of in-Vivo Thresholds ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 16 (6): 1165-71.
- Molinari, Emanuela, Marzia Mirabelli, Stefania Raimondo, Alessandro Brussino, Gianluca Gennarelli, Francesca Bongioanni, et Alberto Revelli. 2013a. « Sperm Macrocephaly Syndrome in a Patient without AURKC Mutations and with a History of Recurrent Miscarriage ». *Reproductive Biomedicine Online* 26 (2): 148-56. doi:10.1016/j.rbmo.2012.11.004.
- . 2013b. « Sperm Macrocephaly Syndrome in a Patient without AURKC Mutations and with a History of Recurrent Miscarriage ». *Reproductive Biomedicine Online* 26 (2): 148-56. doi:10.1016/j.rbmo.2012.11.004.
- Morel, F., S. Mercier, C. Roux, M. C. Clavequin, et J. L. Bresson. 1997. « Estimation of Aneuploidy Levels for 8, 15, 18, X and Y Chromosomes in 97 Human Sperm Samples Using Fluorescence in Situ Hybridization ». *Fertility and Sterility* 67 (6): 1134-39.
- Mori, Chisato, James W. Allen, David J. Dix, Noriko Nakamura, Makio Fujioka, Kiyotaka Toshimori, et Edward M. Eddy. 1999. « Completion of Meiosis Is Not Always Required for Acrosome Formation in HSP70-2 Null Mice ». *Biology of Reproduction* 61 (3): 813-22. doi:10.1095/biolreprod61.3.813.
- Nigg, E. A. 2001. « Mitotic Kinases as Regulators of Cell Division and Its Checkpoints ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (1): 21-32. doi:10.1038/35048096.
- Nistal, M., R. Paniagua, et A. Herruzo. 1977. « Multi-Tailed Spermatozoa in a Case with Asthenospermia and Teratospermia ». *Virchows Archiv. B, Cell Pathology* 26 (2): 111-18.
- Perrin, A., C. Coat, M. H. Nguyen, M. Talagas, F. Morel, J. Amice, et M. De Braekeleer. 2013. « Molecular Cytogenetic and Genetic Aspects of Globozoospermia: A Review ». *Andrologia* 45 (1): 1-9. doi:10.1111/j.1439-0272.2012.01308.x.
- Perrin, Aurore, Frédéric Morel, Ludovic Moy, Daniel Colleu, Véronique Amice, et Marc De Braekeleer. 2008. « Study of Aneuploidy in Large-Headed, Multiple-Tailed Spermatozoa: Case Report and Review of the Literature ». *Fertility and Sterility* 90 (4): 1201.e13-1201.e17. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.09.013.
- Philipps, Dana L., Karen Wigglesworth, Suzanne A. Hartford, Fengyun Sun, Shrivatsav Pattabiraman, Kerry Schimenti, MaryAnn Handel, John J. Eppig, et John C. Schimenti. 2008. « The Dual Bromodomain and WD Repeat-Containing Mouse Protein BRWD1 Is Required for Normal Spermiogenesis and the Oocyte-Embryo Transition ». *Developmental Biology* 317 (1): 72-82. doi:10.1016/j.ydbio.2008.02.018.
- Pison, Gilles. 2010. « Bulletin mensuel d'information de l'Institut national d'études démographiques ». *Population & Sociétés* n° 465.
- Scott, Lynette. 2003. « Pronuclear Scoring as a Predictor of Embryo Development ». *Reproductive Biomedicine Online* 6 (2): 201-14. doi:10.1016/S1472-6483(10)61711-7.
- Siffroi, Jean-Pierre. 2010. « Génétique de l'infertilité : du polymorphisme à la pathologie ? », Gynecologie Endocrinologie édition.
- Singh, G. 1992. « Ultrastructural Features of Round-Headed Human Spermatozoa ». *International Journal of Fertility* 37 (2): 99-102.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena, et E. J. Neer. 1999. « The WD Repeat: A Common Architecture for Diverse Functions ». *Trends in Biochemical Sciences* 24 (5): 181-85.
- Tang, Chieh-Ju C., Chun-Yi Lin, et Tang K. Tang. 2006. « Dynamic Localization and Functional Implications of Aurora-C Kinase during Male Mouse Meiosis ». *Developmental Biology* 290 (2): 398-410. doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.036.
- Thonneau, P., S. Marchand, A. Tallec, M. L. Ferial, B. Ducot, J. Lansac, P. Lopes, J. M.

- Tabaste, et A. Spira. 1991. « Incidence and Main Causes of Infertility in a Resident Population (1,850,000) of Three French Regions (1988-1989) ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 6 (6): 811-16.
- World Health Organization, éd. 2010. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization.
- Wosnitzer, Matthew, Marc Goldstein, et Matthew P Hardy. 2014. « Review of Azoospermia ». *Spermatogenesis* 4 (1): e28218. doi:10.4161/spmg.28218.
- Xiao, Nan, Chuen Kam, Chong Shen, Wenying Jin, Junqi Wang, Kwong Man Lee, Liwen Jiang, et Jun Xia. 2009. « PICK1 Deficiency Causes Male Infertility in Mice by Disrupting Acrosome Formation ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (4): 802-12. doi:10.1172/JCI36230.
- Yurov, Y. B., M. J. Saias, S. G. Vorsanova, R. Erny, I. V. Soloviev, V. O. Sharonin, M. R. Guichaoua, et J. M. Luciani. 1996. « Rapid Chromosomal Analysis of Germ-Line Cells by FISH: An Investigation of an Infertile Male with Large-Headed Spermatozoa ». *Molecular Human Reproduction* 2 (9): 665-68.
- Zini, A., et M. Sigman. 2009. « Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons ». *Journal of Andrology* 30 (3): 219-29. doi:10.2164/jandrol.108.006908.

## Annexe :

Réf.	Séquence	Tm (°C)	Gène	Taille (pb)
5047	CCCCAAGGTCCCAGGCATC	Q5 66	hTMEM239 ex2f	662
5048	CCGGGGTCAGGCCAGTCTACC	Q5 65	hTMEM239 ex2r	
5049	AGGCCGTCCTGGGCGCTG	Q5 70	hTMEM239 ex2f	800
5060	ATCAGCCAGCAGGGAAAGCA	Taq62 Q5 68	hTMEM239 ex1f	504
5061	GTCAGGAGGGCACCAGTGTG	Taq 63 Q5 69	hTMEM239 ex1r	
5067	AGGCTTAAGCTTGACATGATGCAGC AGCCGCGAG	Q5 72	hTMEM239_CDS_ AUG_HindIII	C-ter construct
5068	G TTCACGGTACCTTGATCCAAATCC TGAGTGTGCGCC	Q5 68	hTMEM239_CDS_NO STOP_KpnI	
5069	AGGCTTAAGCTTATGCAGCAGCCGC GAGTGGA	Q5 73	hTMEM239_CDS_NO AUG_HindIII	N-ter construct
5071	G TTCACGGTACCTCACACCGCGGCC ACGACAG	Q5 74	hTMEM239_W100X_STOP KpnI	W100X- N-ter
5072	G TTCACGGTACCCACCGCGGCCACG ACAGG	Q5 73	hTMEM239_W100X_NO STOP_KpnI	W100X- C-ter
5073	AGCAACATGACTTAGGTAAGTACCC	Taq 63 Q5 67	hTMEM239 ex1fi	138
5074	GGCGCTGCAGGAAGCAAC	Taq64 Q5 71	hTMEM239 ex1f-ii	150
5075	CAGCCATGCCTCGTGACCC	Taq64 Q5 70	hTMEM239 ex2r	
5077	GACTTAGGTGGCTCTGCCCA	Taq62 Q5 68	mTMEM239 ex1f	175
5078	CTGGGTCCAGCTCCGAGGTA	Taq63 Q5 69	mTMEM239 ex2r	
5080	GCCTGGGTGCCACAAAGAT	60	hBRWD1 ex34f	560
5081	ATAACAGCCAGACACAGCCA	59	hBRWD1 ex34r	
5117	GGAGGAACCCACTGGATTATGG	59	hBRWD1 ex42f	697
5118	GTGAAGAAGCCCTTAGTATCACATT	56	hBRWD1 ex42r	
5119	CTCACAGTCCTTCTACCCTGA	56	hBRWD1 ex41f	1218
5120	GTGTACCATTCCATTCCTGC	55	hBRWD1 ex41r	
5121	ACAGAATGCATGGGAGGGAG	57	hBRWD1 ex40f	1144
5122	TCCCCGCCCCCAAAAAGTG	63	hBRWD1 ex40r	
5123	CCTAAATCTAAGGAACCTAAAGGA C	53	hBRWD1 ex39f	425
5124	CTAAGCATTTTAGGAATCTGCTTTT G	54	hBRWD1 ex39r	
5125	CCATTCACAAAGCATGGCAC	56	hBRWD1 ex38f	586
5126	ACTACTAATCAGTGCCAGAATAAA ATG	54	hBRWD1 ex38r	
5127	GATGTGATGGTGTGCGCCTG	60	hBRWD1 ex37f	482

5128	AGTGGGTGACAGCCATTACC	57	hBRWD1_ex37r	
5129	TGAGCAGTAGCAGAAGCTCT	56	hBRWD1_ex35+36f	1236
5130	ATGTGTTGAGAGCAACATATATGAC	54	hBRWD1_ex35+36r	
5131	CCA ACTCTCCCACTAAATCTTTC	54	hBRWD1_ex33+34f	1171
5132	CTCTGTTTGAAATTAGGCACG	53	hBRWD1_ex33+34r	
5133	GTTAATAGCACAATATGCAGTCAC	53	hBRWD1_ex32f	329
5134	AAGTTGAGAGCATTAGAAGGTTATT	53	hBRWD1_ex32r	
5135	AATGCTAATCAGCCCCCAATTC	56	hBRWD1_ex30+31f	736
5136	CTCTATTTTTGACTGTGGAGATAAC C	54	hBRWD1_ex30+31r	
5137	ACAAAACAGATAAACACGATGC	53	hBRWD1_ex28+29f	1075
5138	CCTGTTTTTGTATTGTGCTTTTGGC	57	hBRWD1_ex28+29r	
5139	CCAAGCCGTAAGCAAATAT	52	hBRWD1_ex27f	296
5140	AGACTATATAACCTGCTATGTAGAG AG	54	hBRWD1_ex27r	
5141	CTTAGGCTATCCACAGTGCT	54	hBRWD1_ex26f	371
5142	TTAAACTTGTCTGCGGGTTTGG	57	hBRWD1_ex26r	
5143	TGGTTACAGCAGAAATGTTATCA	53	hBRWD1_ex24+25f	587
5144	AACTAATCATTAGATGGACATGGC	54	hBRWD1_ex24+25r	
5145	AGACACCCAAGGCACCACTA	58	hBRWD1_ex23f	433
5146	AGTTAAGTCTTCTGGTATCTTCCC	55	hBRWD1_ex23r	
5147	GTATTA AAAACTGTTCCACAGTTGC	54	hBRWD1_ex22f	313
5148	AGATGATTTAATCTTACTGGGGAGG	55	hBRWD1_ex22r	
5149	TATTAATCTCTGCAGAATGCTGTGT	55	hBRWD1_ex21f	341
5150	TCCTTCTGGAACTTGACGG	55	hBRWD1_ex21r	
5151	CCTTAAGCAAGAAATACTCCACTT	54	hBRWD1_ex20f	404
5152	AATAGGTTTAACTGCCTCTGAG	53	hBRWD1_ex20r	
5153	CCACAATTAAGATAGTAAGATTCCC	52	hBRWD1_ex19f	424
5154	GGTGCGCATCTTAGGTGAAC	57	hBRWD1_ex19r	
5155	GCTACCTTCAGACTACTAATTAAGT	53	hBRWD1_ex18f	442
5156	TTCAAAAATGGGAAATTCTGACCAT	55	hBRWD1_ex18r	
5157	ATAATTGGGGATCTAAAGGTAAGG	53	hBRWD1_ex16+17f	760
5158	TCAGAAGGGATATATTGTCACAGG	55	hBRWD1_ex16+17r	
5159	TAGCAGGCTTTGAATATGCTGA	55	hBRWD1_ex14+15f	796
5160	CTCACTGTAGGGTTGATAAGATAGG C	57	hBRWD1_ex14+15r	
5161	GAAGGTAGCTATAATCCCCTCAAC	55	hBRWD1_ex13f	345
5162	AACACCTGTGGATTGTCCTGTTG	58	hBRWD1_ex13r	
5163	GACAGGTTAGCTATACTAACATGTA GC	56	hBRWD1_ex11+12f	1383
5164	AACTGTTGAGATAAACTTAGTTTTA GGG	54	hBRWD1_ex11+12r	
5165	GAACCTAATGAAATAAACACCAGA AGTC	55	hBRWD1_ex10f	473
5166	ACATGGAAATCTGTGGAAATATTG ATATA	54	hBRWD1_ex10r	

5167	TAGTCAATATGGCACATATGCTGTA T	55	hBRWD1_ex9f	411
5168	GATTTTTTCACTACGGTAGTATTAC C	53	hBRWD1_ex9r	
5169	CCATGATTTGTATGATTTGTATGAA TG	53	hBRWD1_ex8f	473
5170	AGAGTTAAAGTTAATTTGGATGGC	53	hBRWD1_ex8r	
5171	CACTGTCTTTCAAAACAGCACAG	56	hBRWD1_ex6+7f	971
5172	AGTCTAATAAACCTCCAGGGC	54	hBRWD1_ex6+7r	
5173	GTCCACAGCATGATTTATAGTTACA T	54	hBRWD1_ex5f	391
5174	CTCAGCATGTTTTACAGTTTTTCAGT	55	hBRWD1_ex5r	
5175	CCGGGAACGCAGCTATCCCC	63	hBRWD1_ex1+2+3+4f	1214
5176	GCGCTGCCGCCTCACAAAG	63	hBRWD1_ex1+2+3+4r	
5177	GACAAGGAGTCAGGTCAAGCCCC	62	hBRWD1_ex1fii	
5178	TAAGACGCGAGGCCGTGCCAC	65	hBRWD1_ex2+3	
5179	GCAAGGTCGGCAGGAGGAACC	63	hBRWD1_ex2+3	
5180	CGGGTCAGCCTGACATGAC	58	hBRWD1_ex28	
5181	CTTTGGGTGCAGGCCACATAGG	61	hBRWD1_ex29	

Tableau A : Amorces utilisées pour les réactions de PCR et de séquençage.



## Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AURKC : Aurora Kinase C

BRWD1 : Bromodomain and WD repeat Domain containing 1

BSA : Bovin Serum Albumine

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme

CPMA : Centre de Procréation Médicalement Assistée

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DPY19L2 : Dpy-19 Like 2

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique Acide

FIV : Fécondation in vitro

FSH : Hormone Folliculostimulante

GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

HeLa : Henrietta Lacks

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection (Injection Intracytoplasmique de Spermatozoïdes)

LH : Hormone lutéinisante

NSMI : Nombre de Spermatozoïdes Mobiles Inséminables

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Paraformaldehyde

PHIP : Pleckstrin Homology domain Interacting Protein

PICK1 : Protein Interacting with C Kinase – 1

PSA : Antigène Spécifique Prostatique

RPKM : Reads Per Kilo base per million Mapped reads

SNC : Système Nerveux Central

SPATA16 : Spermatogenesis Associated 16

Tm : melting Temperature (température de fusion)

TMEM239 : Transmembrane protein 239

## Liste des figures :

Figure 1 : Appareil génital féminin.....	3
Figure 2 : Ovocyte II au sein d'un cumulus oophorus.....	4
Figure 3 : Chronologie de la croissance folliculaire.....	7
Figure 4 : Cycles des gonadotrophines hypophysaires et des hormones ovariennes.....	8
Figure 5 : L'appareil génital masculin.....	9
Figure 6 : Ultrastructure du spermatozoïde. ....	11
Figure 7 : Schéma d'une coupe de tube séminifère montrant les acteurs de la spermatogenèse. ....	13
Figure 8 : Cinétique de la spermatogenèse. ....	15
Figure 9 : Schéma simplifié de l'évolution morphologique du spermatozoïde au cours de la spermiogénèse.....	18
Figure 10 : Contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse .....	21
Figure 11 : Fécondation et développement embryonnaire précoce. ....	23
Figure 12 : Diagnostics médicaux chez 1551 femmes de couples infertiles .....	26
Figure 13 : Anomalies du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité .....	28
Figure 14 : Intervalle de distribution au 95e percentile des principales catégories d'anomalies morphologiques observées chez 926 hommes fertiles. ....	36
Figure 15 : Anomalies morphologiques selon la classification de David.....	37
Figure 16 : Schémas de quelques anomalies morphologiques des spermatozoïdes selon Krüger .....	38
Figure 17 : Zygote à 2 PN (à gauche) et embryon à 2 cellules (à droite).....	44
Figure 18 : Evolution des embryons entre le 2e et le 5e jour après mise en fécondation.....	44
Figure 19 : Classification de Plachot pour le typage embryonnaire à J2-J3. ....	45
Figure 20 : Classification des blastocystes selon Gardner.....	45
Figure 21 : Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI).....	46
Figure 22 : Spermatozoïdes macrocéphales réguliers (A) et spermatozoïdes normaux (B) au même grossissement ; spermatozoïde macrocéphale polyflagellés irréguliers (C).....	51
Figure 23 : Anomalies méiotiques et post-méiotique caractérisant la Déficience de Division Méiotique (Meiotic Division Deficiency MDD).....	52
Figure 24 : Histogramme de cytométrie en flux obtenu après décondensation et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. ....	54
Figure 25 : Représentation schématique de la spermatogenèse chez (A) un homme fertile ; (C) patient homozygote pour la mutation c.144delC.....	56
Figure 26 : Arbre décisionnel de prise en charge en AMP pour les patients présentant un taux de spermatozoïdes macrocéphales > 10%.....	60
Figure 27 : Répartition des spermocytogrammes en fonction du pourcentage de spermatozoïdes macrocéphales entre le 01/01/2008 et le 12/09/2017 au laboratoire de spermologie du CPMA de la Conception à Marseille. ....	63
Figure 28: Arbre généalogique des deux premiers patients (BB et BY). ....	70
Figure 29: Spermatozoïdes des patients BB (A) et LB (B) après coloration au Papanicolaou. ....	70
Figure 30 : Profil d'expression de TMEM239 révélant une localisation exclusivement testiculaire. ....	77
Figure 31: Représentation de la protéine TMEM239 (152aa) .....	78
Figure 32 : Migration sur gel 3% d'agarose des produits de PCR de TMEM239 après digestion par NarI (5'GGCGCC).....	79

Figure 33 : Localisation de TMEM239 fusionné à un tag Flag par immunofluorescence sur cellules HeLa après transfection. ....	80
Figure 34 : Expression tissulaire de BRWD1 révélant un RPKM au niveau testiculaire plus élevé que dans les autres tissus.....	81
Figure 35 : Représentation schématique de BRWD1.....	83

## Liste des tableaux :

Tableau 1: Paramètres du spermogramme et spermocytogramme de 35 patients présentant un taux de spermatozoïdes macrocéphales d'au moins 20%..	65
Tableau 2: Issues des prises en charge par AMP des 18 couples dont les hommes présentent un taux de macrocéphales à au moins 20%.	67
Tableau 3 : Principaux paramètres clinico-biologiques des patients recrutés.	71

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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