



**HAL**  
open science

# Diagnostic génétique de l'azoospermie et prise en charge en assistance médicale à la procréation au CHU de bordeaux, en particulier dans le contexte de l'agénésie bilatérale des canaux déférents

Mathilde Humbert

## ► To cite this version:

Mathilde Humbert. Diagnostic génétique de l'azoospermie et prise en charge en assistance médicale à la procréation au CHU de bordeaux, en particulier dans le contexte de l'agénésie bilatérale des canaux déférents. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02419413

**HAL Id: dumas-02419413**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02419413>**

Submitted on 19 Dec 2019

**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.

Université de Bordeaux  
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2019

Thèse n°3040

**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Discipline : Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement par

**Mathilde HUMBERT**

Née le 9 mars 1991 à Lunéville (54)

Le 3 mai 2019

---

**DIAGNOSTIC GENETIQUE DE L'AZOOSPERMIE ET PRISE EN CHARGE  
EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION AU CHU DE  
BORDEAUX, EN PARTICULIER DANS LE CONTEXTE DE L'AGENESIE  
BILATERALE DES CANAUX DEFERENTS**

---

Directrice de thèse :  
Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX

Jury

Pr Clément JIMENEZ	Président
Pr Benoit ARVEILER	Membre
Pr Loïc SENTILHES	Membre
Dr Aline PAPAXANTHOS	Membre
Dr Marie-Pierre REBOUL	Membre
Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX	Membre
Dr Roger LEANDRI	Rapporteur

# Remerciements

A mon président de thèse, **Monsieur le Professeur Clément JIMENEZ**

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie de votre disponibilité et votre aide au cours de ce semestre. Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour m'avoir fait bénéficier de votre grande connaissance. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A ma directrice de thèse, **Madame le Docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX**

Je te remercie vivement d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de m'avoir accompagnée et guidée tout au long de mon travail. Tu es un exemple à suivre dans ta rigueur et ta justesse. Merci de ta gentillesse.

A l'ensemble des membres de mon jury,

**Monsieur le Professeur Benoit ARVEILER**

C'est une très grande fierté de vous avoir dans mon jury de thèse. Merci de votre disponibilité et votre bienveillance. J'ai été ravie d'effectuer un semestre dans votre service. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

**Monsieur le Professeur Loïc SENTILHES**

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Recevez ici ma sincère gratitude.

**Madame le Docteur Aline PAPAXANTHOS**

Je vous remercie de ces deux années passées dans votre service. Votre précision dans le travail et vos connaissances vous honorent. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

**Madame le Docteur Marie-Pierre REBOUL**

Que dire? Tout simplement merci. Merci pour ce semestre en génétique passé en ta compagnie. Merci de ta gentillesse, ta disponibilité et ton amitié.

**Monsieur le Docteur Roger LEANDRI**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Je vous témoigne ma respectueuse reconnaissance.

Un grand merci à

**Madame le Docteur Patricia FERGELOT**

Mille mercis du temps que tu as consacré à la correction de ma thèse malgré ta charge de travail conséquente. Merci également pour le travail de master que l'on a effectué ensemble. Je reste admirative devant tant de connaissances. Merci enfin des liens d'amitié que nous avons créés.

**Monsieur le Docteur Adrien PAGIN**

Je vous remercie de m'avoir transmis les résultats des équipes lilloise et toulousaine qui ne sont pas encore publiés et d'avoir fait les analyses du gène *ADGRG2*.

**L'équipe de génétique moléculaire du CHU de Montpellier**

Merci d'avoir accepté de me partager vos documents concernant les mutations introniques profondes.

# Remerciements à tous ceux qui m'ont accompagnée au cours de ma formation

## A l'équipe de Biologie de la Reproduction

**Volcy**, je te remercie de ta rigueur dans le travail et de ta sympathie.

**Didier Demailly**, merci pour ma formation en spermocytogramme.

**Juliette**, merci d'avoir toujours été disponible pour moi, merci de ta bonne humeur. Profite bien d'Anna.

**Édouard**, merci d'être toujours jovial, c'est sûr, on forme l'équipe gagnante au baby.

**Monique**, merci de ta gentillesse, ton départ en retraite sera une perte importante pour le service, c'est certain. Heureusement je finis avant. Je te souhaite de belles vacances prolongées.

**Maïté, Marie-Caroline, Sylvie, Jean-François et Hervé**, merci de votre temps, de votre disponibilité, des moments passés ensemble au labo FIV, je suis très fière d'avoir eu une telle formation même si j'ai souvent abusé de votre gentillesse. Vous n'avez pas compté vos heures pour me former, notamment en ICSI. Merci.

**Pascale, Véro et Cathy**, toujours pétillantes et dynamiques, ça a été un réel plaisir de travailler avec vous. Merci.

**Carole**, merci pour ton sourire constant.

**Marianne**, merci pour ta joie de vivre et tes anecdotes.

**Anna**, merci pour ta gentillesse.

**Marie-Caro, Patricia et Corinne**, merci de votre bonne humeur et de nous aider très souvent à chercher des dossiers. Vous êtes des secrétaires au top.

**Audrey et Emma**, merci d'être toujours de bonne humeur.

**Nico**, même si tu es parti du service, tu restes mon formateur en spermio, merci de m'avoir fait gagner 5000 kebabs parce que j'étais meilleure que toi au tir de boules de papier dans la poubelle.

Ce fut un plaisir d'être parmi vous au quotidien pendant un an et demi.

Merci aussi à tous mes anciens et actuels co-internes et à l'équipe gynéco et sages-femmes.

## **A l'équipe de Génétique moléculaire**

**Eulalie, Perrine, Julie et Aurélien**, merci de votre gentillesse et votre disponibilité.

**Virginie**, merci des six mois passés à côté l'une de l'autre. Merci de m'avoir soutenue et écoutée dans mes moments de doutes. Merci d'être la personne que tu es.

**Laetitia**, merci de m'avoir appris beaucoup de choses en informatique. Merci pour nos discussions et pour ta gentillesse.

**Claudio**, merci d'avoir pris du temps pour m'expliquer tant de choses et répondre à mes nombreuses questions. Merci d'être toujours souriant.

**Mélanie, Gwenaëlle, Julie D, Julie B, Cécile, Lalie, Catherine, Guillaume, Brigitte et Armelle**, merci d'avoir toujours été disponibles pour moi, de m'avoir aidée pour mes manip, d'avoir formé une équipe ensemble. Restez comme vous êtes.

**Alice**, merci d'être de si bonne humeur et très sympa.

Je garde et garderai un souvenir formidable de mon semestre parmi vous.

## Remerciements personnels

### **A mes parents,**

Merci d'être toujours présents pour moi, merci de votre soutien et de votre amour.

### **A mon frère et ma sœur,**

Merci pour cette enfance pleine de taquineries. Comme on dit « qui aime bien, châtie bien ».

### **A ma belle-famille,**

Quelle chance d'avoir une belle-famille comme vous. Merci.

### **A mes amis d'enfance,**

Hélène, Anne-So, Chloé, Thibaut, Guillaume, on se connaît depuis tant d'années... Je suis heureuse de vous compter parmi mes amis. Même si c'est difficile de se voir souvent, j'espère qu'on arrivera toujours à trouver des moments pour passer du temps ensemble.

### **Aux amis de mes parents qui sont devenus aussi les miens,**

Sofiane, Charlotte, Guillaume, Rosemary, Jean-Luc, c'est un vrai plaisir à chaque moment passé ensemble, merci.

### **A Charles,**

Merci d'illuminer notre vie au quotidien. Te voir grandir chaque jour est un vrai bonheur.

### **Et enfin, à Clément,**

Tu es mon pilier, un soutien sans faille. Merci d'être toujours là pour Charles et pour moi, tu es un homme et un papa formidable. Je t'aime.

# Table des matières

<b>I. Introduction</b>	<b>12</b>
<b>II. Exploration de l'homme infertile</b>	<b>15</b>
<b>A. Bilan d'infertilité</b>	<b>15</b>
1. Examen clinique	15
2. Examens complémentaires	15
<b>B. Génétique des oligozoospermies sévères et des azoospermies</b>	<b>18</b>
1. A l'échelle chromosomique	18
a. Anomalies du nombre de chromosomes	18
(1) Syndrome de Klinefelter	18
(2) Autres anomalies de nombre	20
b. Anomalies de structure des chromosomes	21
(1) Translocations Robertsoniennes	21
(2) Translocations réciproques	22
2. A l'échelle génique	25
a. AZF	25
(1) Épidémiologie	25
(2) Clinique	28
(3) Analyse moléculaire	31
b. CFTR	34
(1) Épidémiologie	34
(2) Clinique	36
(3) Analyse moléculaire	39
(4) Exploration fonctionnelle de variants : étude des ARN messagers	46
c. ADGRG2	47
(1) Épidémiologie	47
(2) Clinique	48
(3) Analyse moléculaire	49
3. Techniques	51
a. Contexte	51
b. Outils diagnostiques	51
(1) Caryotype	51
(2) Analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA ou CGH array)	52
(3) Amplification par PCR	53
(4) Séquençage Sanger	57
(5) NGS	60
(6) Trousses commerciales	67
<b>C. Prise en charge en assistance médicale à la procréation</b>	<b>68</b>
1. Bilan de la femme associée	68
a. Examen clinique	68
b. Examens complémentaires	69
2. Techniques proposées au couple	70
a. Biopsie testiculaire	71
b. Technique de FIV-ICSI avec paillettes TESE	72
c. Don de spermatozoïdes	74
3. Conseil génétique	75



<b>III.    Prise en charge en génétique moléculaire des patients avec azoospermie au CHU de Bordeaux</b>	<b>78</b>
<b>A.    Objectifs</b>	<b>78</b>
<b>B.    Matériels et Méthodes</b>	<b>80</b>
1.    Analyses moléculaires au CHU de Bordeaux des gènes <i>CFTR</i> et <i>ADGRG2</i> et des loci AZF	80
2.    Analyses de seconde intention pour les patients avec azoospermie obstructive par ABCD	80
a.    Population	80
b.    Techniques	81
<b>C.    Résultats</b>	<b>85</b>
1.    Résultats des analyses réalisées au CHU de Bordeaux	85
a.    Loci AZF	85
b.    Gène <i>CFTR</i>	87
c.    Gène <i>ADGRG2</i>	89
2.    Résultats des analyses de seconde intention pour les patients avec azoospermie obstructive par ABCD	89
<b>D.    Discussion</b>	<b>96</b>
<b>IV.    Conclusion et Perspectives</b>	<b>102</b>
<b>V.    Bibliographie</b>	<b>105</b>
<b>VI.    Annexes</b>	<b>110</b>

## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> Représentation du tractus génital masculin normal	17
<b>Figure 2</b> Exemple d'échographie endorectale	17
<b>Figure 3</b> Gamètes issus des différents types de ségrégation lors d'une translocation Robertsonienne rob(14;21)	22
<b>Figure 4</b> Translocation réciproque avec ségrégation alterne	23
<b>Figure 5</b> Translocation réciproque avec ségrégation adjacente	24
<b>Figure 6</b> Structure du chromosome Y	26
<b>Figure 7</b> Fréquence des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles dans le monde	27
<b>Figure 8</b> Coupe histologique d'un tube séminifère avec absence de cellules de la lignée germinale	28
<b>Figure 9</b> Coupe histologique d'un tube séminifère avec arrêt de maturation au stade de spermatocytes	29
<b>Figure 10</b> Coupe histologique d'un tube séminifère avec hypospermatogénèse	30
<b>Figure 11</b> Mise en évidence d'une microdélétion AZFbc chez un patient grâce au logiciel GeneMapper®	33
<b>Figure 12</b> Schéma de la protéine CFTR composée de deux domaines transmembranaires MSD, deux domaines NBD et un domaine régulateur R	34
<b>Figure 13</b> Classification des mutations du gène CFTR allant de I à VI	41
<b>Figure 14</b> Classification modifiée des mutations du gène CFTR représentant les classes dans lesquelles les mutations peuvent être rangées selon leur mécanisme physiopathologique	42
<b>Figure 15</b> Exemple de bandelettes positives du kit INNO-LiPA	44
<b>Figure 16</b> Localisation des 9 mutations décrites par les CHU de Lille et Toulouse au sein de la protéine ADGRG2	50
<b>Figure 17</b> Schéma du principe d'un cycle d'amplification	54
<b>Figure 18</b> Photographie d'une électrophorèse sur gel d'agarose	55
<b>Figure 19</b> Courbe d'amplification d'une qPCR	56
<b>Figure 20</b> Représentation des étapes de séquençage Sanger	57
<b>Figure 21</b> Photographie annotée de l'intérieur de l'automate 3500xL d'Applied Biosystems®	58
<b>Figure 22</b> Présence de la mutation c.1624G>T dans l'exon 12 du gène CFTR	59

<b>Figure 23</b> Principe de l'amplification d'une librairie en émulsion	61
<b>Figure 24</b> Puce de séquençage	62
<b>Figure 25</b> Rapport de run sur Ion Torrent™	63
<b>Figure 26</b> Présence de la mutation c.1521_1523delCTT sur l'exon 11 du gène CFTR sur le logiciel Alamut® Visual	64
<b>Figure 27</b> Logiciel développé au CHU de Bordeaux	65
<b>Figure 28</b> Représentation d'une bandelette du kit INNO-LiPA CFTR-19	67
<b>Figure 29</b> Analyses à effectuer chez une conjointe d'un patient avec ABCD	75
<b>Figure 30</b> Photographie du gel de la PCR recherchant la mutation située dans l'intron 23	84
<b>Figure 31</b> Répartition des résultats d'analyses des microdélétions du chromosome Y au CHU de Bordeaux entre 2004 et 2018	86
<b>Figure 32</b> Répartition des microdélétions du chromosome Y identifiées au CHU de Bordeaux entre 2004 et 2018	86
<b>Figure 33</b> Répartition des résultats des analyses du gène CFTR pour infertilité masculine entre 1993 et 2018	88
<b>Figure 34</b> Diagramme de flux de l'étude	91
<b>Figure 35</b> Absence de la mutation c.2989-313A>T chez les patients étudiés	94
<b>Figure 36</b> Tableau récapitulatif des résultats des analyses complémentaires	95

## Liste des abréviations

ABCD : Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ARN : Acide Ribonucléique

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CGH array : Array Comparative Genomic Hybridization

CRCM : Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose

ddNTP : DidésoxyNucléoside TriPhosphate

dNTP : DésoxyNucléoside TriPhosphate

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FIV : Fécondation *In Vitro*

FSH : Follicle Stimulating Hormone

hCG : Human Chorionic Gonadotropin

ICSI : Injection Intra Cytoplasmique de Spermatozoïde

ISPs : Ion Sphere Particles

Kb : Kilobases

LH : Luteinizing Hormone

NGS : Next Generation Sequencing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

TESE : Testicular Sperm Extraction

UV : Ultraviolets

VEMS : Volume Expiratoire Maximum au cours de la première Seconde

WES : Whole Exome Sequencing

WGS : Whole Genome Sequencing

# I. Introduction

La fertilité est un problème majeur de Santé Publique, et au-delà, un problème sociétal. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infertilité est définie par l'incapacité d'obtenir une grossesse après douze mois ou plus de rapports sexuels réguliers non protégés [1]. En France, 15% des couples en âge de procréer, soit un couple sur six, consultent pour infertilité.

On estime que l'origine masculine est présente dans 50 à 60% des infertilités (environ 20% d'étiologie masculine isolée et 40% mixte). Les facteurs environnementaux et habitus de vie sont aujourd'hui de plus en plus étudiés ainsi que leur impact sur la fertilité masculine. En effet, une récente étude [2] a montré l'effet néfaste de la consommation excessive d'alcool, de tabac, de cannabis ainsi qu'un indice de masse corporelle élevé. Il en est de même pour l'exposition à des toxiques tels que les perturbateurs endocriniens (pesticides, solvants, plastiques,...) et les ondes électromagnétiques. Mais ces facteurs n'expliquent pas toutes les infertilités masculines.

En excluant les antécédents médicaux et chirurgicaux du tractus urogénital de l'homme (cryptorchidie uni- ou bilatérale, malformations, traumatisme, infections à germes sexuellement transmissibles, anomalies de l'axe hypothalamo-hypophysaire, tumeurs, chimiothérapie, radiothérapie...), on retrouve une origine génétique dans 20% des cas [3]. Ces causes génétiques ont, pour la plupart, un retentissement important sur les paramètres spermatiques. Ainsi lors de la découverte d'une azoospermie, définie par l'absence de spermatozoïdes sur la totalité de l'éjaculat après examen du culot de centrifugation sur deux spermogrammes espacés de trois mois (durée de la spermatogenèse), des analyses génétiques sont indiquées, orientées par les contextes clinico-biologique et radiologique [4].

L'azoospermie est estimée à une fréquence inférieure à 1% dans la population générale et elle est retrouvée chez 5 à 15% des hommes infertiles [5]. Elle peut être de trois types.

La plus fréquente est l'azoospermie dite non obstructive ou sécrétoire. Elle représente la majorité des azoospermies à hauteur de 60%. Elle correspond à une insuffisance testiculaire se caractérisant sur le plan hormonal par une augmentation des hormones hypophysaires :

l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), une diminution du taux plasmatique de testostérone totale ainsi qu'une baisse de l'inhibine B, sécrétée par les cellules de Sertoli, reflet d'une spermatogenèse altérée [6]. Sur le plan clinique, il existe une hypotrophie voire atrophie testiculaire le plus souvent bilatérale. Les marqueurs du plasma séminal sont le plus souvent normaux s'il n'y a pas de pathologie obstructive associée, les deux voies séminales constituées des canaux efférents, canaux déférents et des canaux éjaculateurs étant normalement perméables. L'échographie scrotale est systématiquement réalisée à la recherche d'anomalies testiculaires ainsi qu'une échographie rénale. Les étiologies sont nombreuses. Parmi les facteurs à l'origine de troubles de la spermatogenèse, on retrouve fréquemment une atteinte anatomique ou fonctionnelle du testicule, en particulier, les causes mécaniques telles que les ectopies testiculaires, les torsions, les varicocèles, les traumatismes..., des causes secondaires (tumeur, orchite virale, exposition aux toxiques environnementaux, chimio-radiothérapie), également des anomalies génétiques (Syndrome de Klinefelter, microdélétion du chromosome Y le plus souvent). L'atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysaire est aussi responsable d'une défaillance de la spermatogenèse avec des causes génétiques telles que le syndrome de Kallmann de Morsier, l'hyperplasie congénitale des surrénales entre autres, mais aussi des étiologies secondaires comme les tumeurs ou chirurgies touchant la tige pituitaire [7].

L'azoospermie obstructive correspond à un obstacle post-testiculaire de manière bilatérale. Elle représente 1 à 2% des étiologies d'infertilité masculine et environ 40% des azoospermies. L'anomalie pouvant se situer à chaque étage des voies spermatiques, il est nécessaire de réaliser un bilan étiologique avec interrogatoire, examen clinique, bilan biologique et échographique en première intention. L'interrogatoire permet de suspecter une origine infectieuse, traumatique ou iatrogène. L'examen clinique doit rechercher des anomalies à la palpation (volume testiculaire, canaux déférents, épидидymes, prostate). Les azoospermies obstructives présentent un bilan hormonal le plus souvent normal. La biochimie du liquide séminal informe sur le niveau de l'obstruction. En effet, les marqueurs utilisés sont propres à chaque entité des voies masculines et permettent de déterminer la localisation de l'anomalie. L'échographie scrotale et prostatique ainsi que l'échographie rénale complètent le bilan pour préciser l'atteinte. Des analyses génétiques peuvent également être prescrites en fonction des résultats des différents examens. C'est notamment le cas des agénésies bilatérales des canaux

déférents pour lesquelles une recherche de mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) est indiquée. Nous emploierons le terme d'agénésie même s'il est impropre car l'infertilité est secondaire à une régression des canaux déférents et non à une anomalie embryologique.

Enfin, l'azoospermie peut être mixte. Il s'agit de l'association d'une obstruction unilatérale de la voie excrétrice et d'une spermatogenèse défailante du testicule controlatéral. Sous-diagnostiquée, sa fréquence est estimée à 10%.

## II. Exploration de l'homme infertile

### A. Bilan d'infertilité

#### 1. Examen clinique

Afin de déterminer chez un homme l'étiologie de son infertilité, l'interrogatoire est essentiel dans le bilan. Il s'attache à rechercher les antécédents médicaux et chirurgicaux personnels, notamment la notion de cryptorchidie, de traumatismes testiculaires, de malformations urogénitales, d'infections affectant les organes génitaux. Des paramètres généraux tels que la prise de toxiques (alcool, tabac, cannabis), la profession, l'indice de masse corporelle ainsi que les traitements au long cours sont à prendre en considération. L'examen andrologique (Figure 1) cherche à éliminer toutes anomalies des organes génitaux externes tels que l'hypospadias, un micropénis, un volume testiculaire anormal ou une varicocèle.

#### 2. Examens complémentaires

A la suite de la consultation, un spermogramme est prescrit pour l'appréciation des paramètres spermatiques en prenant en compte le délai d'abstinence (volume, mesure du pH, concentration des spermatozoïdes par millilitre et par volume total de l'éjaculat, mobilité, vitalité) et pour la réalisation d'un spermocytogramme avec évaluation du nombre de spermatozoïdes de forme typique.

Un bilan hormonal avec dosage des gonadotrophines FSH et LH et de la testostérone permet d'évaluer l'axe hypothalamo-hypophysaire. Le caractère sécrétoire, excrétoire ou mixte d'une azoospermie est apprécié à partir de l'inhibine B en association avec les valeurs de FSH et LH [8].

En fonction des résultats du spermogramme, le bilan sera complété.



Devant toute découverte d'azoospermie, il est nécessaire de réaliser un second prélèvement à trois mois du premier afin de confirmer l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

En premier lieu, le dosage des marqueurs du plasma séminal lors de la découverte d'une azoospermie permet d'orienter le diagnostic. Une anomalie de ces marqueurs est en faveur d'une origine obstructive. Devant un tableau d'azoospermie d'allure obstructive avec agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), une recherche de mutations du gène *CFTR* est systématique. Avant toute analyse génétique, il est obligatoire de recueillir par écrit le consentement des patients.

D'autre part, une concentration de spermatozoïdes inférieure à 10 millions par millilitre doit faire rechercher une anomalie chromosomique sur un caryotype [9]. De même, devant une concentration inférieure à 5 millions de spermatozoïdes par millilitre [10] ou 1 million par millilitre selon les équipes, il est recommandé d'effectuer une recherche de microdélétion du chromosome Y.

Le bilan échographique est effectué dans le cadre d'une oligoasthénotérazoospermie sévère (OATS) ou d'une azoospermie. Selon le type d'azoospermie, le bilan diffère. Si l'on suspecte une azoospermie obstructive, une échographie endorectale est pratiquée pour vérifier l'intégrité des structures du tractus génital, en particulier des canaux déférents (Figure 2). L'échographie scrotale s'effectue, quant à elle, quelle que soit la nature de l'azoospermie. Elle recherche des varicocèles infra cliniques, des kystes, vérifie l'homogénéité tissulaire et apprécie le volume testiculaire.

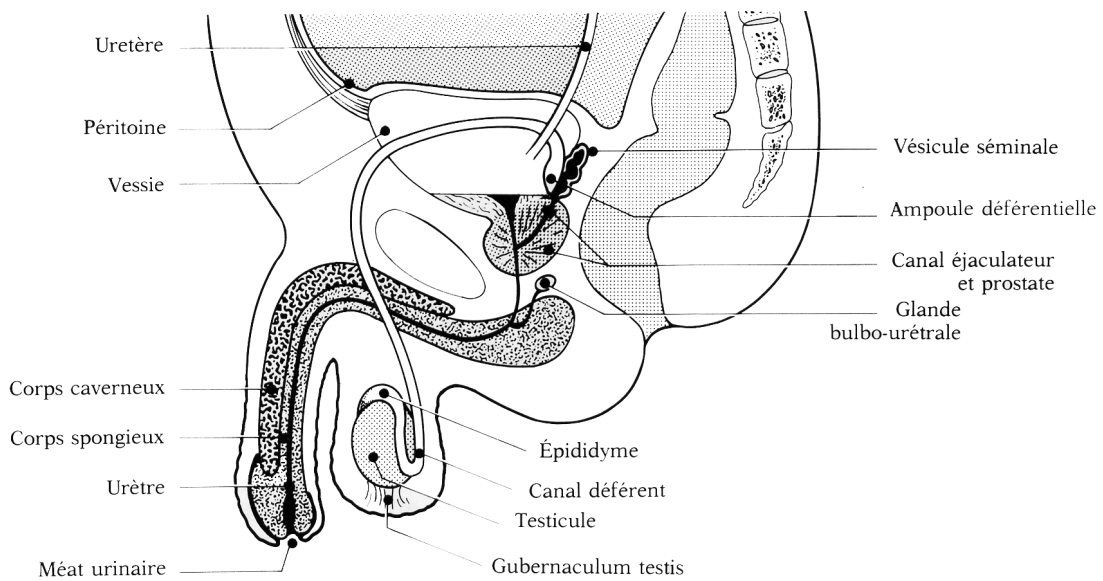


Figure 1 Représentation du tractus génital masculin normal d'après le Dr Gervaise

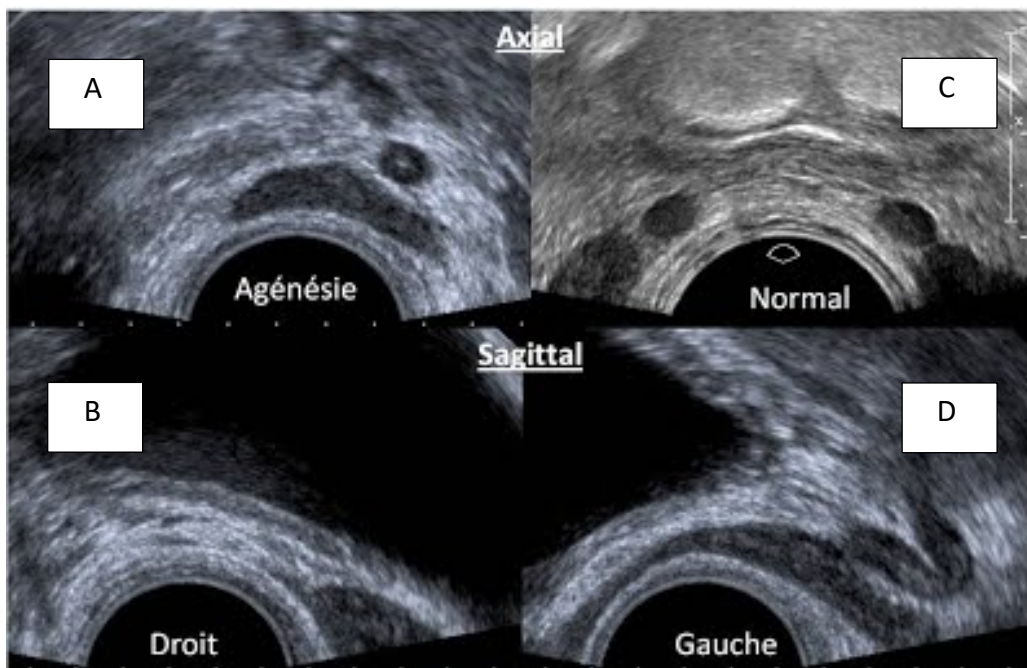


Figure 2 Exemple d'échographie endorectale

A et B. Agénésie du canal déférent et de la vésicule séminale droits

C. Présence bilatérale des voies séminales

D. Présence de la voie séminale gauche

d'après le site consulté le 24 février 2019

<https://sites.google.com/site/imagerieinfertilitemasculine/matiere-5-classique/sites-nationaux/carrefour-vesiculo-deferentiel/ampoules-deferentielles>

## B. Génétique des oligozoospermies sévères et des azoospermies

### 1. A l'échelle chromosomique

#### *a. Anomalies du nombre de chromosomes*

Lors de troubles de la fertilité masculine, de nombreuses étiologies chromosomiques sont retrouvées. Elles représentent d'ailleurs la majeure partie des causes génétiques d'infertilité. Les anomalies de nombre ou aneuploïdies par mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la méiose sont les plus fréquentes. Le diagnostic repose sur la réalisation d'un caryotype à partir de leucocytes issus d'un prélèvement sanguin. Une pathologie se distingue : le syndrome de Klinefelter [11].

#### (1) Syndrome de Klinefelter

Le syndrome de Klinefelter, caractérisé par la formule chromosomique 47,XXY, correspond à une aneuploïdie par la présence d'un chromosome X surnuméraire. Il s'agit de l'étiologie génétique la plus fréquente dans les tableaux d'infertilité masculine. On estime qu'un garçon sur 660 naît porteur de cette anomalie [12]. Les hommes atteints ont un phénotype caractéristique. En effet, ils sont pour la plupart longilignes, présentent une gynécomastie et un volume testiculaire faible ainsi qu'une pilosité peu développée expliqués par l'hypogonadisme.

L'atteinte de la spermatogenèse se caractérise le plus souvent par une azoospermie même si des spermatozoïdes sont parfois retrouvés dans l'éjaculat lors d'une oligozoospermie sévère ou au cours d'une biopsie testiculaire. Cela s'expliquerait par le fait que de rares spermatogonies soient capables au cours de leurs mitoses de perdre le chromosome X surnuméraire rendant la gonie euploïde et donc capable d'entrer en méiose pour réaliser l'ensemble des étapes de la spermatogenèse [13]. Ceci se traduit par des îlots de spermatogenèse conservée sur des coupes histologiques de tissu testiculaire. Néanmoins,

l'âge est le principal facteur pronostique pour la fertilité de ces hommes. Dans un travail reprenant les résultats de différentes études, la moyenne d'âge pondérée des patients pour lesquels des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la biopsie testiculaire était de 31,4 ans. Elle était de 35 ans lors de l'absence de spermatozoïdes [14]. Il a été montré que la concentration de spermatozoïdes diminuait jusqu'à devenir nulle par dégradation de la spermatogenèse [15]. Des conséquences sont aussi visibles sur les cellules autres que germinales, à savoir les cellules de Sertoli et de Leydig. En effet, les cellules de Sertoli rentrent en apoptose de manière importante et les cellules de Leydig ont un fonctionnement perturbé, responsable d'une production insuffisante de stéroïdes.

Lors du bilan d'infertilité pour syndrome de Klinefelter, il est nécessaire de s'intéresser aux antécédents du patient, notamment la notion de cryptorchidie, plus fréquente dans cette population. Les signes d'hypogonadisme tels que l'asthénie, une perte de libido, une dysfonction érectile sont à rechercher.

Le bilan hormonal est en faveur d'un hypogonadisme hypergonadotrope avec des valeurs anormales des gonadotrophines : une FSH très élevée et une LH souvent augmentée. La testostérone totale est diminuée et l'inhibine B est indosable [16].

L'échographie scrotale confirme la diminution du volume testiculaire mis en évidence à l'examen clinique.

Sur le spermogramme, on constate une azoospermie. Elle est dite non obstructive ou sécrétoire. Il n'y a par définition aucune obstruction des voies génitales masculines. Il n'y a donc pas d'intérêt à réaliser une biochimie séminale.

Le bilan terminé, il est décidé de la prise en charge du patient en assistance médicale à la procréation lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire. L'andrologue donne son accord ou non pour la réalisation d'une biopsie testiculaire en vue d'une fécondation *in vitro* avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde (FIV-ICSI). Le risque majeur est une aggravation de l'hypogonadisme. De rares cas de grossesses après biopsie testiculaire suivie d'une ICSI ont été décrits [17]. Si la biopsie testiculaire n'est pas envisagée, des inséminations intra-utérines avec gamètes de donneur sont proposées.

Si la découverte du syndrome de Klinefelter est fortuite, un conseil génétique est réalisé afin d'expliquer la pathologie et d'informer des conséquences théoriques possibles [18] sur la descendance si une extraction chirurgicale testiculaire de spermatozoïdes suivie d'une ICSI est acceptée.

Enfin, dans le cadre de la préservation de la fertilité masculine, le protocole de recherche clinique « FERTIPRESERVE » à Lyon est actuellement proposé à de jeunes patients porteurs du syndrome de Klinefelter. Une biopsie testiculaire est réalisée afin de cryoconserver les spermatozoïdes retrouvés lors de cet acte chirurgical.

## (2) Autres anomalies de nombre

Il existe d'autres aneuploïdies concernant les gonosomes, responsables d'azoospermie. A titre d'exemples, les patients avec les formules chromosomiques 46,XX ou les mosaïques 45,X/46,XY sont infertiles.

L'incidence des hommes avec le caryotype 46,XX est estimée à 1 pour 20000 naissances masculines vivantes. Les hommes porteurs de cette anomalie ont pour la plupart des organes génitaux externes normaux même si le volume testiculaire est généralement inférieur à 5 millilitres. Lors d'une analyse par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), on retrouve une translocation du chromosome Y avec le gène *SRY* sur un chromosome X. La présence de ce locus permet la virilisation. Cependant, la valeur de la testostérone diminue avec le temps alors que le taux de gonadotrophines devient supérieur à la norme. Tout comme dans le syndrome de Klinefelter, il existe une hyalinisation des tubes séminifères, provenant de la dégénérescence du collagène, responsable d'un arrêt de la spermatogenèse et donc d'une azoospermie [19].

Les patients porteurs de la mosaïque 45,X/46,XY sont atteints de dysgénésie gonadique dite mixte. Le tableau clinique est très variable selon le taux de cellules monosomiques. Le signe le plus fréquent chez ces hommes est le développement asymétrique des testicules. La

dysgénésie testiculaire est responsable d'une insuffisance en testostérone et donc d'une virilisation incomplète [20].

Des anomalies des chromosomes autosomes peuvent être aussi à l'origine de troubles de la spermatogénèse. C'est le cas de la trisomie 21, pour laquelle très peu d'études ont été faites mais il semblerait que la fertilité des hommes atteints soit diminuée.

### *b. Anomalies de structure des chromosomes [21]*

Les anomalies de structure sont responsables de remaniements équilibrés. Les deux plus fréquentes sont les translocations Robertsoniennes et les translocations réciproques mais d'autres anomalies peuvent se rencontrer comme les inversions péri- ou paracentriques, des insertions, délétions ou duplications, ainsi que des chromosomes en anneau ou des isochromosomes. Il est important d'adresser les patients porteurs d'anomalies chromosomiques à un généticien afin qu'ils puissent bénéficier d'un conseil génétique.

#### **(1) Translocations Robertsoniennes**

Les translocations Robertsoniennes correspondent à des fusions de deux chromosomes dits acrocentriques. Ces chromosomes se caractérisent par un bras court très réduit et un centromère distal. Il en existe 5 : les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. Lors de la fusion centrique, les bras courts de ces chromosomes porteurs de séquences satellites sont perdus.

Ces translocations sont très fréquentes, de l'ordre de 0,9 pour 1000 naissances. Les plus courantes intéressent les chromosomes 13, 14 et 21, notamment les translocations  $rob(13;14)(q10;q10)$  et  $rob(14;21)(q10;q10)$ . Elles sont responsables de la plupart des formes familiales de trisomie 13 et 21 car au cours de la méiose, la ségrégation est le plus souvent anormale, provoquant des trisomies ou monosomies chez la descendance (Figure 3).

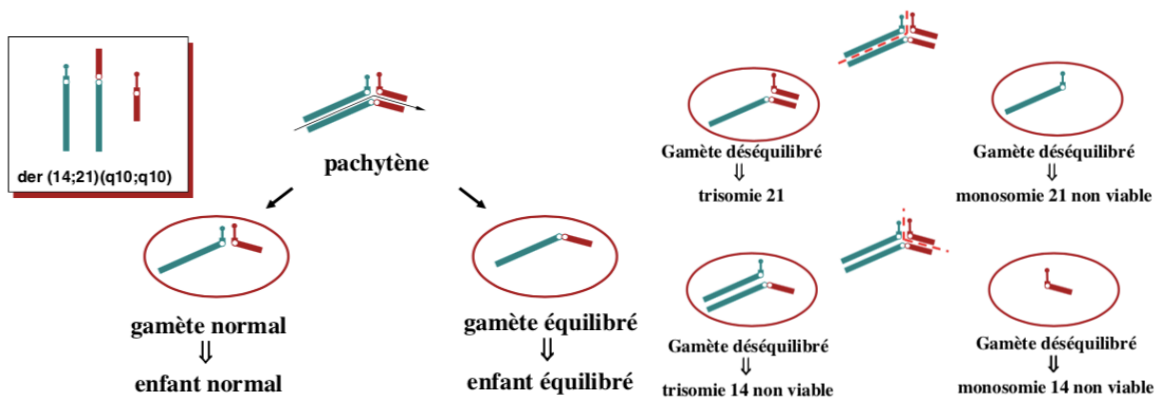


Figure 3 Gamètes issus des différents types de ségrégation lors d’une translocation Robertsonienne rob(14;21)

La ségrégation alterne (à gauche) produit un gamète normal ou un gamète avec translocation équilibrée.  
 La ségrégation adjacente (à droite) forme lors de la méiose des gamètes déséquilibrés qui conduiront à une monosomie ou trisomie des chromosomes 14 et 21 chez l’enfant.  
 La paire de chromosomes 14 est en vert et celle des chromosomes 21 en rouge.  
 D’après la présentation de M. Prieur

## (2) Translocations réciproques

Les translocations réciproques correspondent à des échanges de segments entre deux chromosomes à distance des régions centromériques. Elles peuvent toucher l’ensemble des chromosomes. Leur incidence est estimée à 1,2 pour 1000 naissances.

Ces translocations n’entraînent chez les hommes porteurs qu’une infertilité mais il existe un risque de transmission à la descendance. Elles sont pour la plupart détectées au cours d’un bilan d’infertilité sur le caryotype associé à une FISH.

Il existe 3 types de ségrégations.

- La ségrégation de type 2 :2 au cours de laquelle deux chromosomes sont transmis dans chaque gamète.

- La ségrégation de type 3 :1 au cours de laquelle il y a une répartition anormale des chromosomes : 3 se retrouvent dans une cellule et un dans une autre.
- La ségrégation de type 4 :0 au cours de laquelle les 4 chromosomes sont transmis dans le même gamète.

Le type de ségrégation le plus fréquent est le type 2 :2 avec plusieurs possibilités de séparation : alterne (Figure 4), adjacent de type 1 ou adjacent de type 2 (Figure 5).

Contrairement à la ségrégation alterne, les deux types de ségrégation adjacente sont responsables de gamètes déséquilibrés. En effet, dans le type 1, un chromosome normal est associé au chromosome remanié de l'autre paire créant une duplication de l'un des segments transloqués et une monosomie de l'autre segment. Dans le type 2, un chromosome remanié est transmis avec son propre homologue créant une duplication/délétion des segments centriques des chromosomes remaniés.

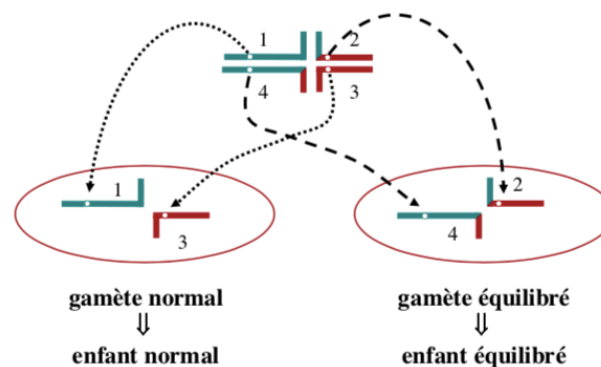


Figure 4 Translocation réciproque avec ségrégation alterne

Formation de gamètes normaux (à gauche) ou équilibrés (à droite) d'après la présentation de M. Prieur



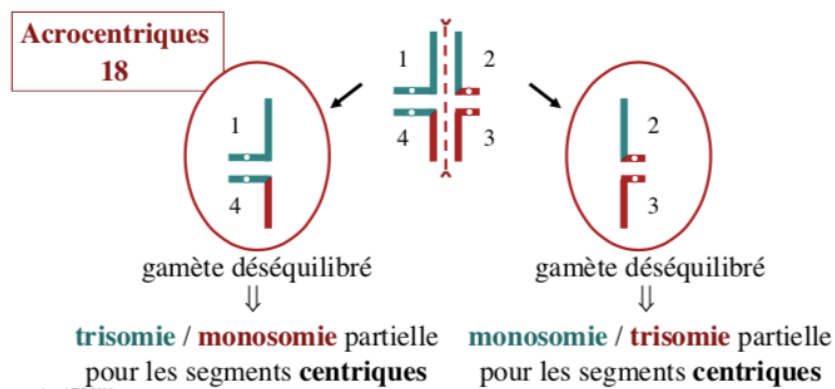
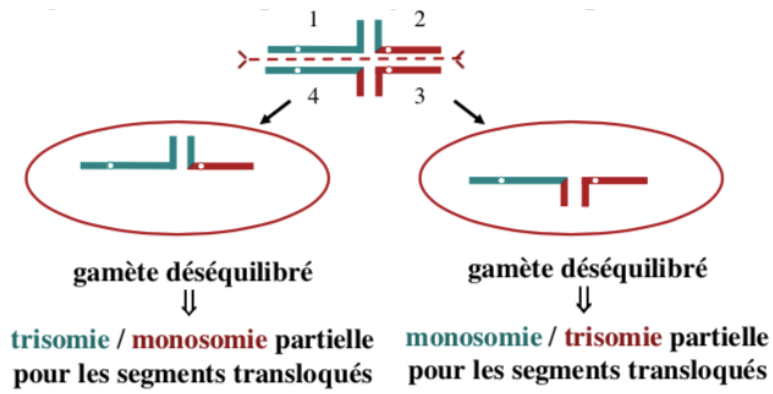


Figure 5 Translocation réciproque avec ségrégation adjacente

La ségrégation de type 1 (en haut) et celle de type 2 (en bas) sont responsables de la formation de gamètes déséquilibrés (monosomie ou trisomie partielle) d'après la présentation de M. Prieur

## 2. A l'échelle génique

Les anomalies géniques sont également responsables d'infertilité masculine. Les plus fréquentes sont les microdélétions du chromosome Y, les mutations du gène *CFTR* ainsi que le gène récemment découvert codant pour la protéine d'adhésion G couplée au récepteur G2 (*ADGRG2*).

### a. AZF [10]

#### (1) Épidémiologie

Le chromosome Y comporte une grande région appelée MSY pour Male-Specific Region of Y, représentant 95% de la longueur du chromosome. C'est la partie spécifique du chromosome Y qui ne recombine en principe jamais avec le chromosome X au cours de la méiose. Cette région a été découverte et séquencée en 2003 par l'équipe de Skaletsky. Elle est composée de 156 unités de transcription incluant 78 gènes codant pour 27 protéines.

Dans cette région [22] se trouvent des loci nommés AZF pour azoospermia factor. Ils sont situés sur le bras long du chromosome Y en région Yq11 et ont un rôle essentiel dans la spermatogenèse (Figure 6). Il en existe trois : AZFa, AZFb et AZFc, constitués de séquences répétées, appelées amplicons, organisées en palindromes. Ces répétitions sont à l'origine de fréquentes recombinaisons homologues au sein du chromosome Y. Ces loci contiennent 60 gènes ayant pour particularité d'avoir une expression testiculaire spécifique.

La région AZFa comporte les gènes *USP9Y* et *DDX3Y* (anciennement *DBY*) et s'étend sur 1100kb. Les deux régions AZFb et AZFc regroupent ensemble 24 gènes. AZFb et AZFc mesurent respectivement 6.2Mb et 3.5Mb.

Les microdélétions du chromosome Y sont la seconde cause d'infertilité masculine. Elles sont responsables d'azoospermie et d'oligozoospermie sévère. Elles touchent 1 homme sur 4000 dans la population générale. La prévalence [23] en cas d'azoospermie est estimée entre 10 et 15%, et en cas d'oligozoospermie sévère entre 5 et 7%. Ces chiffres varient d'un pays à l'autre (Figure 7).

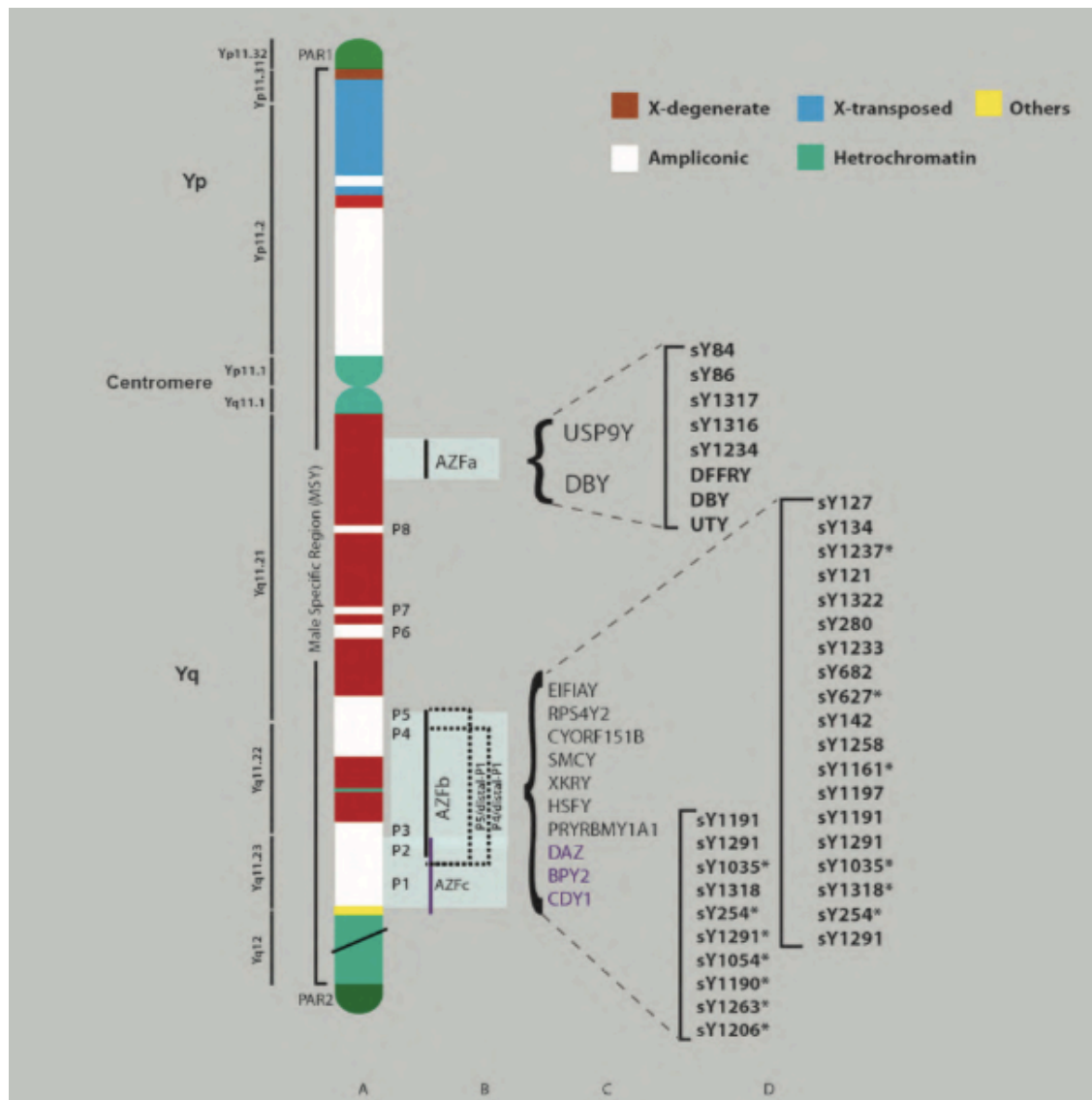


Figure 6 Structure du chromosome Y [22]

Le chromosome Y est composé de deux bras : le bras court (Yp) et le bras long (Yq) qui comportent de l'hétérochromatine (en vert) à leur extrémité. Il comporte des régions communes avec le chromosome X (X-transposée, en bleu), des régions anciennement communes (X-dégénérée, en marron), les séquences (amplicon) organisées en palindromes (P1 à P8).

Les régions AZF sont représentées ainsi que les gènes qu'elles comportent et les marqueurs qu'elles contiennent.

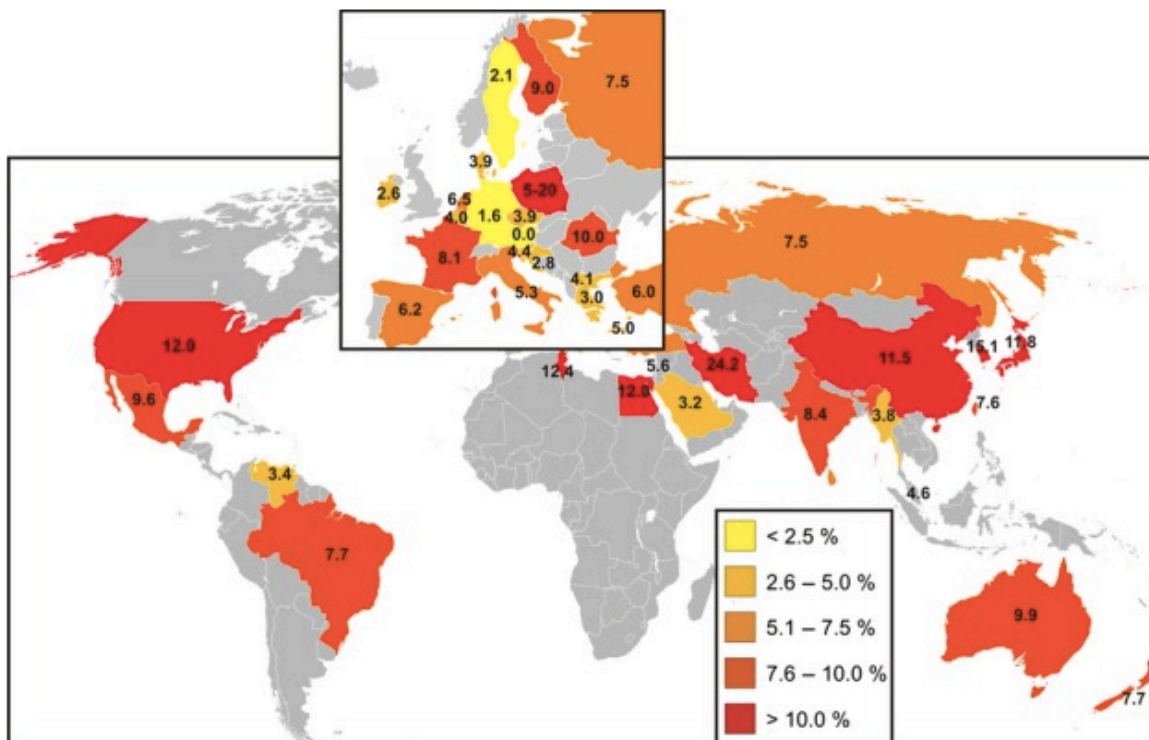
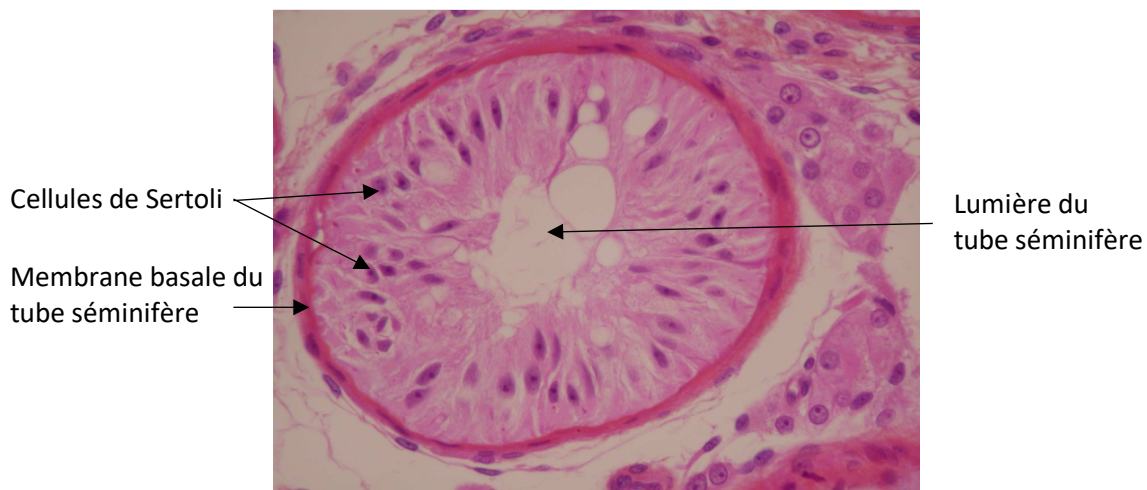


Figure 7 Fréquence des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles dans le monde [23]

## (2) Clinique

Les délétions des loci AZF sont responsables d'un défaut de la spermatogénèse. Selon le locus délété, la sévérité de l'atteinte varie. L'azoospermie d'allure non obstructive d'origine périphérique est la complication la plus importante de ces délétions.

Une délétion complète du locus AZFa, atteinte la moins fréquente, conduit à une azoospermie avec un aspect de Sertoli Cell Only Syndrome (SCOS) sur une coupe histologique de tissu testiculaire. Il y a absence complète des cellules de la lignée germinale, ne sont présentes que les cellules de Sertoli avec une morphologie altérée (Figure 8). Les tubes séminifères sont de diamètre diminué et leur membrane basale épaissie [24].



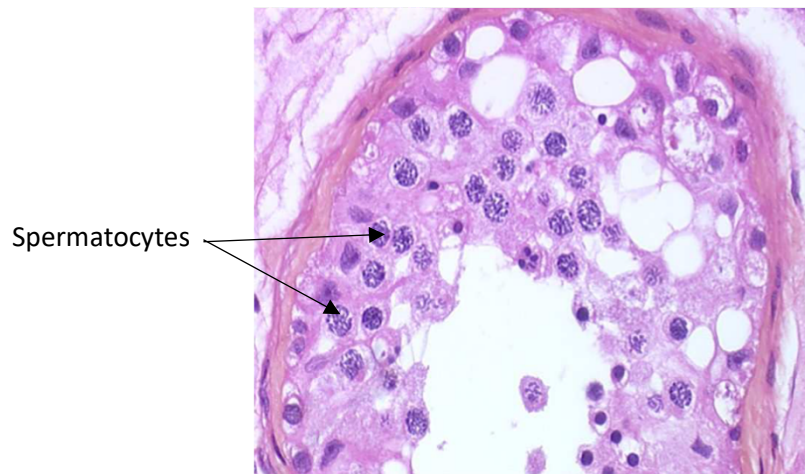
*Figure 8 Coupe histologique d'un tube séminifère avec absence de cellules de la lignée germinale*

*d'après le cours du Dr Ferlicot*

Le diagnostic d'une délétion complète de AZFa contre-indique la réalisation d'une biopsie testiculaire en vue d'une éventuelle ICSI car la probabilité de retrouver des spermatozoïdes est quasiment nulle [25].

Une délétion d'AZFb ou emportant AZFb et AZFc peut être responsable soit d'un SCOS, soit d'un blocage de maturation aboutissant également à un tableau d'azoospermie.

Le blocage de la spermatogenèse correspond à la présence de cellules de la lignée germinale bloquées à un même stade de développement, ne parvenant pas à maturation complète. Il s'agit d'une anomalie rare. Au niveau histologique, les tubes séminifères sont de taille normale, les cellules germinales sont toutes arrêtées au même stade de maturation (Figure 9).



*Figure 9 Coupe histologique d'un tube séminifère avec arrêt de maturation au stade de spermatocytes*

*d'après le cours du Dr Ferlicot*

Comme celui d'une délétion du locus AZFa, le diagnostic d'une délétion d'AZFbc ne permet pas de retenir l'indication d'une biopsie testiculaire à la recherche de spermatozoïdes, les chances d'en retrouver étant pratiquement nulles.

Les délétions d'AZFc sont quant à elles associées à des tableaux cliniques variables. La spermatogenèse est en général conservée *a minima*. On parle d'hypospermatogenèse. Les cellules germinales sont en quantité diminuée, cela affecte tous les stades de développement mais n'empêche pas d'arriver au dernier stade de maturation, le spermatozoïde (Figure 10).

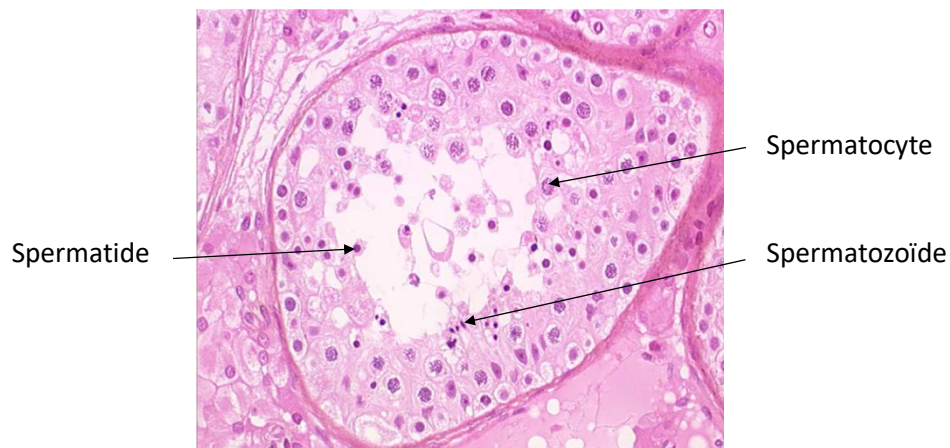


Figure 10 Coupe histologique d'un tube séminifère avec hypospermatogenèse

d'après le cours du Dr Ferlicot

On considère que les chances de trouver des spermatozoïdes en présence d'une atteinte du locus AZFc sont approximativement de 50%, c'est la raison pour laquelle, il est possible d'effectuer une biopsie testiculaire dans le cadre d'une prise en charge en assistance médicale à la procréation. Lors du conseil génétique, il est important d'informer le couple qu'un fœtus masculin sera systématiquement porteur de cette microdélétion et d'expliquer qu'il existe un risque pour les hommes apparentés (frères en particulier) d'être atteints et donc infertiles. Le dépistage des hommes de la famille est par conséquent fortement recommandé.

### (3) Analyse moléculaire

L'indication principale d'une recherche de microdélétions du chromosome Y est une azoospermie au spermogramme ou une oligozoospermie sévère. Il a été montré que les hommes infertiles ayant une concentration comprise entre 2 et 5 millions de spermatozoïdes/mL présentaient très rarement une délétion dans les loci AZF [26].

De manière générale, en présence d'une anomalie chromosomique au caryotype, d'un hypogonadisme hypogonadotrope ou d'une azoospermie obstructive, la recherche de microdélétions n'est pas indiquée. Cependant, en l'absence d'étiologie retrouvée à l'azoospermie, il est recommandé de faire cette analyse moléculaire.

La recherche des délétions AZF s'effectue par PCR, réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*) amplifiant simultanément les régions sélectionnées du chromosome Y grâce à des amorces spécifiques. Le gène *SRY* est également recherché, témoignant ou non de l'atteinte du bras court du chromosome Y.

Pour contrôler la technique, un ADN féminin est amplifié, servant de témoin négatif et un ADN d'un patient présentant une délétion est utilisé pour servir de contrôle positif. Pour repérer toute contamination, un blanc réactionnel ne contenant que de l'eau est amplifié en parallèle.

Deux marqueurs sont utilisés en première intention par région AZF afin de les délimiter.

Pour AZFa, il s'agit de sY84 et sY86.

Pour AZFb, il s'agit de sY127 et sY134.

Pour AZFc, il s'agit de sY254 et sY255.

Lorsque les deux marqueurs sY84 et sY86 sont absents, la probabilité d'être en présence d'une délétion complète d'AZFa est très forte même si de très rares cas de délétions partielles ont été décrits. C'est la raison pour laquelle, une analyse de marqueurs de deuxième intention doit être réalisée. A savoir, sY82 et sY83 ou sY1064 pour la limite proximale et sY1065 ou sY1182 et sY88 pour la limite distale.



Si un seul des deux marqueurs de première intention est absent, il est possible de rechercher la présence des deux gènes du locus AZFa, c'est-à-dire *USP9Y* et *DDX3Y*, les deux gènes se situant en aval de sY84 et sY86.

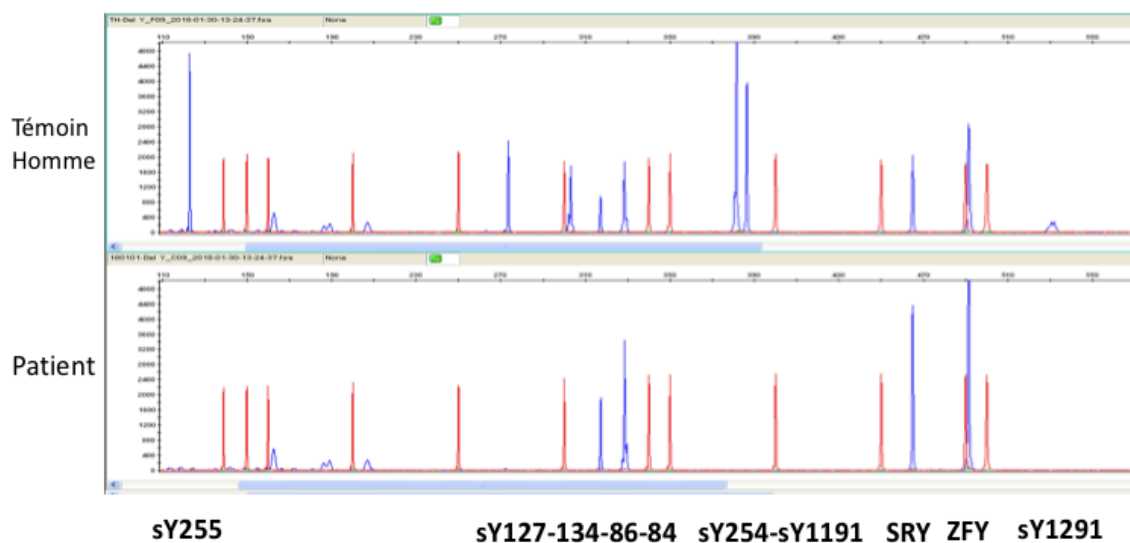
Du palindrome P5 à la partie proximale de P1, c'est-à-dire pour tester le locus AZFb, deux marqueurs sont utilisés : sY127 et sY134. Si les deux sont absents, il y a de fortes chances d'être en présence d'une délétion complète. Il est donc nécessaire de compléter le bilan avec d'autres marqueurs : sY105 et sY121 ou sY224 pour la limite proximale et sY143 ou sY1192 et sY153 pour la partie distale.

Pour étudier AZFc, sY254 et sY255 sont utiles car spécifiques du gène *DAZ*. L'absence des deux marqueurs témoigne d'une atteinte complète de la région. Il est également intéressant de tester le marqueur sY160 localisé dans l'hétérochromatine, témoin d'une délétion terminale.

Une délétion partielle particulière au sein du locus AZFc présente un intérêt clinique. Les effets de la délétion *gr/gr*, emportant la moitié des gènes du locus, sont dépendants des origines géographiques et ethniques des patients. Les populations asiatiques seraient en effet plus sensibles aux effets de cette délétion que les Caucasiens [27]. Elle est recherchée en étudiant les marqueurs sY1291 et sY1191.

Du palindrome P5 à la partie distale de P1 ou de P4 à la partie distale de P1, l'absence des quatre marqueurs (sY127, sY134, sY254 et sY255) est synonyme de délétion complète d'AZFbc. Pour préciser les limites exactes, la recherche de sY116 est indiquée. En effet, il est présent lorsque la délétion s'étend de P4 à P1 distal, et absent s'il s'agit d'une délétion de P5 à P1 distal. L'intérêt de cette distinction est pronostique car l'atteinte P5/P1 distal est plus délétère et les probabilités de retrouver des spermatozoïdes lors d'une biopsie testiculaire d'autant plus faibles. Le marqueur de l'hétérochromatine sY160 est aussi recherché pour déterminer la taille de la délétion. En l'absence de ce dernier, un caryotype est recommandé car les délétions terminales sont plus souvent associées à une mosaïque de type 46,XY/45,X or la présence d'une lignée cellulaire 45,X est de mauvais pronostic pour la présence de spermatozoïdes au niveau testiculaire.

Ces analyses sont donc réalisées grâce à une amplification par PCR multiplex permettant la détection des six marqueurs de première intention. Les produits obtenus sont ensuite séquencés par la méthode de Sanger puis les séquences sont interprétées à l'aide du logiciel GeneMapper®. Chaque patient est comparé aux témoins afin de pouvoir interpréter les résultats. Un marqueur présent est représenté par un pic de fluorescence en fonction de la taille du fragment amplifié (Figure 11).



	TH	180101
SY255	122.97	
SY127	273.48	
SY134	303.13	
SY86	317.18	317.26
SY84	328.43	328.53
SY254	381.42	
SY1191	386.49	
SRY	464.79	464.76
ZFY	491.52	491.32
SY1291	530.57	

Absence de sY127-134-254-255-1191-1291

Délétion AZF bc

A FAIRE 2 eme INTENTION sY105-Y121-Y143-Y153-Y116-160

Figure 11 Mise en évidence d'une microdélétion AZFbc chez un patient grâce au logiciel GeneMapper®

Absence de pic correspondant aux marqueurs sY127, sY134, sY254, sY255

Nécessité d'une analyse des marqueurs de seconde intention pour borner précisément la délétion.

Les microdélétions du chromosome Y, retrouvées dans l'azoospermie non obstructive, n'expliquent pas les étiologies obstructives. D'autres anomalies géniques sont responsables d'infertilité masculine, en particulier l'atteinte du gène *CFTR*.

## b. CFTR

### (1) Épidémiologie

Le locus du gène *CFTR* a été décrit pour la première fois en 1985 et sa séquence nucléotidique identifiée en 1989 [28]. Il est situé sur le locus 7q31.2 (bras long du chromosome 7). Il s'agit d'un gène de petite taille de 190 kilobases (kb) comportant 27 exons. L'ARN messager mesure 6,5 kb et code pour la protéine CFTR.

Cette protéine transmembranaire, appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), est constituée de 1480 acides aminés. C'est un canal ionique localisé au pôle apical des cellules épithéliales de différents tissus notamment des voies respiratoires, du pancréas et du tractus génital. Elle comporte cinq domaines fonctionnels (Figure 12) :

- Deux domaines hydrophobes transmembranaires « Membrane-Spanning Domains » (MSD1 et 2) formant le canal et comportant chacun six segments transmembranaires en hélice alpha
- Deux domaines hydrophiles d'interaction avec les nucléotides et de liaison à l'ATP « Nucleotide-Binding Domain » (NBD1 et 2)
- Un domaine régulateur (R Domain ou Regulatory Domain) contenant plusieurs sérines phosphorylables par les protéines kinase A et C [29] et de nombreux résidus chargés. Ce domaine relie les deux motifs (hydrophile + hydrophobe).

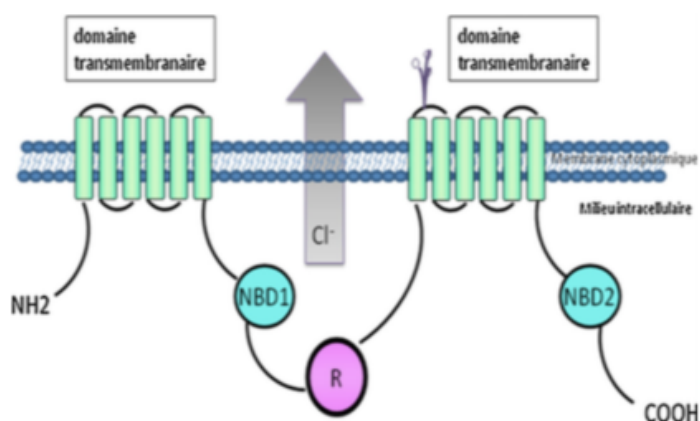


Figure 12 Schéma de la protéine CFTR composée de deux domaines transmembranaires MSD, deux domaines NBD et un domaine régulateur R [30]

La mucoviscidose est la maladie monogénique traduisant l'atteinte la plus sévère du gène *CFTR*. Elle se transmet sur le mode autosomique récessif. Il faut donc la présence de deux mutations pour que la pathologie s'exprime. C'est la maladie génétique grave de l'enfant la plus fréquente dans la population caucasienne. On estime en France, qu'un individu sur 30 est porteur sain, c'est-à-dire ne présentant qu'une mutation et donc asymptomatique. D'après le registre français de la mucoviscidose, en 2016, 7000 personnes étaient atteintes de la mucoviscidose dans la population française dont 200 nouveaux diagnostics posés chaque année.

Par sa fréquence et sa gravité, la mucoviscidose est intégrée depuis 2002 dans le dépistage néonatal réalisé chez tous les nouveau-nés à trois jours de vie. Il consiste à doser la trypsine immuno-réactive à partir de sang de talon déposé sur papier buvard. Si la valeur est supérieure à 60 µg/L, une recherche des 29 mutations les plus fréquentes du gène *CFTR* en France est indiquée. Il s'agit d'un test de dépistage par biologie moléculaire. Si le nourrisson est homozygote ou hétérozygote composite, le diagnostic est posé. Une consultation d'annonce aura lieu afin d'expliquer la pathologie aux parents puis des examens complémentaires seront prescrits pour évaluer le retentissement de la maladie. Le suivi sera organisé par le Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) pédiatrique avec examens cliniques, biologiques et radiologiques. Si une seule mutation est identifiée, le nourrisson sera également adressé à un CRCM pour effectuer un test de la sueur. En cas de valeur augmentée (supérieure à 60 mmol/L), la recherche d'une seconde mutation sera réalisée par un laboratoire référent.

## (2) Clinique [31]

La mucoviscidose présente différents degrés de sévérité selon le type de mutations identifiées. En l'absence de protéine CFTR fonctionnelle, les sécrétions sont anormalement visqueuses, conduisant à l'accumulation des fluides dans différents épithélia de l'organisme.

Dans sa forme la plus sévère, la maladie s'exprime très tôt dans l'enfance. Des signes anténatals peuvent même orienter le diagnostic. En effet, en échographie, il peut exister une hyperéchogénicité intestinale, des calcifications ainsi que des images évoquant une atrésie de l'intestin grêle. Si le diagnostic est retenu, devant le caractère grave et incurable de la maladie, les parents peuvent faire une demande d'interruption médicale de grossesse.

Le diagnostic est clinique et intègre en examen de première intention le test de la sueur. La pathologie étant liée à un défaut de la protéine CFTR qui est un canal chlore, le test consiste à doser les ions chlorures recueillis dans la sueur. Une valeur supérieure à la normale (60mmol/L) associée à un faisceau d'arguments cliniques conduit au diagnostic positif.

Dans l'enfance, la maladie se manifeste le plus souvent par une cassure de la courbe staturo-pondérale ainsi que des difficultés respiratoires comme une toux chronique, des bronchites à répétition. Le principal risque est la surinfection bactérienne ainsi que la colonisation des voies respiratoires par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ou le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus* contribuant à la dégradation de la fonction respiratoire (diminution du volume expiratoire maximal au cours de la première seconde (VEMS)). Des troubles digestifs sont également fréquemment observés tels qu'un iléus, une invagination intestinale, des diarrhées chroniques ou une stéatorrhée.

Plus tard, d'autres atteintes peuvent s'installer, notamment une insuffisance pancréatique ainsi qu'un diabète insulino-dépendant par fibrose du pancréas. Les hommes atteints sont infertiles dans 98% des cas secondairement à la régression des canaux déférents.

A côté de l'atteinte la plus sévère, il existe des atteintes monosymptomatiques liées à des génotypes particuliers, responsables d'un phénotype moins sévère. On retrouve dans ces génotypes certaines mutations du gène *CFTR* dites *CFTR-RD (related disorder)* qui n'entraînent jamais de mucoviscidose.

Ces atteintes monosymptomatiques peuvent correspondre, dans les deux sexes, à une dilatation des bronches ou à une pancréatite, chez les hommes à une agénésie bilatérale des canaux déférents. Elles ne peuvent se révéler qu'à l'adolescence ou à l'âge adulte.

Les hommes consultant pour une infertilité isolée ignorent la plupart du temps la présence de ces mutations ainsi que leurs répercussions sur le spermogramme. Bientôt, les jeunes hommes dépistés depuis 2002, connaissant leur statut hétérozygote pour une mutation sévère dite *CF (Cystic Fibrosis)*, pourront être amenés à consulter pour infertilité.

Le tableau typique comprend une absence bilatérale des canaux déférents à la palpation lors de l'examen andrologique mais il est possible de palper des cordons fibreux ou un canal non perméable. Une atteinte du gène *CFTR* peut aussi conduire à une absence unilatérale d'un canal déférent [32]. Le volume testiculaire est conservé. Les échographies scrotale et endorectale attestent de l'absence des déférents ainsi que des vésicules séminales. En effet, lors du développement embryonnaire, le canal mésonéphrotique (ou canal de Wolff) dérivé de la partie distale du mésonéphros, sous l'influence de la testostérone est à l'origine du canal déférent, des vésicules séminales, du canal éjaculateur et du corps et de la queue de l'épididyme [33]. La tête provient quant à elle des tubules mésonéphrotiques [34]. C'est la raison pour laquelle le corps de l'épididyme est atrophié ou absent mais la tête est présente. Au niveau biologique [35], le spermogramme retrouve une azoospermie d'allure obstructive avec un pH acide inférieur à 7,2 résultant de l'absence des vésicules séminales car les sécrétions provenant de ces dernières ont un pH alcalin. L'hypospermie, c'est-à-dire, un volume d'éjaculat inférieur à 1,5mL, est en général très marquée, le volume étant rarement supérieur à 1mL. Ceci traduit également l'absence des vésicules séminales. En effet, le plasma séminal est constitué à près de 70% de sécrétions de ces dernières. Sur l'analyse biochimique effectuée sur le liquide séminal, la cause de l'effondrement du fructose est la même que pour l'acidité et l'hypospermie. L' $\alpha$ -glucosidase neutre sécrétée par l'épididyme est quant à elle

effondrée en raison de l'absence des canaux déférents qui crée une rupture de communication avec les canaux éjaculateurs et donc l'absence de l'enzyme dans l'éjaculat. La valeur du zinc, reflet des sécrétions de la prostate, est normale.

L'assistance médicale à la procréation est donc un élément primordial de la prise en charge des hommes atteints de mucoviscidose car 98% d'entre eux présentent une infertilité par azoospermie obstructive liée à une agénésie bilatérale des canaux déférents. De plus, grâce aux avancées médicales, l'espérance de vie de ces patients a considérablement augmenté, c'est la raison pour laquelle ils sont de plus en plus nombreux à consulter parmi les couples en désir d'enfant.

Les avancées dans le traitement de la mucoviscidose sont essentiellement dues actuellement aux thérapies ciblant les formes mutées de la protéine CFTR. Les nouvelles molécules utilisées ou modulateurs, développées par Vertex Pharmaceuticals, sont de deux types : les potentiateurs (Ivacaftor) permettant une ouverture du canal chlore et les correcteurs (Lumacaftor, Tezacaftor) améliorant la maturation et le transport de la protéine. Les associations Ivacaftor-Lumacaftor (Orkambi®) ou Ivacaftor-Tezacaftor (Symkevi® en France et Symdeko® aux États-Unis) sont efficaces pour les patients homozygotes F508del. Il n'y a pas de différence d'efficacité mais seulement une meilleure tolérance de la deuxième association qui peut être utilisée en présence d'une mutation c.1521\_1523delCTT (F508del) et d'une mutation dite « fonction résiduelle ». Des correcteurs de seconde génération sont actuellement testés en essai clinique de phase III pour être intégrés à une trithérapie comportant l'association Ivacaftor-Tezacaftor. Cette trithérapie permettrait un élargissement de l'accessibilité aux traitements et pourrait être initiée pour 90% des patients.

### (3) Analyse moléculaire

Pour réaliser une analyse moléculaire du gène *CFTR* dans le cadre d'une infertilité masculine, les critères clinico-biologiques cités ci-dessus sont requis. En effet, le gène est incriminé dans 80% des cas dès lors qu'un patient possède l'ensemble du tableau typique d'ABCD.

On dénombre plus de 2000 mutations connues du gène *CFTR*. Elles sont répertoriées dans la Cystic Fibrosis Mutation Database ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)). La classification [36] actuellement admise les répartit en six classes selon le niveau de l'atteinte de la protéine (Figure 13 [37]). Un patient atteint de mucoviscidose est soit homozygote pour une mutation CF, soit hétérozygote composite pour deux mutations sévères. Dans le cas d'une agénésie bilatérale des canaux déférents, l'association d'une mutation sévère avec un variant *CFTR*-RD ou de deux variations *CFTR*-RD est généralement retrouvée.

La classe I comprend des mutations non-sens, d'épissage et des mutations entraînant des décalages du cadre de lecture. Elles conduisent à un défaut de transcription de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) en Acide Ribonucléique (ARN) messager qui peut soit être absent soit être responsable d'une protéine tronquée qui sera dégradée [38]. Il s'agit de mutations responsables d'un phénotype sévère.

La classe II regroupe des mutations faux-sens et des délétions. La plus connue et la plus fréquente dans la population caucasienne est la mutation c.1521\_1523delCTT ou Phe508del, avec une fréquence de 70%. La délétion de l'acide aminé Phénylalanine conduit à une mauvaise conformation de la protéine et donc à une dégradation par le réticulum endoplasmique, cela aboutit à un nombre très réduit de protéines fonctionnelles au pôle apical des cellules.

La classe III est composée de mutations faux-sens provoquant un défaut d'activation de l'ouverture du canal chlore par inhibition de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP ou phosphorylation du domaine R. La mutation la plus connue de cette classe est la mutation c.1652G>A ou Gly551Asp.



Les mutations de la classe IV sont également des mutations faux-sens atteignant la conductance avec une diminution du flux ionique. La sévérité du tableau est variable.

Des mutations d'épissage ou du promoteur constituent la classe V. Elles sont responsables d'une diminution du nombre de transcrits, par conséquent d'une baisse de la synthèse de protéines CFTR fonctionnelles et donc d'un nombre réduit de protéines à la membrane apicale des cellules.

La classe VI, constituée de mutations faux-sens, conduit à une diminution de la stabilité de la protéine et donc à un turnover accéléré des protéines à la surface cellulaire et par conséquent à une quantité diminuée ou à une altération de la régulation des autres canaux ioniques.

Les trois premières classes aboutissent à un phénotype sévère de la maladie, les autres sont de sévérité variable.

En France, le réseau CFTR-France alimente la base de données CFTR-France qui répertorie les variants pathogènes du gène *CFTR* en précisant le phénotype. Il s'agit d'une collaboration de 9 laboratoires français, dont le CHU de Bordeaux, avec un haut niveau d'expertise dans l'analyse du gène.

Afin de classer les variants, des classifications sont proposées par des sociétés savantes notamment anglaise (Association for Clinical Genomic Science) et américaine (American College of Medical Genetics and Genomics). Elles établissent un degré de pathogénicité en fonction de différents paramètres tels que la fréquence du variant, les prédictions des logiciels ou bien encore les tests fonctionnels. Classiquement, les classifications comportent 5 groupes de variants: pathogène, probablement pathogène, de signification incertaine, probablement bénin et bénin [39,40].

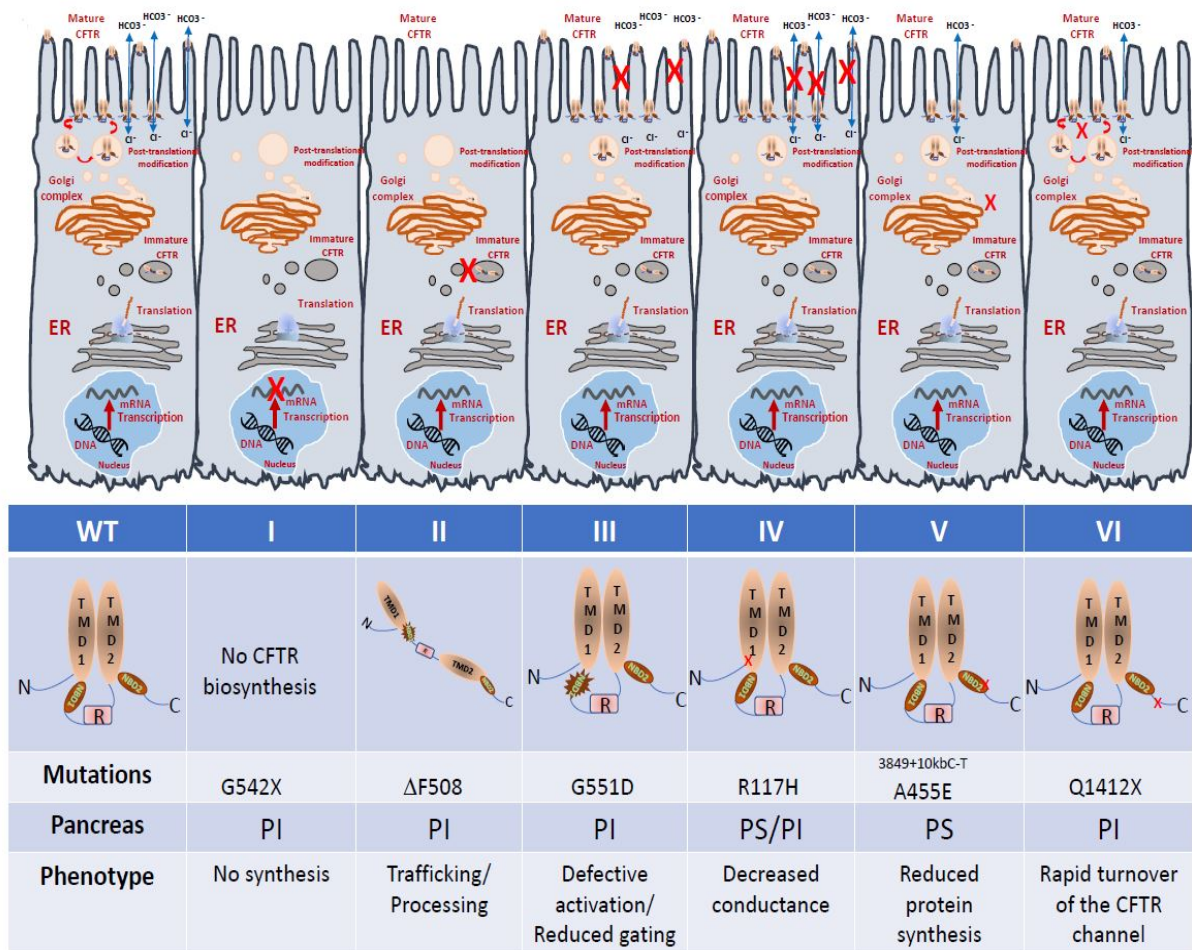


Figure 13 Classification des mutations du gène CFTR allant de I à VI [37]

ER : Endoplasmic Reticulum (Réticulum endoplasmique), WT : Wild Type (Type sauvage)

PS : Pancreatic sufficient (Suffisant pancréatique), PI : Pancreatic insufficient (Insuffisant pancréatique)

Classe I Absence de synthèse de protéine, Classe II Mauvaise conformation de la protéine, Classe III Défaut d'ouverture du canal chlore, Classe IV Diminution de la conductance, Classe V Diminution du nombre de protéines CFTR, Classe VI Diminution de la stabilité de la protéine

Malgré les classifications existantes, certaines mutations peuvent être admises dans différentes classes car interviennent à plusieurs étapes du processus. Ceci a conduit à une classification remodelée [41] prenant en compte l'ensemble des atteintes provoquées par une mutation et ainsi représente les combinaisons possibles des mutations les plus fréquentes (Figure 14).

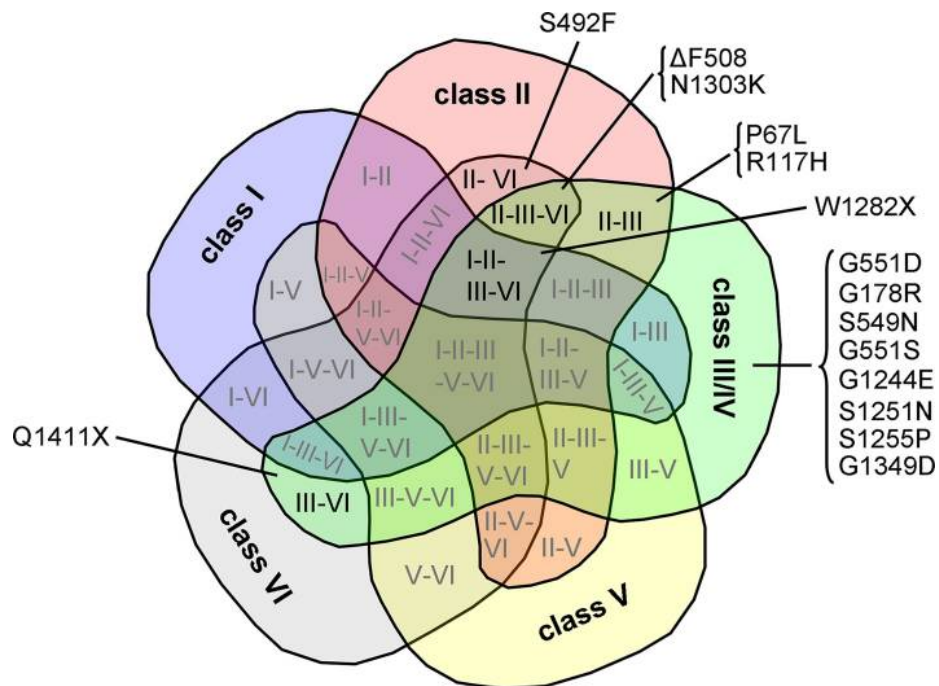


Figure 14 Classification modifiée des mutations du gène CFTR représentant les classes dans lesquelles les mutations peuvent être rangées selon leur mécanisme physiopathologique [41]

En plus des mutations précédemment décrites, une variation particulière, de pénétrance incomplète, est à rechercher. Il s'agit de l'allèle 5T qui est une séquence polymorphe Tn située dans l'intron 9, proche de l'exon 10 pouvant être constituée de 5, 7 ou 9 thymidines. Le nombre de résidus affecte la qualité de l'épissage par modification du site accepteur. Cet allèle est associé à un épissage anormal, ne conservant l'exon 10 que dans 10% des transcrits exprimés. La plupart des protéines produites sont donc non fonctionnelles. L'allèle 5T est considéré comme une forme CFTR-RD et est fréquemment observé dans les ABCD. Associé à un nombre élevé de motifs TG, influençant aussi la qualité de l'épissage par modification de la position du site de branchement, le variant c.1210-34\_1210-6TG[12]T[5] peut être responsable de pathologies liées au gène CFTR [42]. De plus, l'épissage alternatif de l'ARN

messenger est différent d'un tissu à l'autre [43]. Il a été montré que l'épissage de l'ARNm était moins efficace au niveau des canaux déférents que dans les autres épithélia [44]. Ces différences de régulation de l'expression du gène pourraient expliquer la répercussion plus importante de l'allèle 5T sur les canaux déférents et l'absence de signes respiratoires et digestifs. De plus, une anomalie de la protéine CFTR a des conséquences fonctionnelles plus importantes au niveau du tissu génital qu'ailleurs. La variation de l'allèle 5T est en effet responsable d'ABCD alors qu'elle n'est pas impliquée dans la mucoviscidose mais peut être identifiée dans les autres atteintes monosymptomatiques.

Selon les recommandations européennes du guide des bonnes pratiques [45], pour un patient sans antécédent familial de consanguinité, ni de mutation familiale connue du gène de la mucoviscidose, le bilan de première intention consiste à réaliser une recherche ciblée et groupée des 35 mutations les plus fréquentes dans la population européenne grâce à des trousseaux commerciaux, comme INNO-LiPA CFTR composée de deux kits : INNO-LiPA « CFTR-17 » et « CFTR-19 » (cf partie II.B.3.b.(6)). Ils recherchent chacun des mutations différentes ainsi que le nombre de thymidines dans la séquence intronique.

Les mutations recherchées sont les suivantes :

- a) la mutation majoritaire (67%) : p.Phe508del (F508del)
- b) 3 mutations fréquentes (>1%) : p.Gly542X (G542X), p.Asn1303Lys (N1303K), c.1585-1G>A (1717-1G>A)
- c) 10 mutations moins fréquentes (1%-0,4%) : c.579+1G>T (711+1G>T), p.Gly551Asp (G551D), p.Trp1282X (W1282X), p.Arg553X (R553X), p.Ile507del (I507del), c.2657+5G>A (2789+5G>A), c.948del (1078delT), c.2051\_2052delinsG (2183AA>G), p.Arg1162X (R1162X), c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T)
- d) 12 mutations plus rares (0,4%-0,1%) : c.3140-26A>G (3272-26A>G), c.3773dup (3905insT), p.Ser1251Asn (S1251N), c.3528del (3659delC), p.Arg347Pro (R347P), p.Arg334Trp (R334W), c.489+1G>T (621+1G>T), p.Gly85Glu (G85E), c.262\_263del (394delTT), p.Arg117His (R117H), p.Glu60X (E60X), p.Ala455Glu (A455E)
- e) 9 mutations beaucoup plus rares (<0,1%) : p.Gln552X (Q552X), p.Arg560Thr (R560T), c.1766+1G>A (1898+1G>A), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.3067\_3072del (3199del6), c.2052del (2184delA), c.2012del (2143delT), c.579+1G>T (711+5G>A), c.54-5940\_273+10250del (CFTRdele2,3)

L'origine géographique des patients est également prise en compte grâce à l'établissement d'un arbre généalogique faisant apparaître les parents et grands-parents ainsi que leur région ou pays d'origine. En effet, quelques mutations ont une fréquence particulièrement élevée dans certains groupes ethniques. C'est notamment le cas en France de deux mutations retrouvées dans la population réunionnaise (c.2989-449\_3468+644del et c.366T>A), d'une mutation en Bretagne (c.2537G>A) ou celle du Sud-Ouest (c.1680-886A>G). D'autres

mutations sont aussi à rechercher en fonction des autres pays d'origine. Pour cela, d'autres kits peuvent être utilisés. A titre d'exemple, le kit INNO-LiPA « CFTR délétions + 6 » recherche huit délétions et six mutations ponctuelles dont certaines sont fréquentes en Turquie ou en Afrique du Nord. D'autres mutations peuvent être recherchées par séquençage Sanger en analysant les exons concernés.

L'interprétation des bandelettes du kit INNO-LiPA (Figure 15) s'effectue en vérifiant en premier lieu le bon fonctionnement de la technique. Pour cela, il suffit de constater la présence de la bande contrôle synonyme de réussite. Les différentes mutations figurent sur la partie supérieure de la bandelette et les allèles non mutés sur la partie inférieure.

Lorsque toutes les bandes de la partie inférieure sont présentes et qu'il n'y en a aucune au-dessus, cela signifie l'absence des mutations recherchées. L'analyse est négative.

Lorsqu'il existe une ou deux mutations, les bandes correspondantes sont présentes dans la partie supérieure. Si les bandes des allèles sauvages sont aussi présentes alors le patient est hétérozygote pour cette ou ces mutations. En revanche, s'il n'y a pas de bande de l'allèle sauvage, le patient est homozygote pour la mutation.

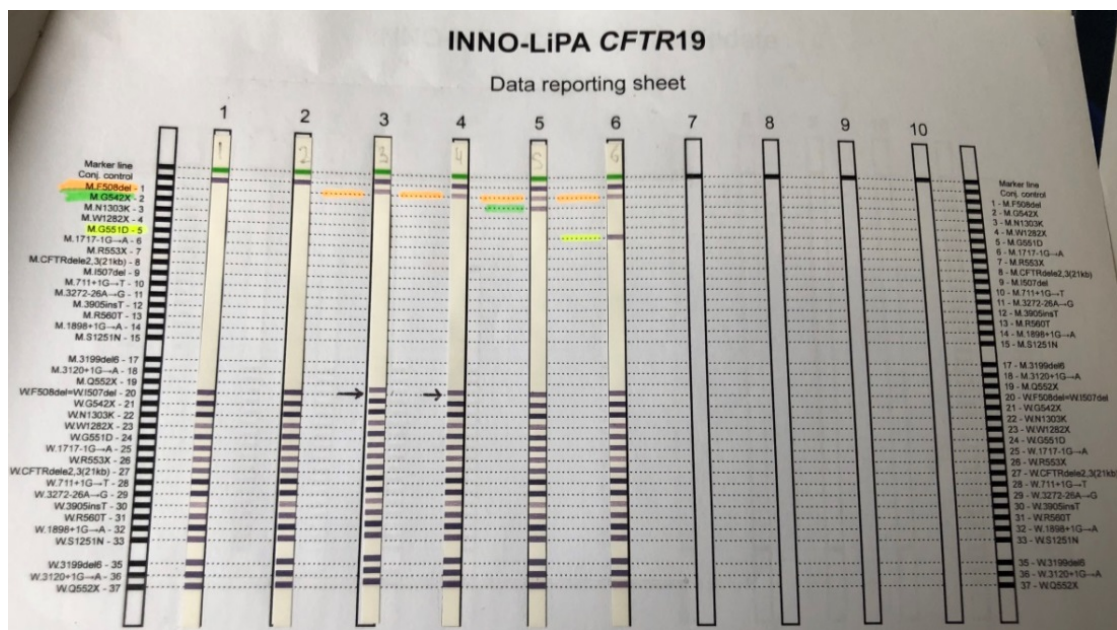


Figure 15 Exemple de bandelettes positives du kit INNO-LiPA

Présence d'une bande à hauteur de la mutation ou de l'allèle sauvage détecté  
 Profil hétérozygote pour la mutation F508del (orange) pour les patients 3 et 4  
 Profil hétérozygote composite F508del (orange) et G542X (vert) pour le patient 5  
 Profil hétérozygote composite F508del (orange) et G551D (jaune) pour le patient 6

Les 35 mutations recherchées en première intention représentent plus de 83% de l'ensemble des mutations dites CF (Cystic Fibrosis) en France, c'est-à-dire responsables de mucoviscidose.

En l'absence de mutation, si la suspicion est forte ou les origines multiples, il peut être décidé de réaliser un séquençage de nouvelle génération (NGS). Le NGS, en analysant les séquences codantes et les jonctions exon-intron sous forme d'amplicons, permet de détecter 97% des mutations du gène *CFTR*. Pour pouvoir interpréter la séquence, la profondeur doit être au moins égale à 30X (Cf page 64). Le NGS est toujours couplé au séquençage du promoteur. Au CHU de Bordeaux, il a été décidé d'utiliser un design de 102 amplicons de 200 paires de bases chacun pour couvrir la partie codante du gène.

En dernier recours, une analyse chromosomique sur puce à ADN (CGH array) peut être réalisée. Elle permet de mettre en évidence des grands réarrangements. En association avec le NGS, la couverture est de l'ordre de 98%.

A la fin des analyses, si aucune mutation n'est retrouvée, un risque résiduel est calculé à partir du théorème de Bayes qui tient compte du taux de couverture de mutations CF de la technique utilisée ainsi que de la fréquence d'hétérozygotie dans la population d'origine des patients.

#### (4) Exploration fonctionnelle de variants : étude des ARN messagers

Lorsque de nouveaux variants sont découverts, il est difficile de connaître leur degré de pathogénicité. Outre les outils bio-informatiques de prédiction, il est possible de réaliser une exploration fonctionnelle en étudiant les ARN messagers issus de cette variation afin d'en déterminer sa signification. Dans le cadre de l'étude de certains variants exoniques potentiellement pathogènes par effet d'épissage de l'ARN CFTR, un travail a été effectué en collaboration avec plusieurs équipes de génétique moléculaire de différents groupes hospitaliers, dans le cadre d'un projet financé par l'association Vaincre La Mucoviscidose. Il a consisté à évaluer l'impact fonctionnel de ces variants sur l'expression du gène au niveau de l'ARN et de la protéine. L'épissage a été tout d'abord analysé par construction de minigènes. Un minigène correspond à la partie minimale d'un gène nécessaire à l'expression du gène. Il comprend dans cette application, un intron contenant les régions consensus d'épissage à la jonction de deux séquences exoniques provenant d'un gène autre que *CFTR*, l'exon du gène *CFTR* portant la variation d'intérêt et les séquences introniques *CFTR* qui le bordent introduites au sein de cet intron par clonage. Cette stratégie de biologie de synthèse permet de mettre en évidence les conséquences de la variation sur la reconnaissance des sites d'épissage par la machinerie cellulaire après transfection du minigène dans une lignée cellulaire. La 2<sup>ème</sup> approche a été la quantification du taux de transcrits par RT-PCR quantitative après transfection de plasmides contenant les versions sauvages et mutées de *CFTR* dans une lignée cellulaire n'exprimant pas *CFTR*. La fonction protéique a été étudiée par Western Blot et immunofluorescence et l'activité du canal a été mesurée par patch-clamp. Ces analyses permettent d'établir la pathogénicité d'un variant et de confirmer ou d'infirmer les prédictions des logiciels mais ne sont pas encore utilisées en routine à Bordeaux.

### c. *ADGRG2*

#### (1) Épidémiologie

Dans 80% des cas, des mutations du gène *CFTR* sont responsables de l'azoospermie liée à l'agénésie bilatérale des canaux déférents. Vingt pour cent restent d'origine inconnue.

L'équipe lilloise de génétique moléculaire en collaboration avec le CHU de Toulouse s'est intéressée à des gènes candidats potentiellement impliqués dans le phénotype d'ABCD. C'est la raison pour laquelle, ils ont réalisé une étude [46] reprenant les données des patients présentant une azoospermie dont l'indication initiale était une agénésie bilatérale des canaux déférents. Ils ont éliminé les patients porteurs de mutations *CFTR* ainsi que tous ceux ne répondant pas aux critères cliniques et biologiques d'ABCD. Après avoir séquencé en whole exome, un gène a retenu l'attention.

Il s'agit du gène *ADGRG2*, situé sur le bras court du chromosome X, au locus Xp22.13, composé de 32 exons, codant pour la protéine ADGRG2, protéine d'adhésion G couplée au récepteur G2. Cette protéine est composée de sept domaines transmembranaires ainsi que d'un domaine intracellulaire et un extracellulaire. Il existe des complexes de protéines ADGRG2-CFTR au niveau des cellules non ciliées de l'épithélium testiculaire, qui permettent de stimuler l'activité du canal chlore par l'intermédiaire des protéines G et de maintenir un pH stable.

Il a été montré que ce gène est exprimé spécifiquement dans les canaux efférents, lieu où la plus grande partie du liquide testiculaire transportant les spermatozoïdes immatures est réabsorbée. L'implication du gène dans le processus de réabsorption a été fortement suggérée chez la souris [47]. En effet, les souris mutées ont accumulé du liquide dans les testicules avec stase des spermatozoïdes dans les canaux efférents conduisant à un phénotype d'azoospermie obstructive.



## (2) Clinique

Les patients porteurs d'une mutation du gène *ADGRG2* ont le même tableau phénotypique que ceux présentant des atteintes du gène *CFTR* [46]. Il s'agit donc d'une azoospermie d'allure obstructive avec un pH acide, une hypospermie au spermogramme. La biochimie séminale retrouve une valeur de fructose effondrée tout comme celle de l' $\alpha$ -glucosidase. Sur le plan clinique, une absence bilatérale des canaux déférents est constatée à la palpation et sur l'échographie scrotale.

Aucune anomalie extra génitale n'a été décrite. Cela s'explique par le fait que le gène est exprimé spécifiquement au niveau testiculaire. Il a été montré par les équipes lilloise et toulousaine que certaines sections des canaux efférents sont élargies et contiennent des spermatozoïdes dans leur lumière. Sur des coupes histologiques de tissu testiculaire, un marquage immunohistochimique avec utilisation d'anticorps dirigés contre la partie N-Terminale et la partie C-Terminale de la protéine *ADGRG2* a permis de mettre en évidence une protéine tronquée chez des patients présentant une agénésie bilatérale des canaux déférents suggérant l'implication de la protéine dans ce phénotype. Le marquage a également révélé l'impact négatif de la protéine tronquée au niveau de l'expression et de la localisation de la protéine *CFTR* sur l'épididyme renforçant l'hypothèse d'un lien étroit entre les deux protéines.

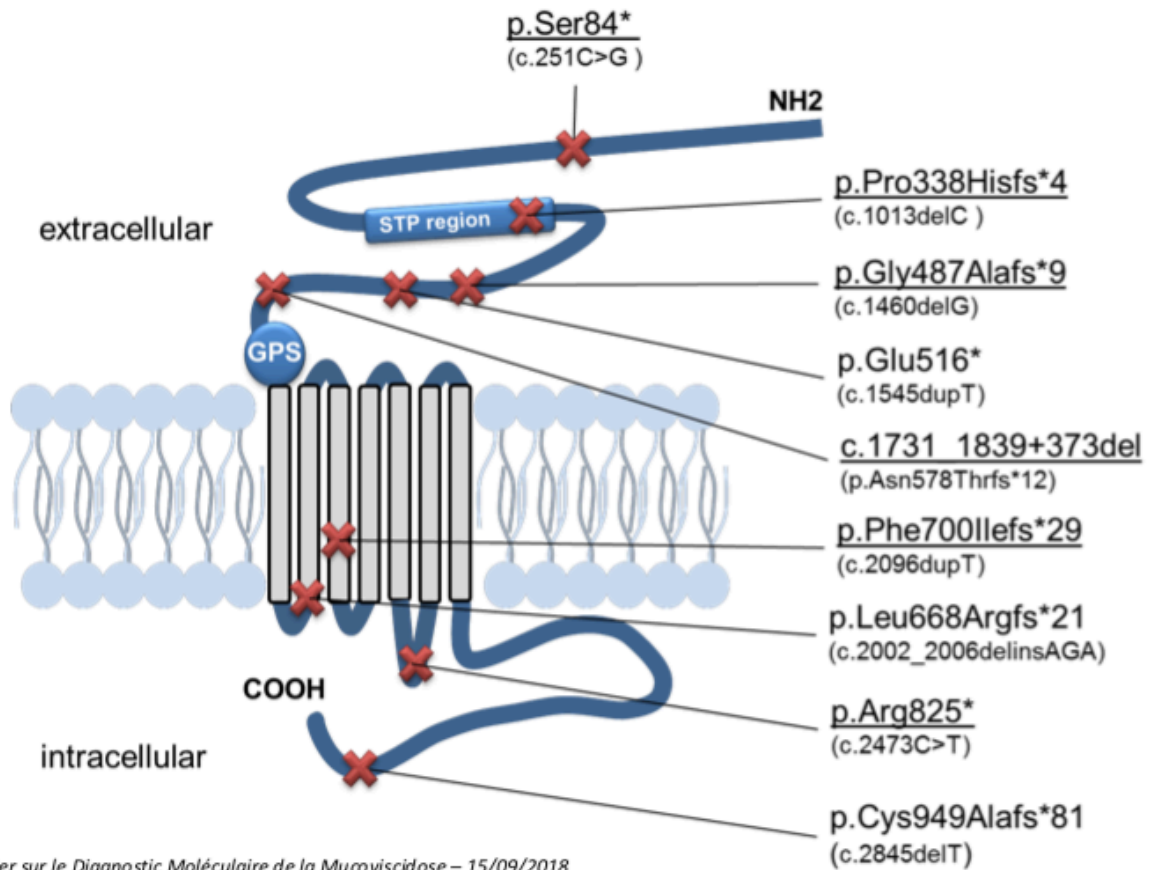
### (3) Analyse moléculaire

Depuis la mise en évidence du gène *ADGRG2* en 2016, le CHU de Lille en collaboration avec l'équipe toulousaine a retrouvé 9 mutations tronquantes (Figure 16) chez des patients ayant le phénotype d'ABCD et non porteurs ou porteurs d'une seule mutation du gène *CFTR* après analyse en NGS. Les patients testés présentaient un tableau similaire, à savoir une clinique et une biologie d'absence bilatérale des canaux déférents. Une échographie rénale permettait d'exclure les patients avec agénésie rénale.

La recherche de mutations du gène *ADGRG2* est effectuée en analyse moléculaire par séquençage ciblé de nouvelle génération par technologie Illumina®.

Les variants hétérozygotes identifiés sont tous responsables d'une protéine tronquée. Ils sont de différents types : délétion, duplication, mutation non-sens. En 2019, une équipe chinoise [48] a aussi travaillé sur *ADGRG2* et a mis en évidence un nouveau variant pathogène, à l'état hémizygote. Il s'agit du variant non-sens C.2452A>T, situé dans l'exon 26 responsable de l'apparition prématurée d'un codon-stop.

## Mutations ADGRG2



Atelier sur le Diagnostic Moléculaire de la Mucoviscidose – 15/09/2018

Figure 16 Localisation des 9 mutations décrites par les CHU de Lille et Toulouse au sein de la protéine ADGRG2 d'après le Dr Pagin du CHRU de Lille

### 3. Techniques

#### *a. Contexte*

Les nouvelles techniques telles que le séquençage de nouvelle génération, le whole exome (étude de l'ensemble des séquences codantes) et plus récemment le whole genome (étude de l'ensemble du génome), ont révolutionné le diagnostic moléculaire en génétique médicale. Il est possible d'identifier de nouveaux gènes candidats responsables d'azoospermie. Cependant, il ne s'agit essentiellement que de projets de recherches. En diagnostic, divers outils permettent la recherche orientée d'anomalies génétiques en fonction des renseignements cliniques.

#### *b. Outils diagnostiques*

##### (1) Caryotype

L'examen génétique de première intention à réaliser lors d'une concentration de spermatozoïdes inférieure à 10 millions par millilitre est le caryotype [49]. Il est recommandé par certains de ne le réaliser qu'à une concentration inférieure à 5 millions de spermatozoïdes par millilitre [50]. Il s'effectue à partir de leucocytes provenant d'un prélèvement veineux sur tube hépariné. Une culture de 48 à 72 heures avec de la lectine à fort pouvoir mitogène permet une stimulation de la croissance des lymphocytes T. Les cellules sont ensuite bloquées en métaphase pour observer les chromosomes. Pour ce faire, la colchicine est ajoutée, elle permet d'inhiber la formation du fuseau mitotique. Les cellules subissent par la suite un choc osmotique permettant de fragiliser les membranes nucléaires et cytoplasmiques et de libérer le matériel chromosomique qui sera fixé, étalé sur une lame en verre puis marqué par différentes techniques. Une coloration au Giemsa permet de classer les chromosomes selon leur taille et leur indice centromérique (rapport de la longueur du bras court (p) sur la longueur totale du bras court et du bras long du chromosome (p+q)). Deux marquages sont

particulièrement utilisés : les bandes R (RHG) obtenues par dénaturation thermique et les bandes G (GTG) obtenues par dénaturation enzymatique ont un contenu spécifique en ADN. La répartition des bandes claires et sombres est spécifique de chaque paire de chromosomes [51]. Les bandes sombres par technique de bandes R sont riches en guanine et en cytosine. A l'inverse, ce sont les régions riches en adénine et en thymine qui sont fortement colorées en bandes G [52].

Les chromosomes sont ainsi analysés et classés.

La résolution d'un caryotype constitutionnel standard est de 5 à 10 mégabases. Afin de valider le caryotype, quinze cellules doivent être analysées ainsi que trois caryotypes établis au minimum. Une résolution minimale de 400 bandes est requise, en cas contraire, le rapport doit le mentionner [53]. Le caryotype permet de détecter des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes.

## (2) Analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA ou CGH array)

L'analyse chromosomique sur puce à ADN, appelée ACPA ou CGH array est utilisée en cytogénétique moléculaire afin de rechercher des remaniements chromosomiques déséquilibrés. Le principe repose sur l'hybridation comparative de deux ADN sur une puce contenant des oligonucléotides appelés sondes. Un ADN témoin marqué par un fluorochrome et l'ADN du patient marqué par un fluorochrome différent sont ajoutés en même quantité et vont s'hybrider sur la puce. Les signaux des fluorochromes sont numérisés. Un ratio d'intensité de fluorescence est réalisé au niveau de chaque sonde permettant de comparer la quantité d'ADN du patient à celle du témoin. Ainsi, à l'aide d'un logiciel d'analyse, les pertes et les gains de matériel chromosomique sont mis en évidence. Il s'agit des variations du nombre de copies (*Copy Number Variation : CNV*). La résolution d'une CGH array est de 1 kilobase [54].

### (3) Amplification par PCR

La PCR conventionnelle est une technique de biologie moléculaire utilisée quotidiennement dans les laboratoires de génétique. L'objectif est l'amplification d'une séquence choisie d'ADN en faible quantité de départ en un très grand nombre de copies *in vitro*. Elle utilise le mécanisme de réplication. Elle sert souvent d'étape dans d'autres méthodes de génétique moléculaire.

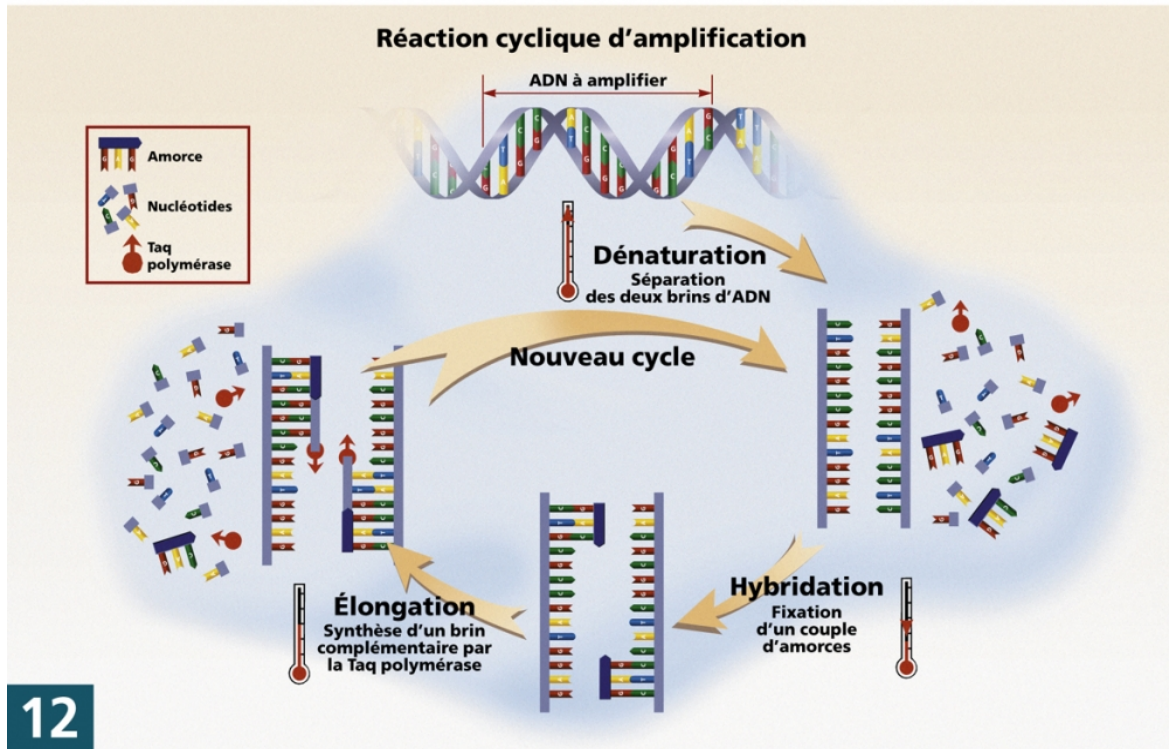
Elle est constituée de cycles dont chaque cycle comporte trois phases (Figure 17). Au préalable, l'ADN de l'échantillon est extrait de manière manuelle ou automatisée. Un mix est préparé, il s'agit d'une solution contenant les différents réactifs nécessaires à la réaction d'amplification : amorces sens et anti-sens, eau « nuclease-free », désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), tampon, cations bivalents ( $MgCl_2$ ), Taq polymerase.

L'échantillon d'ADN est ensuite ajouté à ce mélange. Le tout, placé dans des micro-tubes coniques, est introduit dans le thermocycleur, où a lieu la PCR. Il s'agit d'un bain sec programmable en température et en temps, comportant un bloc chauffant. Chaque série contient un témoin positif et un témoin négatif, servant respectivement de témoin d'amplification et de détection d'une éventuelle contamination.

La première étape consiste en la dénaturation c'est-à-dire la séparation des deux brins d'ADN en chauffant à 95°C. La température élevée permet la cassure des liaisons hydrogènes et par conséquent la séparation de la double hélice en deux simples brins.

Puis, la température diminue entre 40 et 65°C en fonction des amorces choisies présentes dans le mix, spécifiques de la séquence à amplifier. Celles-ci se fixent alors chacune sur un des deux brins en position 3' et s'hybrident avec leur séquence complémentaire. C'est l'étape d'hybridation.

Enfin, à 72°C, l'élongation fait intervenir la Taq polymerase, (ADN polymerase), enzyme permettant l'allongement des amorces en y incorporant les nucléotides complémentaires de la séquence servant de matrice à laquelle elles sont hybridées (d'après le site <http://ed414-openlab.unistra.fr/les-tp/adn-et-genetique-2009-2012/pour-preparer-le-tp/la-pcr-quest-ce-que-cest/> consulté le 19 janvier 2019).



12

Figure 17 Schéma du principe d'un cycle d'amplification

Étapes successives : dénaturation de l'ADN en deux simples brins, hybridation avec fixation des amorces, élongation par la polymérase qui synthétise le brin complémentaire d'après le site <https://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html> consulté le 15 janvier 2019

En théorie, après  $n$  cycles, on récupère  $2^n$  amplicons identiques à la séquence cible. En pratique le rendement d'amplification est de l'ordre de 70%. La lecture de la PCR est dite en point final après 35 à 45 cycles.

Les amplicons obtenus sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le principe repose sur la séparation de fragments d'ADN par migration selon leur taille et la charge électrique sous l'action d'un courant électrique.

Une faible quantité du produit de PCR est mélangée à un tampon de charge coloré afin de faciliter par la suite, le dépôt dans les puits du gel.

Le gel, avec son support, est ensuite déposé dans la cuve d'électrophorèse. Puis le tampon Tris Acétate EDTA (TAE) est versé dans cette même cuve jusqu'à recouvrement du gel. L'ADN étant chargé négativement, va se déplacer vers l'anode chargée positivement. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme étalon.

Après migration, la révélation sous Ultraviolets (UV) permet de valider la PCR. Une photographie du gel est alors réalisée (Figure 18).

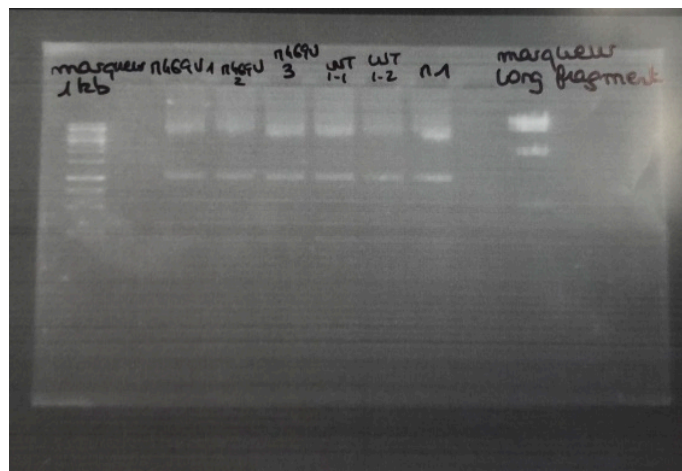


Figure 18 Photographie d'une électrophorèse sur gel d'agarose

Utilisation d'un marqueur de taille d'un kilobase (à gauche) et d'un marqueur d'une plus grande taille (marqueur long fragment à droite), au milieu six échantillons dont l'amplification est correcte (bande présente sur le même niveau pour chaque échantillon)

Il existe des variantes de PCR avec des applications différentes. C'est notamment le cas de la PCR quantitative en temps réel, ou qPCR utilisant le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en point final mais tout au long de la réaction. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Au laboratoire, le SYBR Green est utilisé comme intercalant non saturant de l'ADN double brin. Quand il est incorporé dans l'ADN double brin et excité, il y a alors émission de fluorescence. On mesure donc l'augmentation de fluorescence à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle. Par analyse des Ct (*Threshold cycle* = Cycle à partir duquel la fluorescence est supérieure au bruit de fond, apparaissant en début de la phase exponentielle) obtenus pour



des amplifications simultanées d'une séquence cible et d'une séquence de référence (nombre de copies connu), il est possible de quantifier la séquence cible par rapport à la séquence de référence (Figure 19). La spécificité de la réaction dépend complètement de la spécificité des amorces utilisées. La vérification de cette spécificité est réalisée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température.

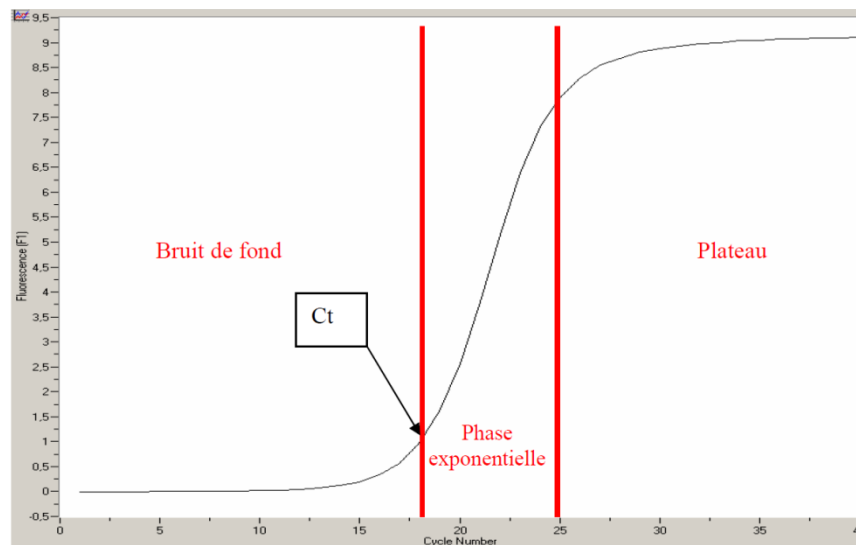


Figure 19 Courbe d'amplification d'une qPCR

*La courbe comporte une phase sans amplification, une phase exponentielle puis un plateau.*

*Le nombre de cycle est représenté en abscisse et la fluorescence en ordonnée. Le Ct ou Threshold cycle correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise soit supérieure au bruit de fond. D'après le site [https://www.institutcochin.fr/core\\_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative](https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative) consulté le 12 mars 2019*

D'autre part, la PCR quantitative en temps réel permet de mesurer la quantité d'ADN initiale présente dans le milieu réactionnel. En effet, la concentration influence la cinétique d'amplification de la réaction. Plus l'ADN initial est en quantité importante, plus le signal fluorescent apparaît tôt.

#### (4) Séquençage Sanger

Le séquençage Sanger permet le séquençage de l'ADN par terminaison de chaîne (d'après le site <https://www.biomnigene.fr/nos-solutions/sanger.html> consulté le 19 janvier 2019). A la fin de la PCR ayant permis d'obtenir les fragments d'intérêt amplifiés, ces derniers sont mis en contact avec des enzymes hydrolytiques notamment une exonucléase pour éliminer les résidus contaminants. Il s'agit d'une méthode de purification post-amplification.

Le principe de séquençage (Figure 20) repose sur la détection de didésoxynucléotides dont la fonction alcool secondaire est réduite en 3'. Ils sont incorporés de manière aléatoire lors de la réplification de la matrice par l'ADN polymérase, ce qui empêche la poursuite de la synthèse par absence de liaison phosphodiester entre ces derniers et le nucléotide suivant, ils sont dits terminateurs de chaîne. Le marquage par des fluorochromes est spécifique de chacun des quatre nucléotides et permet donc leur reconnaissance. On obtient des fragments de différentes tailles qui vont migrer par électrophorèse capillaire à l'intérieur de l'automate dont le schéma se trouve ci-dessous (Figure 21).

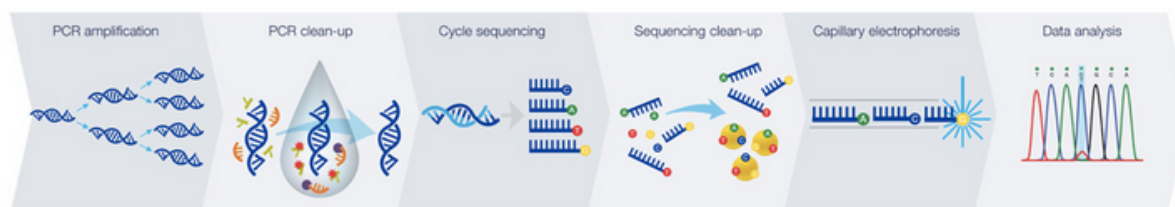


Figure 20 Représentation des étapes de séquençage Sanger

La première étape consiste à réaliser une amplification par PCR, puis cette dernière est purifiée. Les fragments d'intérêt amplifiés sont ensuite séquencés puis de nouveau purifiés. Ils vont alors migrer par électrophorèse capillaire puis les séquences seront analysées par un logiciel. D'après le site <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-workflow.html> consulté le 19 janvier 2019

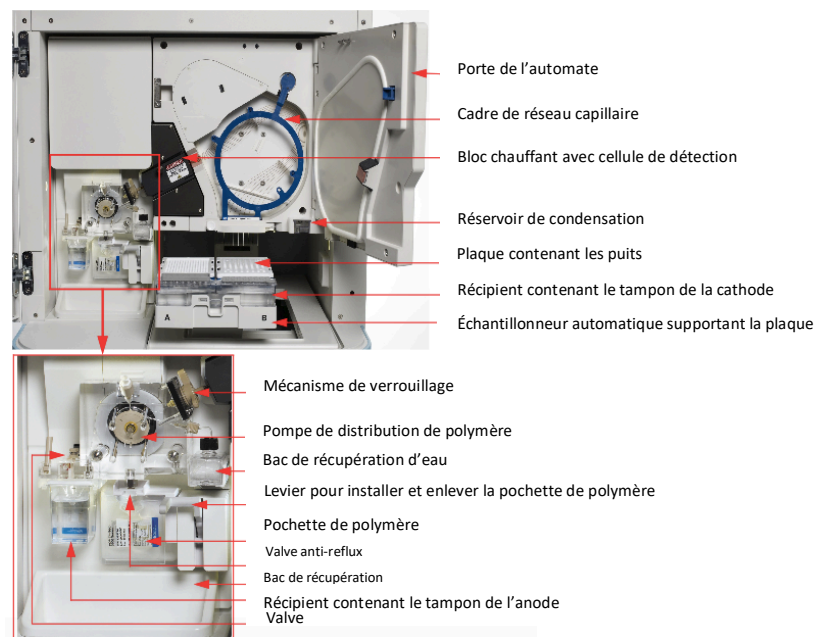


Figure 21 Photographie annotée de l'intérieur de l'automate 3500xL d'Applied Biosystems®

d'après le site <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2F4401661.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogMzUwMC8zNTAweEwgR2VuZXRpYyBBbV uZXRpYyBBbmF5nbGlzaCk=> consulté le 12 mars 2019

Après introduction de la plaque de 96 puits contenant les échantillons, ces derniers vont migrer dans des capillaires. La migration sur un gel à haute résolution permet la distinction entre des fragments différant d'une paire de base. Les séquences obtenues sont analysées grâce au logiciel SeqScape® (Figure 22).

Les deux bases puriques adénine et guanine sont représentées par les lettres A et G, les deux pyrimidiques cytosine et thymine par les lettres C et T. Chaque base possède une couleur permettant une lecture simplifiée. Pour chacun des amplicons, il existe deux séquences : l'une est lue en sens et l'autre en anti sens. Elles sont alignées et comparées à une séquence de référence. Cette comparaison permettra de mettre en évidence la présence d'un variant et de déterminer s'il est à l'état homozygote ou hétérozygote. La base de données est incrémentée par les utilisateurs, dans laquelle sont ajoutés les variants rencontrés. La superposition de deux bases est signe d'une variation à l'état hétérozygote par rapport à la référence.

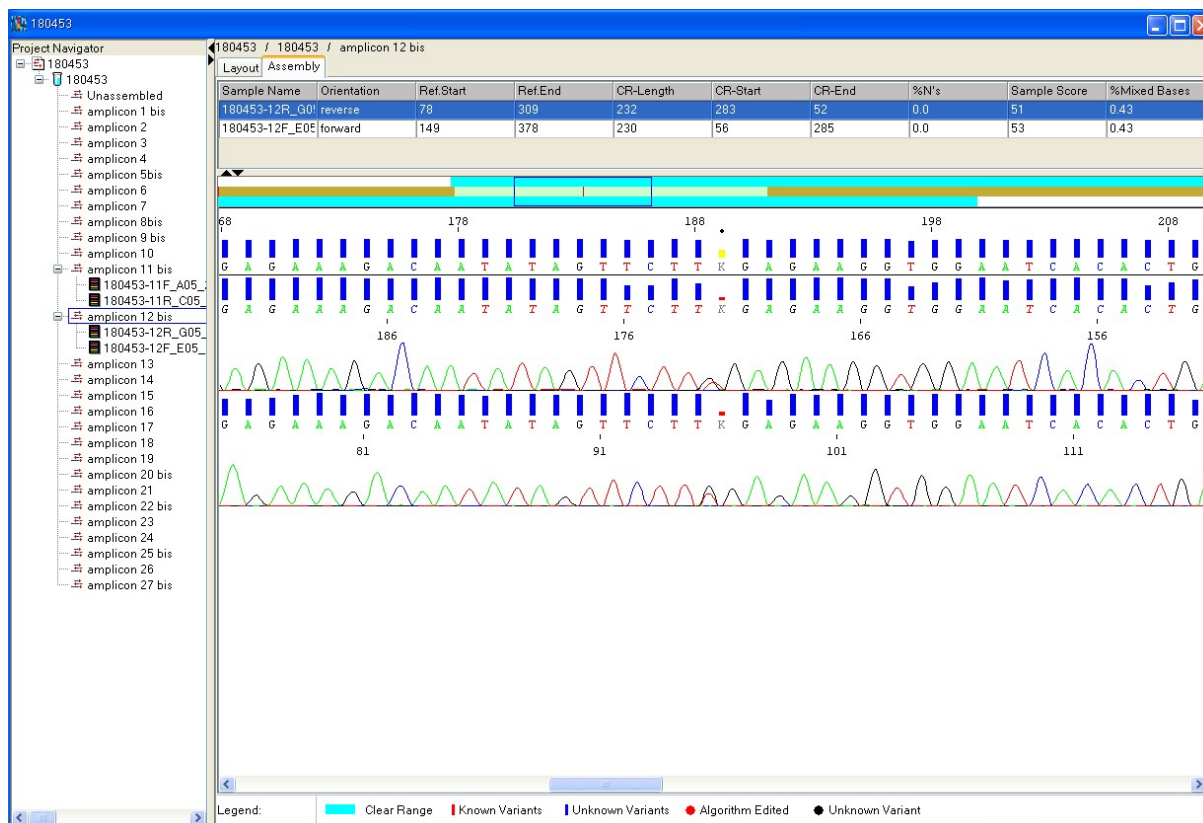


Figure 22 Présence de la mutation c.1624G>T dans l'exon 12 du gène CFTR

Analyse effectuée sur le logiciel SeqScape (ThermoFisher)

La séquence de référence est représentée en haut en sens et anti-sens puis la séquence anti-sens et sens du patient. Chaque pic correspond à un nucléotide A : Adénine (vert), C : Cytosine (bleu), G : Guanine (noir), T : Thymines (rouge) La qualité de la séquence est évaluée avec la hauteur des rectangles, plus il est haut, plus le logiciel est certain du nucléotide.

La séquence de référence est représentée en haut en sens et anti-sens.

Les séquences anti-sens et sens du patient sont situées sous la référence.

En position 189, superposition d'un pic noir et d'un pic rouge sur les deux sens témoin de la présence à l'état hétérozygote de la mutation c.1624G>T

## (5) NGS

Le principe du séquençage de nouvelle génération repose sur deux étapes. La première étape consiste à réaliser un enrichissement de séquences cibles, la seconde à séquencer.

Deux technologies sont principalement utilisées dans le diagnostic génétique de l'infertilité masculine.

### Technologie Ion Torrent™

Il s'agit de la technologie utilisée au laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux, couplée à la technique d'enrichissement en séquences cibles Ion AmpliSeq™. ((d'après le site <http://www.biorigami.com/?tag=principe-ion-torrent-pgm> consulté le 19 janvier 2019). La technique permet un séquençage rapide de plusieurs patients simultanément par multiplexage d'amplicons et d'ADN des différents patients testés.

La première étape est la réalisation d'une librairie par amplicons. Les ADN à séquencer, préalablement extraits, sont mis en contact avec les couples d'amorces spécifiques des régions d'intérêt ainsi que les réactifs nécessaires à la PCR. En fonction du nombre de couples d'amorces, le nombre de cycles de PCR varie. Plus il y a d'amorces, moins le nombre de cycles est important car le risque d'interférences augmenterait avec le nombre de cycles. Une fois l'amplification effectuée, les amorces sont digérées partiellement par méthodes physico-chimiques (enzymatique et thermique) permettant la ligation de deux adaptateurs : A et P1 par l'intermédiaire d'une ADN ligase. La séquence commune P1 contient une séquence complémentaire d'amorce permettant l'amplification puis la fixation des amplicons sur les sphères « Ion Sphere Particles » (ISPs). La séquence A contient le « barcode » (correspond à une petite séquence de 6 ou 8 bases permettant de multiplexer plusieurs échantillons lors du séquençage), et une séquence complémentaire d'amorce permettant l'amplification. Une étape de purification a ensuite lieu. La librairie est monitorée sur puce pour évaluer la taille moyenne des fragments par système d'électrophorèse microfluidique de la TapeStation™ afin de déterminer la concentration molaire de la librairie. Des dilutions sont effectuées afin

d'obtenir des amplifiats en concentration équimolaire pour favoriser le ratio 1/1 (fragment d'ADN/ ISP) dans l'automate Ion Chef™.

L'étape suivante est une amplification de la librairie lors d'une PCR en émulsion (mélange d'eau et d'huile) (emPCR) permettant d'atteindre un seuil de détection du signal nécessaire au moment du séquençage. Dans une goutte, un amplicon et une bille « Ion Sphere Particle » sont capturés, il y a alors amplification clonale de cet amplicon dans un microréacteur à la surface de la sphère. D'autres configurations non souhaitées sont générées et seront filtrées lors de l'analyse bio-informatique (Figure 23).

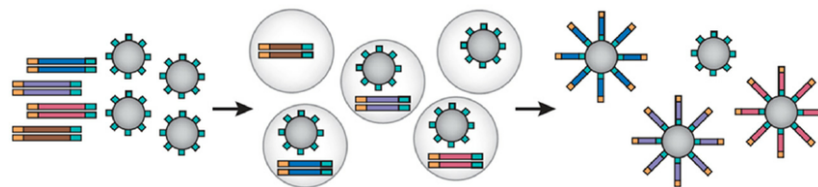


Figure 23 Principe de l'amplification d'une librairie en émulsion

Les différents amplicons sont mis en contact des sphères. Dans le cas d'une réaction normale, les clones d'un même fragment sont incorporés avec une sphère dans une goutte. A la fin de l'amplification, les clones d'un même fragment se trouvent à la surface d'une sphère. D'autres situations d'amplification sont représentées : absence de sphère dans une goutte, sphère seule. Cela aboutit à des sphères sans amplicons à sa surface. D'après le site <http://www.biorigami.com/?tag=principe-ion-torrent-pgm> consulté le 19 janvier 2019

La librairie amplifiée est enrichie en utilisant des billes magnétiques liées à la streptavidine qui permettent d'isoler les sphères avec amplicons et donc l'élimination des sphères vides.

Lors de l'étape de chargement de la puce de séquençage (Figure 24), les ISPs pleines enrichies sont préparées puis hybridées aux amorces de séquençage et liées à une polymérase. Une fois l'étape terminée, la puce chargée est insérée dans un des deux automates de séquençage de nouvelle génération disponibles au laboratoire : PGM™ ou S5 XL.

Le séquençage repose sur la détection d'un proton libéré lors de l'incorporation d'un nucléotide par la polymérase. Ceci aboutit à une variation de pH proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés. Cette variation est détectée au niveau de la couche mince au fond de chaque puits. L'ensemble des données générées est retranscrit sous forme de ionogramme.

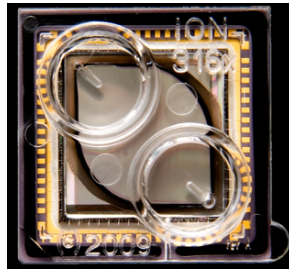


Figure 24 Puce de séquençage

d'après le site consulté le 19 janvier 2019

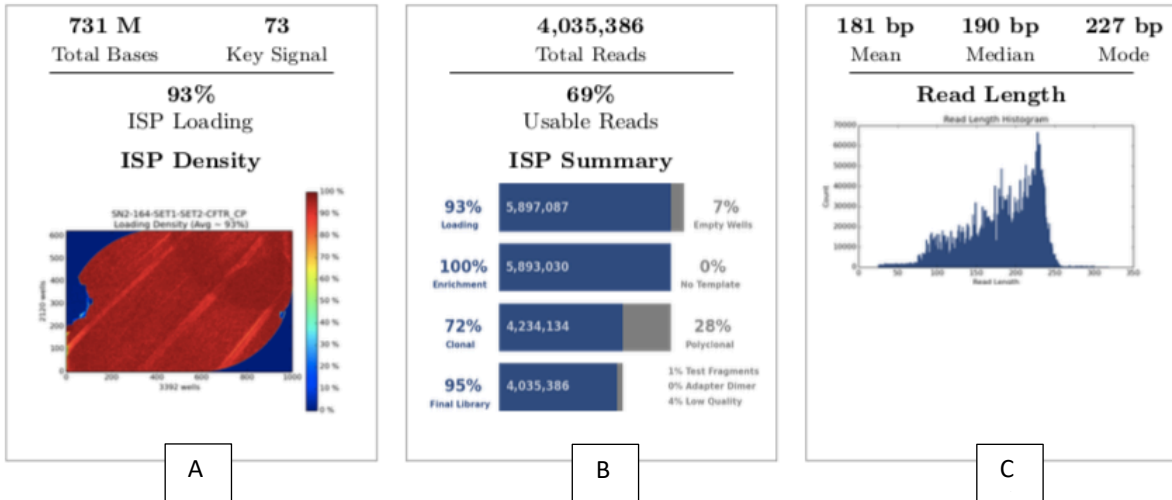
<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/5MethEtudGenFonc/1MethodeSEQUENGAGM/1SEQUENGAGE.hthtm>

La dernière étape est l'analyse bio-informatique. Les données brutes sont sous format fastQ, c'est-à-dire un fichier texte permettant de stocker à la fois des séquences biologiques et les scores de qualité associés. Ces données sont filtrées, les séquences de mauvaise qualité sont retirées. Sont obtenus des fichiers BAM, format binaire de stockage de données de séquences, pouvant être comparés à la séquence du génome de référence sur des logiciels spécifiques (Alamut® Visual par exemple, utilisé dans le laboratoire). Un fichier VCF est généré, reportant les variations nucléotidiques détectées par rapport au référentiel utilisé. Il s'agit des variants et polymorphismes.

Après la fin du run, sur l'interface du Torrent Server™ le rapport de séquençage (Figure 25) est disponible. La vérification des paramètres d'analyse permet de valider la technique afin d'interpréter les séquences.

Pour déterminer la qualité du run, il faut tenir compte du nombre total de bases séquencées, du nombre total de ainsi que de la longueur médiane de ces lectures. Une lecture ou read, correspond à une courte séquence reconnue. Il est également nécessaire de s'intéresser à la densité de chargement de la puce, c'est-à-dire au nombre d'ISP présentes. Dans un second temps, le taux d'alignement par rapport à la référence est regardé.

## Run Summary



## Alignment Summary (aligned to hg19 from zip)

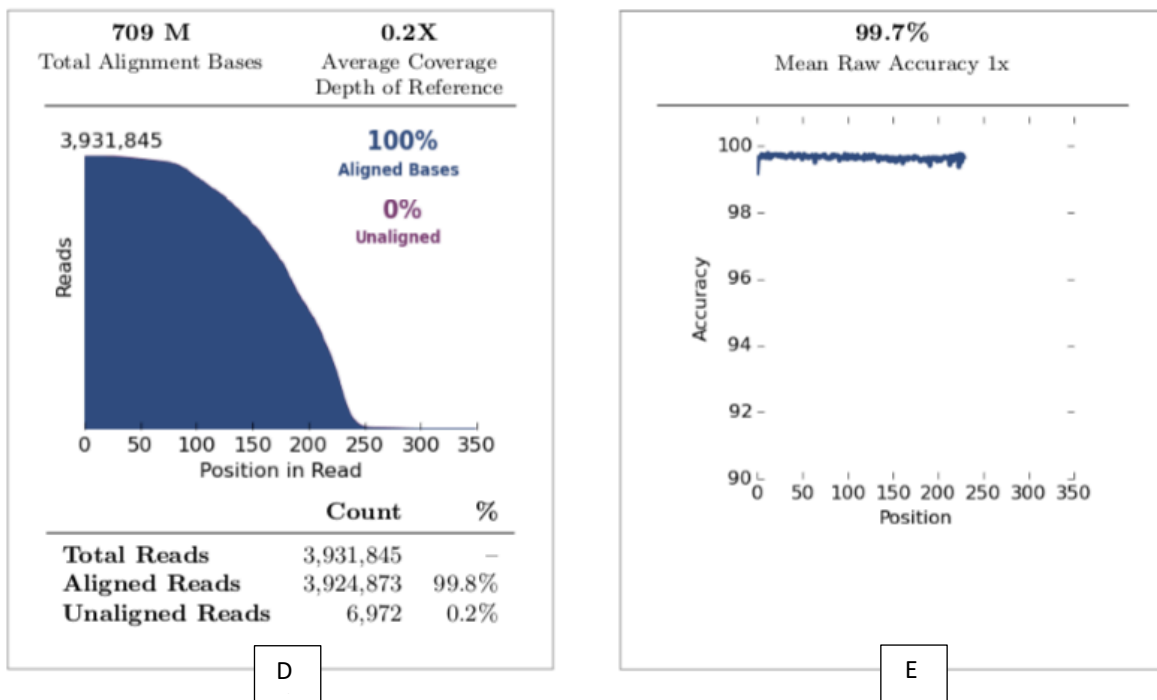


Figure 25 Rapport de run sur Ion Torrent™

- A. Densité de chargement de la puce
- B. Nombre total de lectures avec le nombre de lectures exploitables
- C. Longueur des lectures
- D. Taux d'alignement des bases
- E. Taux moyen de précision



Chaque séquence de patient est ensuite analysée individuellement en téléchargeant le fichier d'alignement (.bam) et le fichier d'appel de variants (.vcf) correspondants sur un logiciel tel qu'Alamut® Visual (Figure 26). Il est important d'évaluer la couverture et la profondeur. La couverture représente la zone couverte par au moins un read, elle est exprimée en pourcentage. La profondeur, quant à elle, correspond au nombre de lectures de chaque base, son unité est l'X.

L'interprétation des variations s'effectue grâce à des bases de données ainsi que des logiciels de prédiction.



Figure 26 Présence de la mutation c.1521\_1523delCTT sur l'exon 11 du gène CFTR sur le logiciel Alamut® Visual

La séquence du patient (en bas) est comparée à la séquence de référence. Les rectangles de couleur représentent les mutations ou variants référencés dans des bases de données (HGMD, ClinVar). Trois nucléotides (CTT) sont manquants au sein (barre rouge) des lectures correspondant aux brins d'ADN sens et anti-sens (bandes bleues et vertes).

Au CHU de Bordeaux, un logiciel (Figure 27) a été récemment développé par Laetitia Gaston, ingénieur en bio-informatique afin de regrouper les résultats de plusieurs logiciels d'analyses utilisés pour l'interprétation des résultats du séquençage de nouvelle génération sur une seule

interface. Cela permet une vue d'ensemble ainsi qu'une comparaison entre les différents logiciels. Il est également possible d'y renseigner la nature du variant identifié (polymorphisme, variant pathogène).

**Rapport individuel d'analyse par NGS: Gene CFTR [NM\_000492.3]**

**RUN PARAMETERS**

Date du run 28-02-2018 N°Run 163 Technicien [ ] Date de vérification 07-03-2018  
Barcode IonXpress\_036 N°ADN 180452 Biologiste [ ] Date de validation 07-03-2018  
Nom du Run R\_2018\_02\_28\_14\_37\_47\_user\_SN2-163-Pigmentation-CFTR\_CP RunInfo DataBase

KEEP	Loc	c. HGVS	Ref	Var	p. HGVS	Statut	Freq	Qual	Type	Hotspot	ionReporter	Cov	Cov+	Cov-	Interprétation	Sanger	Commentaire
<input type="checkbox"/>	I7	c.869+11C>T	C	T		het	51		C			253	123	130	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	I7	c.869+11	C	T		Heterozygous	51.1	1173.53	SNP	tvc.novel.4		497	125	129	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	I1	c.54-589A>G	A	G		het	49		C			123	78	45	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	I1	c.54-589	A	G		Heterozygous	49.4	557.583	SNP	tvc.novel.1		251	79	45	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	I12	c.1680-870T>A	T	A		homo	100		C			303	157	146	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	I12	c.1680-870	T	A		Homozygous	100.0	3002.9	SNP	tvc.novel.12		302	157	145	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	E11	c.1408G>A	G	A	p.Val470Met	homo	100		C			649	324	325	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	E11	c.1408	G	A		Homozygous	99.8	6438.24	SNP	tvc.novel.10		648	323	324	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	E15	c.2562T>G	T	G	p.=	het	52		C			310	179	131	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	E15	c.2562	T	G		Heterozygous	51.9	1462.77	SNP	tvc.novel.13		603	179	134	POL val	Non fait	
<input type="checkbox"/>	E4	c.350G>A	G	A	p.Arg117His	het	45		C			168	93	75		Non fait	
<input type="checkbox"/>	E4	c.350	G	A		Heterozygous	44.7	678.015	SNP	tvc.novel.2		380	96	74		Non fait	

RECHERCHE RGT  
Entrez votre texte ici

COMMENTAIRE GENERAL  
Entrez votre texte ici

Figure 27 Logiciel développé au CHU de Bordeaux

Il permet de mettre en évidence les variants communs (onglet « common variants ») aux trois logiciels (SeqNext, Torrent et Ion Reporter) et ceux détectés dans chaque logiciel individuellement.

Le statut hétérozygote ou homozygote est précisé ainsi que la fréquence du variant et les couvertures minimale et maximale.

## Technologie Illumina®

Après préparation et obtention de la librairie, cette dernière est placée sur une « flow cell » correspondant à un support en verre sur lequel les fragments sont capturés et hybridés. Chaque fragment hybridé est amplifié de manière clonale constituant un cluster. Lorsque le cluster est terminé, les fragments sont séquencés. La méthode utilisée est la technologie Illumina® basée sur la détection de photons (d'après la présentation « Illumina Sequencing Technology Pub. No. 770-2007-002 Current as of 11 October 2010 » consultée le 19 janvier 2019). Quatre nucléotides terminateurs réversibles de chaîne marqués par un fluorochrome sont utilisés. Dès lors qu'un nucléotide est incorporé, un photon est détecté. Après excitation par laser, chaque émission de fluorescence de chaque cluster est enregistrée et la première base identifiée. Les cycles de séquençage sont répétés pour déterminer la séquence des fragments, et ce, base après base. Les séquences sont ensuite alignées et comparées à une séquence de référence de la même manière qu'avec la technologie Ion Torrent.

## (6) Trousses commerciales

D'autres techniques servent en routine au laboratoire, notamment pour l'analyse du gène *CFTR*. Il s'agit des trousse commerciales par amplification spécifique d'allèles (Figure 28). Elles sont utilisées en première intention dans le cadre d'une demande d'analyse du gène de la mucoviscidose. Le kit choisi (INNO-LiPA® 19+17) permet la détection des 35 mutations les plus fréquentes du gène *CFTR* dans la population européenne. Le principe repose sur l'hybridation inverse (Reverse Dot-Blot).

Après extraction de l'ADN, plusieurs régions du gène *CFTR* sont amplifiées par PCR à l'aide d'amorces biotinylées. Les amplicons obtenus sont hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques immobilisées en lignes parallèles sur une bandelette. Le matériel non spécifique amplifié est éliminé au cours de l'étape de lavage stringent. Un conjugué streptavidine - phosphatase alcaline est alors ajouté permettant la reconnaissance et la liaison avec les hybrides biotinylés. La révélation se fait ensuite en présence d'un chromogène. De l'hybridation à la révélation, le processus peut se faire de manière automatisée par l'Auto-LiPA 48. La technique est validée s'il y a présence d'une bande au niveau de la ligne de repère et du contrôle conjugué.



Figure 28 Représentation d'une bandelette du kit INNO-LiPA CFTR-19

Lorsqu'un allèle muté (M) ou sauvage (W) testé est présent, une bande apparaît sur la bandelette à hauteur de cet allèle.

La présence de bandes permet l'interprétation. En effet, la bandelette est schématiquement divisée en deux. La partie supérieure correspond aux sondes « génotype muté » (M-type) et la partie inférieure aux sondes dites « génotype sauvage » (W-type).

## c. Prise en charge en assistance médicale à la procréation [55]

Pour les hommes porteurs d'anomalies génétiques entraînant une infertilité, un recours à l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) est nécessaire. Dans la population générale, en l'absence d'antécédent, il est recommandé de consulter après un délai d'un an de tentative de conception avec des rapports sexuels fréquents non protégés et sans contraception associée. Ce délai n'est pas indiqué en présence d'antécédents. Il est, par ailleurs, de 6 mois si la femme a plus de 35 ans.

Dans le cadre du bilan d'infertilité d'un couple, il est essentiel de faire des investigations chez les deux membres du couple de manière simultanée. Il existe encore aujourd'hui un retard de prise en charge du couple lié à un retard de diagnostic de l'infertilité liée à l'homme.

Le parcours en assistance médicale à la procréation est régi par les lois de bioéthique révisées en 2011. Avant toute tentative, il est demandé aux couples de justifier d'une vie commune.

Le bilan d'infertilité du couple comprend une consultation gynécologique et une consultation biologique. La première notion est la notion de délai d'infertilité, la deuxième notion est celle du type d'infertilité, primaire ou secondaire.

### 1. Bilan de la femme associée

#### *a. Examen clinique*

L'examen clinique de la femme comporte un interrogatoire visant à rechercher les antécédents médicaux et chirurgicaux personnels et familiaux pouvant expliquer l'infertilité. Les malformations utérines, ovariennes, vaginales, les pathologies atteignant le tractus génital

comme l'endométriose, l'âge de la patiente, la durée et la régularité des cycles menstruels, la prise de toxiques (alcool, tabac, cannabis), la profession, l'indice de masse corporelle ainsi que les traitements au long cours font partie des éléments du bilan. En cas de troubles du cycle, les signes cliniques d'hyperandrogénie sont recherchés.

### *b. Examens complémentaires*

Pour préciser le diagnostic, il est nécessaire de réaliser des examens complémentaires.

Un bilan hormonal de première intention à J2 ou J3 du cycle est prescrit avec dosages des gonadotrophines FSH et LH, de l'œstradiol, de la testostérone et de l'hormone antimüllérienne (AMH). Le dosage de la progestérone à J21 permet d'apprécier la qualité de l'ovulation. Les résultats peuvent orienter le diagnostic.

Pour compléter le bilan hormonal, une échographie pelvienne par voie endovaginale est réalisée entre J2 et J5 du même cycle. Elle permet d'apprécier la taille des ovaires et d'effectuer le compte des follicules antraux (CFA), de s'assurer de l'état utérin, endométrial et ovarien et de l'absence d'image suspecte. L'association du bilan hormonal et de l'échographie permet d'avoir un reflet de la réserve ovarienne de la femme et d'orienter le couple vers les techniques d'assistance médicale à la procréation les plus adaptées.

Pour évaluer la perméabilité des trompes, une hystérosalpingographie est réalisée en fin de première partie de cycle. Une hystérocopie pour visualiser la cavité utérine, rechercher des malformations ou anomalies utérines ne fait pas partie du bilan de première intention mais est systématique avant une fécondation *in vitro*.

Enfin, « la recherche des marqueurs biologiques pour les virus de l'immunodéficience humaine (VIH1/VIH2), de l'hépatite B (VHB) (antigène HBs, anticorps anti-HBc et anti-HBs), de l'hépatite C (VHC) (anticorps anti-HCV) et pour l'agent de la syphilis est effectuée chez les deux

membres du couple dans les trois mois précédant la première tentative d'AMP. La recherche est répétée ultérieurement chaque fois que le délai entre la tentative d'AMP et le dernier examen est supérieur à douze mois.

Des examens supplémentaires sont éventuellement réalisées en cas d'exposition particulière à un risque infectieux spécifique comme par exemple : la recherche d'anticorps anti-HTLV1 pour les personnes vivant dans des régions à forte incidence du virus de la maladie *Human T cell leukemia/lymphoma* ou originaires de ces régions ou dont les partenaires sexuels ou les parents sont originaires de ces régions et les recherches spécifiques liées à un séjour en contexte épidémique (Zika) ou liées à un épisode viral dans les mois précédant l'AMP, certains virus pouvant persister dans le sperme à distance de l'épisode aigu » [55].

A l'issue du bilan des deux partenaires, les choix des techniques d'assistance médicale à la procréation sont proposés et expliqués au couple.

## 2. Techniques proposées au couple

Nous ne nous intéresserons qu'aux patients présentant une azoospermie et en particulier à ceux porteurs de mutations du gène *CFTR* dans le cadre d'une agénésie bilatérale des canaux déférents. Un patient dont le diagnostic de mucoviscidose, ou d'ABCD isolée liée au gène *CFTR* est posé lors du bilan d'infertilité bénéficiera d'un conseil génétique avant toute tentative en assistance médicale à la procréation. En présence d'une mutation dite CF, un bilan ainsi qu'une consultation dans un CRCM seront proposés. Afin de réaliser une technique d'assistance médicale à la procréation intraconjugale, il est nécessaire au préalable d'extraire chirurgicalement des spermatozoïdes.

### *a. Biopsie testiculaire*

La biopsie testiculaire ou Testicular Sperm Extraction (TESE) est une technique chirurgicale visant à prélever du tissu testiculaire afin d'y rechercher des spermatozoïdes lorsqu'une azoospermie est confirmée par deux spermogrammes. L'indication doit être validée par l'andrologue. En présence d'une azoospermie obstructive, il est possible d'effectuer des prélèvements testiculaires et épидидymaires. Le prélèvement de l'épididyme est réalisé par aspiration microchirurgicale (MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration). Pour une azoospermie non obstructive, seul le prélèvement testiculaire présente un intérêt.

Il s'agit d'une intervention sous anesthésie générale au bloc opératoire. Il est possible de prélever un fragment d'un testicule, souvent des deux. Une courte incision est pratiquée au niveau scrotal sur la face antérieure. Après franchissement de la vaginale, l'albuginée est incisée puis le tissu testiculaire est collecté par pression manuelle. La quantité prélevée est adaptée au volume testiculaire [56]. Après recueil du prélèvement, les différents plans sont refermés. L'envoi d'une partie du prélèvement en anatomocytopathologie est systématique pour analyser, à partir de coupes histologiques, le tissu prélevé.

Le prélèvement est transmis au laboratoire de biologie de la reproduction afin de dilacérer le tissu pour étudier les tubes séminifères et rechercher des spermatozoïdes au microscope entre lame et lamelle. Si le tissu renferme des gamètes, une cryoconservation est effectuée en vue d'une FIV-ICSI avec paillettes-TESE.

La probabilité de trouver des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire dans le cadre d'une azoospermie obstructive est grande. En effet, la spermatogenèse est conservée s'il n'existe pas de trouble associé. Elle est en revanche faible en présence d'une azoospermie non obstructive avec altération de la spermatogenèse, à titre d'exemple elle avoisine les 50% dans le syndrome de Klinefelter [14].

Afin de faciliter l'organisation, la biopsie testiculaire est réalisée en amont de la fécondation *in vitro*, elle est dite asynchrone. Cependant, il peut être bénéfique de réaliser la biopsie de



manière synchrone, c'est le cas des azoospermies non obstructives pour lesquelles le nombre de spermatozoïdes mobiles peut être faible et dont le cycle de congélation-décongélation pourrait altérer davantage la mobilité et la vitalité [57].

### *b. Technique de FIV-ICSI avec paillettes TESE*

La consultation biologique permet d'expliquer au couple infertile la technique d'assistance médicale à la procréation qui peut leur être proposée. Avant une première tentative de FIV intraconjugale, il est nécessaire de recueillir par écrit le consentement du couple pour la technique en elle-même, pour la congélation d'éventuels embryons surnuméraires et pour l'anonymisation ou non des résultats de la tentative transmis de manière réglementaire à l'Agence de la Biomédecine.

Une tentative de FIV comporte plusieurs étapes.

D'abord, la stimulation ovarienne de la patiente par injection sous-cutanée quotidienne de gonadotrophines (FSH seule ou association de FSH et LH) est démarrée à différents moments du cycle menstruel en fonction du protocole de stimulation choisi, agoniste ou antagoniste. Un monitoring hormonal et échographique est réalisé afin de surveiller la croissance folliculaire et déterminer le jour du déclenchement. Il peut s'effectuer soit par hCG recombinante (Ovitrelle®), soit par un agoniste de la GnRH en cas de protocole antagoniste si la patiente présente des risques d'hyperstimulation ovarienne, soit par double déclenchement en utilisant un agoniste suivi d'une injection d'hCG recombinante.

36h après le déclenchement a lieu l'ovulation et donc la ponction ovarienne au bloc opératoire. Sous anesthésie locale et sédation ou anesthésie générale, la patiente, installée en position gynécologique est ponctionnée sous échographie afin de récupérer le liquide folliculaire contenant les complexes cumulo-ovocytaires. Les tubes de liquide sont adressés au laboratoire de biologie de la reproduction pour y rechercher les complexes. Ces derniers subissent une étape de décoronisation chimique et mécanique par hyaluronidase. Les

ovocytes nus sont ensuite observés au microscope pour ne garder que ceux matures, c'est-à-dire au stade de métaphase de deuxième division méiotique. En parallèle, après vérification de la présence d'ovocytes matures, une ou plusieurs paillettes (selon la concentration de spermatozoïdes et le nombre d'ovocytes à la ponction) de prélèvement testiculaire sont décongelées.

La recherche de spermatozoïdes mobiles après décongélation s'effectue sous microscope, les formes typiques sont utilisées en priorité. Un spermatozoïde est ensuite injecté dans chaque ovocyte mature. Les ovocytes injectés sont enfin transférés soit dans une étuve tri-gaz standard soit dans une étuve tri-gaz couplée à un système time lapse afin d'y poursuivre leur développement.

Une lecture à 48 heures permet de visualiser le nombre d'embryons obtenus ainsi que leurs caractéristiques morphologiques. On appelle TOP-embryon (411), un embryon présentant à 48 heures quatre cellules de taille homogène et moins de 20% de fragments. Après consultation de transfert avec le couple, il est décidé le transfert d'un ou de plusieurs embryons. Les embryons surnuméraires présentant les caractéristiques morphologiques définies pour la congélation sont vitrifiés et conservés dans des cuves d'azote liquide.

Un test de grossesse par dosage des hCG est prescrit à la patiente pour être effectué 14 jours après le transfert.

### c. *Don de spermatozoïdes*

Le don de gamètes est anonyme et gratuit. Il peut être fait par des hommes en âge de procréer, de 18 ans jusqu'à la veille des 45 ans. Il n'est pas nécessaire d'avoir des enfants. Le donneur s'adresse à un centre agréé (CECOS : Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du Sperme). Plusieurs recueils sont effectués puis traités et conditionnés en paillettes pour être cryoconservés. Les paillettes d'un donneur sont retirées dès la naissance de 10 enfants issus de ses gamètes.

En cas d'absence de spermatozoïde à la biopsie testiculaire ou de non réalisation de celle-ci, il est proposé aux couples de procéder à une assistance médicale à la procréation avec tiers donneur. Une autorisation doit être au préalable demandée au Tribunal de Grande Instance ou chez un notaire. Les patients sont inscrits sur une liste d'attente dans un CECOS qui validera la prise en charge lors de la réunion de concertation pluridisciplinaire et réalisera l'appariement du couple avec un donneur selon les caractéristiques physiques (origine ethnique en particulier) et si possible selon le groupe sanguin. Le cas échéant, une dérogation de groupe est signée par le couple receveur. L'appariement prend également en considération les facteurs cumulatifs de risque, exclut tout donneur apporté par le couple receveur pour le don et prend en compte le besoin éventuel d'un donneur testé pour des maladies génétiques spécifiques.

Deux techniques peuvent être proposées. La première est la réalisation d'insémination intra-utérine avec sperme de donneur (IAD). Elle est décidée en première intention lorsque le bilan de la femme retrouve une perméabilité tubaire bilatérale. La seconde technique est la fécondation *in vitro* de type ICSI avec sperme de donneur. Cette dernière peut être utilisée en première intention, notamment en cas de pathologie tubaire mais fait plus souvent suite aux échecs d'IAD.

### 3. Conseil génétique

Lors de la découverte d'une anomalie génétique, il est indispensable de réaliser un conseil génétique. Dans le cas de la présence d'une ou de deux mutations du gène *CFTR*, une analyse complète du gène par NGS doit être entreprise chez la conjointe ainsi que la recherche de grands réarrangements par CGH array si le NGS ne retrouve pas de mutation [58] (Figure 29). Cette recherche n'est pas systématique lorsque l'homme est porteur d'une mutation sévère et d'une mutation *CFTR*-RD. En effet, si un patient est porteur d'une mutation sévère ainsi que sa conjointe, le risque d'obtenir un enfant malade est de  $\frac{1}{4}$ . Si le patient est atteint de mucoviscidose et sa conjointe porteuse d'une mutation sévère, le risque pour le couple d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose est de  $\frac{1}{2}$ . Un calcul de risque a priori puis résiduel après analyse du gène est réalisé afin d'informer le couple sur le risque de transmission à la descendance.

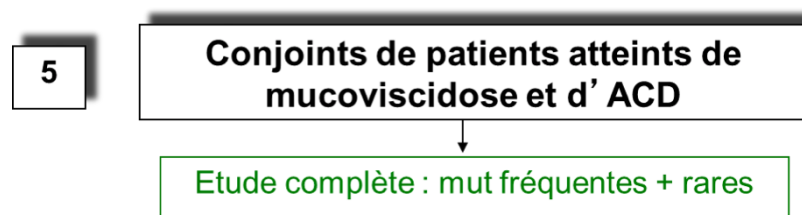


Figure 29 Analyses à effectuer chez une conjointe d'un patient avec ABCD

D'après les Recommandations de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire

La découverte d'anomalies à l'échelle chromosomique ou génique est une information importante pour le patient qui doit en avertir les membres de sa famille. Le conseil génétique est un temps d'explication sur la pathologie et sur le risque de transmission ainsi que les conséquences sur la descendance.

Pour éviter tout risque de transmission, il est possible d'effectuer un diagnostic préimplantatoire (DPI). Il est encadré par des textes de loi dont la loi de juillet 1994 révisée pour la dernière fois en 2011. Cinq centres en France sont agréés, il s'agit des CHU de Nantes, Montpellier, Grenoble, Strasbourg et du centre de Paris (Hôpital Necker-Enfants Malades) -

Clamart (Hôpital Antoine Béchère). Pour être retenue, la pathologie doit être d'origine génétique, d'une particulière gravité, incurable au moment du diagnostic. Le dossier doit être approuvé par un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN) [59].

Le DPI consiste à sélectionner les embryons indemnes de la pathologie en les analysant soit en biologie moléculaire, soit en cytogénétique selon l'indication. Seule la pathologie ayant conduit au DPI est recherchée.

Sur le plan technique, les embryons sont obtenus après fécondation *in vitro* par ICSI puis mis en culture. A J3, un embryon se développant correctement doit comporter 8 cellules. La biopsie embryonnaire permet d'obtenir du matériel génétique en perforant la zone pellucide mécaniquement, par laser ou chimiquement puis en aspirant délicatement à la micropipette 1 à 2 blastomères pour l'analyse [60].

Pour une indication chromosomique, une FISH interphasique ou une CGH array est réalisée. L'analyse consiste à rechercher des aneuploïdies. La CGH array repose sur le principe de variation du nombre de copies, elle ne permet pas la détection de translocations équilibrées.

Pour une anomalie génique, trois approches sont possibles. Le diagnostic direct utilise une amplification par PCR flanquante permettant la détection de la mutation. Le diagnostic indirect repose sur l'utilisation de microsatellites polymorphes : la mutation n'est pas détectée directement, c'est l'allèle associé qui est mis en évidence. Enfin, il existe un diagnostic combinant l'approche directe et indirecte, c'est notamment le cas dans la recherche de la mucoviscidose. Le séquençage de nouvelle génération peut être utilisé mais il s'agit d'une technique longue.

Les embryons indemnes sont soit transférés à J4 ou J5 soit cryoconservés. Les embryons porteurs d'anomalies sont détruits.

Il est également possible de réaliser la biopsie sur un embryon au stade de blastocyste à J5 en prélevant 5 à 10 cellules du trophoctoderme permettant d'obtenir plus de matériel génétique

et donc d'éviter le taux de mosaïcismes mais nécessite la vitrification embryonnaire pendant la durée de l'analyse [60].

Lors du conseil génétique, il est expliqué au couple qu'une autre analyse peut être réalisée. Il s'agit du diagnostic prénatal (DPN). Contrairement au DPI, la grossesse peut être spontanée ou issue d'une technique d'assistance médicale à la procréation. Les embryons obtenus ne sont pas soumis à des analyses génétiques avant leur implantation. Au cours de la grossesse, après accord du CPDPN, une analyse recherchant l'anomalie génétique du ou des parents est réalisée à partir du liquide amniotique. Si le fœtus est atteint, une demande d'interruption médicale de grossesse faite par le couple est recevable.

### III. Prise en charge en génétique moléculaire des patients avec azoospermie au CHU de Bordeaux

#### A. Objectifs

L'agénésie bilatérale des canaux déférents est une des nombreuses causes d'azoospermie chez les patients infertiles. Elle est estimée à 1 pour 1000 hommes dans la population générale [61] et de 1 à 2% des hommes infertiles [42]. Lorsque l'azoospermie est dite obstructive, l'ABCD est retrouvée à une fréquence de l'ordre de 3 à 8%.

Pour rappel, l'azoospermie est définie par une absence de spermatozoïdes sur la totalité de l'éjaculat après culot de centrifugation sur au moins deux spermogrammes espacés de trois mois, la durée d'un cycle de spermatogenèse étant théoriquement de 74 jours.

L'agénésie bilatérale des canaux déférents est généralement associée à une étiologie génétique qui est l'atteinte du gène *CFTR*. En effet, des mutations du gène sont retrouvées dans près de 80% des cas. Deux tableaux typiques sur dix ne sont pas expliqués à l'heure d'aujourd'hui. Des découvertes récentes faites par des équipes françaises permettent d'espérer trouver une étiologie à cette clinique non étiquetée. En effet, en 2016 les équipes lilloise et toulousaine de génétique moléculaire ont mis en évidence le gène *ADGRG2* et ont pu démontrer son implication dans l'azoospermie liée à l'atteinte des canaux déférents en l'absence de mutation du gène *CFTR*.

D'autre part, l'équipe de génétique moléculaire du CHU de Montpellier a récemment identifié de nouvelles mutations du gène *CFTR*. Il s'agit de mutations introniques profondes qui n'avaient jusqu'à maintenant jamais été découvertes. Cela s'explique par le manque de couverture du gène par le séquençage de nouvelle génération. En effet, on estime que le NGS permet une couverture et la détection des mutations de l'ordre de 97%. Le séquençage est principalement ciblé sur les séquences codantes (exons) et les jonctions intron-exon. Lorsque

les variations se trouvent dans les séquences non codantes (introns), à distance des exons, il est rarement possible de les mettre en évidence. Pour y parvenir, il est nécessaire de designer des amorces spécifiques de la région à amplifier et de réaliser un séquençage Sanger.

L'objectif de l'étude est double. La première étape consiste à analyser les résultats du CHU de Bordeaux concernant les demandes d'analyses génétiques à l'échelle génique pour infertilité masculine. Elle permet de sélectionner les patients présentant une azoospermie obstructive par agénésie bilatérale des canaux déférents. La seconde étape a pour but d'expliquer une part des azoospermies obstructives liées à une agénésie bilatérale des canaux déférents en l'absence de mutation du gène *CFTR* identifiée par séquençage de nouvelle génération dans la cohorte de patients du CHU de Bordeaux.



## B. Matériels et Méthodes

### 1. Analyses moléculaires au CHU de Bordeaux des gènes *CFTR* et *ADGRG2* et des loci AZF

A partir de l'ensemble des demandes adressées en génétique moléculaire pour la recherche de microdélétions du chromosome Y, du gène *CFTR*, et du gène *ADGRG2*, les résultats des patients de sexe masculin infertiles ont été extraits.

### 2. Analyses de seconde intention pour les patients avec azoospermie obstructive par ABCD

#### *a. Population*

Les critères d'inclusion retenus pour l'ABCD étaient une azoospermie répétée sur au moins deux spermogrammes espacés, le caractère obstructif de l'azoospermie défini par un pH acide inférieur à 7,2 de l'éjaculat, un volume faible (<1.5mL) et une biochimie séminale caractéristique d'une obstruction : fructose et  $\alpha$ -glucosidase neutre effondrés, des échographies scrotale et endorectale montrant une absence bilatérale des canaux déférents et des vésicules séminales.

## *b. Techniques*

### Analyse du gène *CFTR* par NGS

Pour confirmer l'absence de mutations du gène *CFTR*, une analyse par NGS a été réalisée avec un taux de couverture de l'ordre de 97%. Le séquençage a été effectué sur le séquenceur Ion Torrent PGM™ ou Ion S5xL en fonction de leur disponibilité. La technologie utilisée était donc celle d'Ion Torrent™ basée sur la détection de protons. Les résultats ont été basculés sur le serveur Torrent Server™ et analysés sur la Torrent Suite™ puis téléchargés à partir de l'interface en fichiers .bam et .vcf afin de lire les séquences sur le logiciel Alamut®. Les résultats ont également été interprétés à partir des logiciels Ion Reporter™ et JSI SeqPilot SeqNext®.

### Vérification des variants par séquençage Sanger

Lorsqu'une variation a été mise en évidence en NGS, une deuxième technique a été réalisée afin d'en confirmer la présence. Pour cela, le séquençage Sanger a été utilisé en prenant le couple d'amorces spécifiques de l'exon concerné. Le séquençage a été fait sur le séquenceur 3500xL puis la lecture des séquences sur le logiciel Seqscape®.

### Analyse du gène *ADGRG2* par NGS

En l'absence de mutations du gène *CFTR* après séquençage de nouvelle génération, l'ADN leucocytaire des patients a été envoyé au CHRU de Lille pour séquençage du gène *ADGRG2* par NGS. La technologie utilisée était celle d'Illumina® par séquençage MiSeq®, basée sur la détection de photons. Le séquençage couvrait l'intégralité des régions codantes et des jonctions intron-exon du gène et permettait de détecter plus de 99% des mutations au niveau des régions étudiées. Les résultats ont été interprétés à partir des logiciels JSI SeqPilot SeqNext® et MiSeqReporter®.

## Recherche des mutations introniques profondes du gène *CFTR*

Sept mutations introniques profondes, situées à distance des jonctions intron-exon ont été recherchées.

### - c.1585-9412A>G

Située dans l'intron 11, cette variation, dont la fréquence est la plus élevée en Italie, est une mutation CF. Elle a été retrouvée à deux reprises par des équipes du réseau CFTR-France. L'amorce sens 5'-gccaagttattgtacagttgacc-3' et l'amorce anti-sens 5'-tgaccagaagccttactgataac-3' ont été utilisées à une concentration de 10µM pour obtenir des amplicons d'une taille de 349 paires de bases. Un programme spécifique d'amplification a été utilisé comportant 35 cycles. La taille des produits de PCR était vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% avec un marqueur de taille de 100bp. Une étape de purification a été réalisée par technique enzymatique (ExoSAP-IT) puis les séquences ont été préparées avec deux nouveaux mix, l'un comportant l'amorce sens et l'autre l'amorce anti-sens à une concentration de 3,2µM. Le programme spécifique des séquences a été utilisé (Seq\_TD55) comprenant 30 cycles. Les séquences ont ensuite été passées sur le séquenceur 3500xL par méthode Sanger puis interprétées à partir du logiciel Seqscape®.

### - c.1680-883A>G

Variante situé dans l'intron 12, principalement retrouvé dans la population espagnole, il est responsable de mucoviscidose (disease-causing). L'amorce sens 5'-agagaatcctatgtacttgggat-3' et l'amorce anti-sens 5'-agctaaaatatgaaaccataagcaa-3' ont été utilisées à la concentration de 10µM. La taille des fragments attendue était de 179 paires de bases. Le protocole était ensuite le même que pour la recherche de la mutation c.1585-9412A>G.

### - c.1680-886A>G

Mutation située dans l'intron 12, elle est majoritairement retrouvée dans la population du Sud-Ouest de la France et en Espagne. Il s'agit d'une mutation CF. Proche de la mutation

c.1680-883A>G, le même couple d'amorces a été utilisé pour la recherche selon les techniques décrites précédemment.

- c.1680-877G>T

Situé dans l'intron 12, ce variant intronique non décrit dans la base de données française CFTR-France mais référencé dans la base internationale CFTR2 chez 22 patients, est un variant pathogène. Étant à quelques paires de bases de deux mutations citées ci-dessus, les mêmes amorces sont utilisées. Le protocole restait identique.

- c.3469-1304C>G

Répertorié à 5 reprises dans la base de données CFTR-France, ce variant a été identifié comme mutation CF. Localisé dans l'intron 21, il a été recherché par le couple d'amorces 5'-ccgtaacagtgggcttgac-3' et 5'-tggggataaagcagaggagt-3'. Les fragments obtenus devaient avoir une taille de 250 paires de bases. Il a été décrit principalement dans la population d'origine africaine. Le mode opératoire restait inchangé.

- c.3874-4522A>G

Variant impliqué en pathologie mais de conséquence clinique variable, il a été décrit chez cinq patients par le réseau CFTR-France sans origine géographique particulière. Se situant dans l'intron 23, les amorces utilisées étaient les suivantes : 5'-cagtcacactcccacttatgt-3' et 5'-cctcaactcaactcagtggcaa-3'. La taille des amplicons attendue était de 180 paires de bases (Figure 30). La suite de la procédure était identique aux autres recherches de mutations.

- c.2989-313A>T

Présente au sein de l'intron 18, cette mutation plus fréquente en Bretagne a été identifiée chez quatre patients de la base CFTR-France. Elle a des conséquences variables au niveau clinique. Difficilement détectable, elle nécessite une étape préliminaire. Ce variant est situé dans une région répétée dont les répétitions sont aspécifiques. En effet, plusieurs régions du gène *CFTR* comportent ces mêmes répétitions rendant impossible l'accroche unique d'une amorce à hauteur de la mutation. Une PCR Long-range incluant les exons adjacents a donc été utilisée. Elle a amplifié un segment plus large contenant le variant et permettant l'amplification de fragments de 4521 paires de bases. L'amorce sens 5'-cagagaaattggctgttact-3' et l'amorce anti-

sens 5'-tgtacaccaactgtgtaag-3' ont servi pour cette PCR. L'ADN polymérase était différente des autres PCR, celle utilisée était la GoTaq® G2 Hot Start Master Mix. Une migration sur gel d'agarose à 0,8% a été réalisée puis les produits de PCR ont été repris en tant qu'ADN pour la PCR dite nichée de l'intron 18. Le couple d'amorces était le suivant : 5'-gatgagttcatgtcctttgta-3' et 5'-ttaagtttagggtacatgtgca-3', avec des fragments obtenus de 312 paires de bases. Les étapes suivantes étaient les mêmes que pour les autres variants.

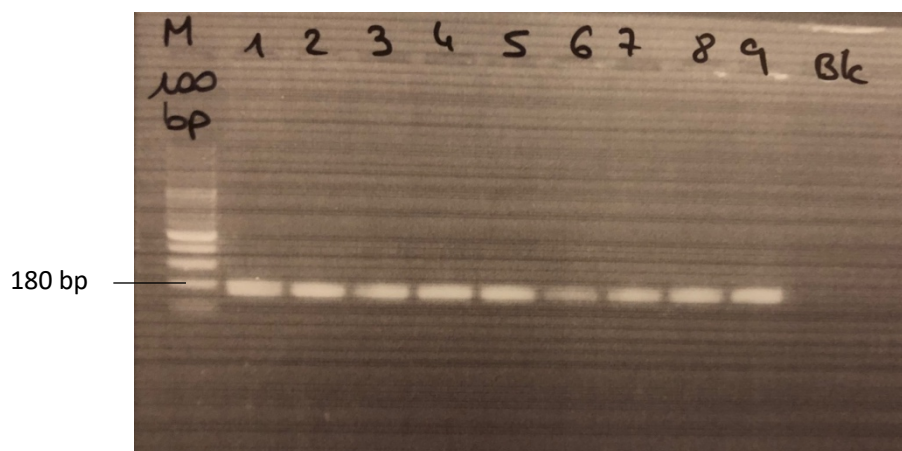


Figure 30 Photographie du gel de la PCR recherchant la mutation située dans l'intron 23

M 100 bp : Marqueur de taille 100 paires de base

1 à 9 : Échantillons

Blc : Blanc

Amplification de fragments de même taille pour chaque échantillon, absence d'amplification pour le contrôle négatif (blanc)

## C. Résultats

### 1. Résultats des analyses réalisées au CHU de Bordeaux

#### *a. Loci AZF*

Depuis la mise en place en 2004 de la recherche de microdélétions du chromosome Y dans le service de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux, 589 demandes ont été faites pour cette analyse dans le cadre d'un bilan pour infertilité masculine (Figure 31).

Il en résulte que 562 patients n'étaient pas porteurs de microdélétion, leur analyse étant négative pour les six marqueurs de première intention.

Pour les 27 hommes restants, une délétion du chromosome Y a été identifiée (Figure 32). Une seule atteinte isolée du locus AZFa a été observée. Un seul patient était porteur d'une microdélétion unique d'AZFb. L'atteinte conjointe d'AZFb et d'AZFc a été retrouvée chez 7 hommes. La microdélétion la plus fréquente AZFc a été incriminée dans un peu plus d'un cas sur deux (14/27). Cependant, la délétion partielle d'AZFc gr/gr a, quant à elle, été identifiée à trois reprises. Enfin, l'azoospermie d'un patient s'est expliquée par l'absence totale du bras long du chromosome Y, par conséquent, par l'absence de l'ensemble des loci AZF.

### Résultats de la recherche de microdélétion du chromosome Y à Bordeaux sur 589 analyses

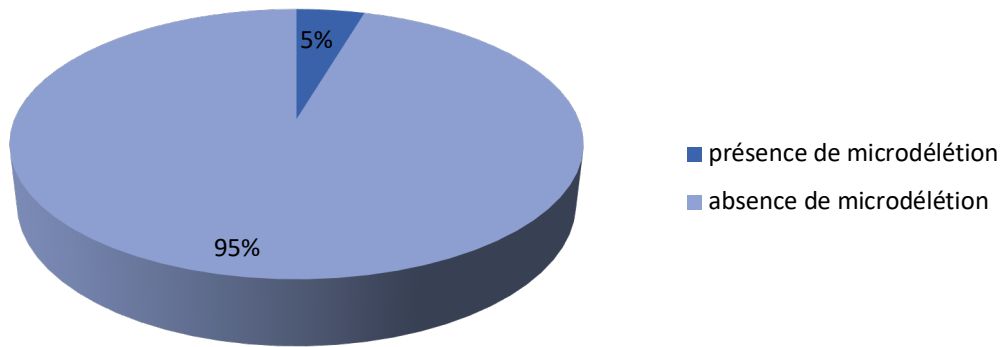


Figure 31 Répartition des résultats d'analyses des microdélétions du chromosome Y au CHU de Bordeaux entre 2004 et 2018

### Répartition des différentes microdélétions du chromosome Y retrouvées à Bordeaux

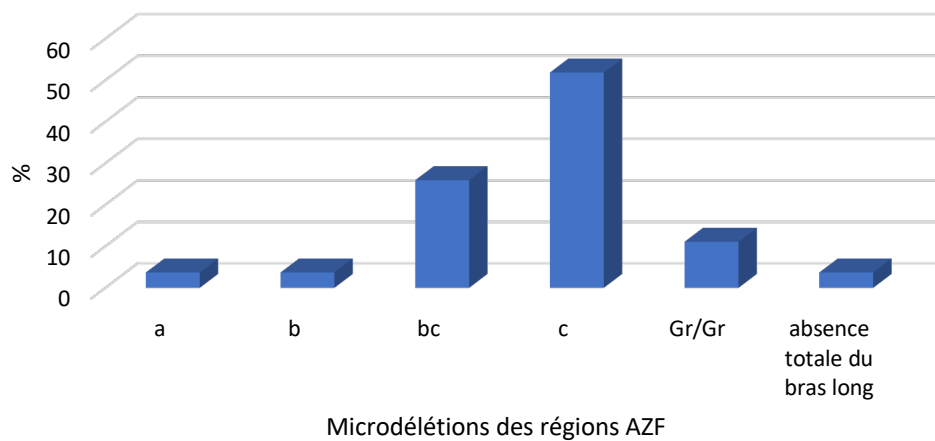


Figure 32 Répartition des microdélétions du chromosome Y identifiées au CHU de Bordeaux entre 2004 et 2018

## *b. Gène CFTR*

Depuis la première analyse du gène *CFTR* pour bilan d'infertilité masculine, réalisée en génétique moléculaire au CHU de Bordeaux en 1993, 101 demandes ont été faites pour cette indication sur la période de 1993 à 2018 soit 25 ans (Figure 33).

Sur toutes ces demandes, 14 patients ne présentaient pas d'azoospermie. Sur ces 14 patients, 13 ont eu une recherche négative des mutations les plus fréquentes dont un était porteur d'une microdélétion du chromosome Y. Leurs concentrations de spermatozoïdes dans le sperme étaient très variables, allant de quelques spermatozoïdes vus sur culot après centrifugation à 120 millions/mL. Le spermogramme du patient positif présentait une concentration à 0.4 millions/mL avec hypospermie et nécrospermie. Les mutations retrouvées étaient la mutation c.1521\_1523delCTT à l'état hétérozygote et le variant d'épissage c.1210-34\_1210-6TG[12]T[5]. Cependant, la présence de ces deux variants n'est pas responsable du phénotype du patient. En effet, il existe une pénétrance incomplète du variant d'épissage. Les atteintes du gène *CFTR* et la nécrospermie n'ont pas de lien.

Quatre-vingt-sept patients infertiles pour lesquels une analyse du gène *CFTR* a été demandée, étaient azoospermes.

Parmi ces 87 analyses, 51 patients ont eu une recherche négative (0 ou 1 mutation identifiée) des mutations les plus fréquentes dont 3 patients étaient porteurs de microdélétion du chromosome Y. Pour quarante de ces hommes, aucune mutation n'a été mise en évidence. Contrairement à huit hommes du groupe, pour lesquels un variant du gène *CFTR* a été identifié. Trois étaient des mutations CF, deux étaient des *CFTR*-RD, deux n'étaient pas impliqués en pathologie. Le dernier était de signification inconnue.

Pour les 36 autres patients présentant une azoospermie, deux variants ont été trouvés au cours de l'analyse du gène. Dans un cas sur deux (18/36), les patients étaient porteurs de la mutation CF c.1521\_1523delCTT. Chez dix de ces dix-huit patients, la mutation était associée au variant d'épissage c.1210-34\_1210-6TG[12]T[5]. Deux patients étaient quant à eux homozygotes pour ce variant d'épissage.



### Résultats de l'analyse du gène *CFTR* à Bordeaux sur 101 demandes liées à une infertilité de 1993 à 2018

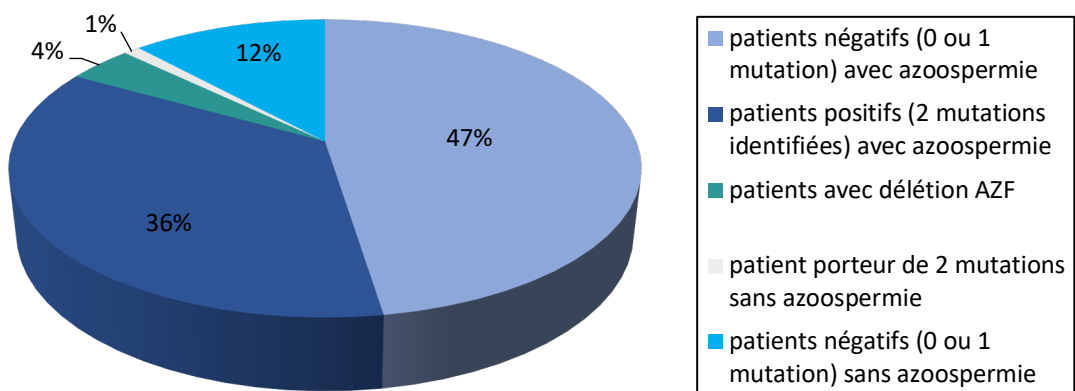


Figure 33 Répartition des résultats des analyses du gène *CFTR* pour infertilité masculine entre 1993 et 2018

### c. Gène *ADGRG2*

Depuis la mise au point de l'analyse en NGS du gène *ADGRG2* au CHRU de Lille en 2017, nous avons envoyé dix échantillons d'ADN de patients pour cette recherche dans le cadre d'un bilan d'infertilité masculine par azoospermie obstructive liée à une agénésie bilatérale des canaux déférents sans respect strict des critères clinico-biologiques.

Pour huit d'entre eux, aucun variant n'a été mis en évidence. Une analyse est en cours.

Un patient était porteur d'une mutation responsable d'une protéine tronquée expliquant le tableau d'azoospermie par ABCD. Il s'agit de la mutation c.1013delC à l'état hémizygote dans l'exon 16 provoquant un décalage du cadre de lecture.

## 2. Résultats des analyses de seconde intention pour les patients avec azoospermie obstructive par ABCD

Dans le cadre d'une infertilité masculine de 1993 à 2018 dans le service de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux, 101 patients ont eu une analyse pour le gène *CFTR*.

Sur ces 101 patients, 14 patients n'ont pas été retenus car ne présentaient pas d'azoospermie (Annexe 1). Parmi ces 14 hommes, un patient était porteur d'une microdélétion du chromosome Y. Sur les 87 restants, 36 ont eu une recherche positive de mutations du gène *CFTR* avec présence de deux variants pathogènes expliquant le phénotype d'agénésie bilatérale des canaux déférents (Annexe 2).

Parmi les 51 patients restants, ceux présentant des anomalies physiques (Annexe 3) pouvant expliquer l'azoospermie (cryptorchidie, varicocèle, microcalcifications diffuses, atrophie testiculaire) ont été exclus soit 11 hommes. Les patients avec anomalies rénales (uropathie,

rein unique) ont également été écartés, ils étaient au nombre de 4. En effet, lorsqu'une agénésie rénale est associée à une agénésie bilatérale des canaux déférents, il n'est pas mis en évidence de mutation du gène *CFTR*, suggérant un mécanisme physiopathologique différent [62–64]. Trois patients avec azoospermie mais porteurs de microdélétions du chromosome Y ont aussi été exclus (Annexe 4).

Parmi les 33 hommes candidats, huit ont été retirés de l'étude car ils avaient soit un volume de l'éjaculat normal, soit un pH normal ou une biochimie séminale sans anomalie (Annexe 5). Enfin, les patients dont l'indication de l'analyse était peu ou non spécifiée (aucun renseignement sur les paramètres du spermogramme, la biochimie séminale, la clinique et l'échographie) ont été exclus, soit 17 patients (Annexe 6).

Au total, après exclusion des patients ne répondant pas strictement aux critères d'inclusion, notre cohorte (Annexe 7) pour les analyses complémentaires de l'azoospermie obstructive liée à l'agénésie bilatérale des canaux déférents était de huit patients (Figure 34).

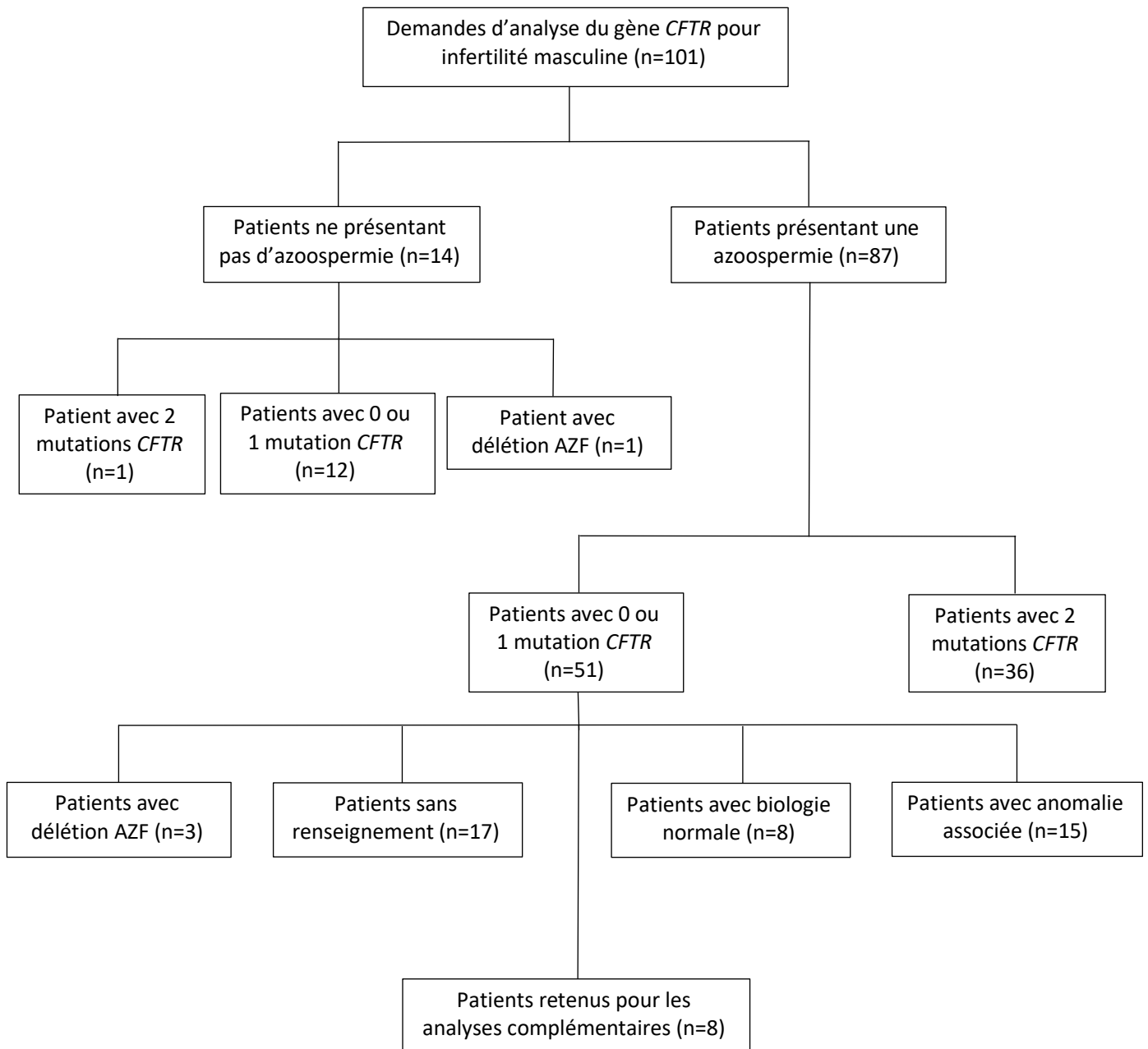


Figure 34 Diagramme de flux de l'étude

Les huit patients sélectionnés ont d'abord eu une analyse complète des séquences codantes et des séquences introniques flanquantes du gène *CFTR* par NGS. En effet, les ADN anciens n'avaient pour la plupart été testés que sur un nombre limité de mutations les plus fréquentes à l'aide d'anciens kits commerciaux (recherche de 30 mutations par exemple).

Pour un patient, qui était porteur du variant d'épissage c.1210-34\_1210-6TG[12]T[5] à l'état hétérozygote, une seconde mutation a été identifiée par le séquençage de nouvelle génération. Il s'agissait de la mutation c.617T>G présente au niveau de l'exon 6. Cette mutation est impliquée en pathologie avec des conséquences cliniques variables. La présence de ces deux variants expliquait le phénotype d'azoospermie obstructive liée à l'agénésie bilatérale des canaux déférents. Les analyses se sont par conséquent arrêtées pour ce patient.

Les sept patients pour lesquels l'analyse du gène *CFTR* en NGS n'a pas permis de préciser le diagnostic ont reçu un complément d'analyse. La première étape a été l'envoi d'ADN leucocytaire au CHRU de Lille pour l'analyse du gène *ADGRG2*. Pour cinq d'entre eux, soit 71%, aucune mutation n'a été identifiée lors du séquençage par NGS. Un homme (14%) était porteur de la mutation c.1013delC, située sur l'exon 16, à l'état hémizygote, responsable d'une absence de synthèse de protéine fonctionnelle. Cette mutation expliquait le tableau clinico-biologique présenté par le patient. L'analyse du dernier patient est en cours.

Les analyses ont été poursuivies chez six patients pour lesquels aucune étiologie n'avait été retrouvée, incluant le patient en cours d'analyse du gène *ADGRG2*.

La mutation c.1585-9412A>G recherchée par la PCR de l'intron 11, n'a pas été identifiée dans la population testée.

Il en est de même pour les mutations introniques c.1680-883A>G, c.1680-886A>G et c.1680-877G>T situées dans l'intron 12.

La mutation c.3469-1304C>G dans l'intron 21 n'a également pas été retrouvée chez nos 6 patients.

La mutation c.3874-4522A>G, située au niveau de l'intron 23 n'a été détectée dans aucun des échantillons.

Enfin, la PCR Long-range couplée à la PCR nichée de l'intron 18, n'ont pas mis en évidence la mutation c. 2989-313A>T dans notre cohorte de patients (Figure 35).

Parmi les huit candidats pour des analyses complémentaires, un patient était donc porteur de deux mutations du gène *CFTR* après étude du gène en NGS et un homme présentait une mutation du gène *ADGRG2*. Aucune mutation intronique profonde du gène *CFTR* n'a été identifiée (Figure 36).

L'azoospermie obstructive liée à l'agénésie bilatérale des canaux déférents restait par conséquent inexplicquée pour les autres patients en attendant le dernier résultat de la recherche de mutation du gène *ADGRG2*.

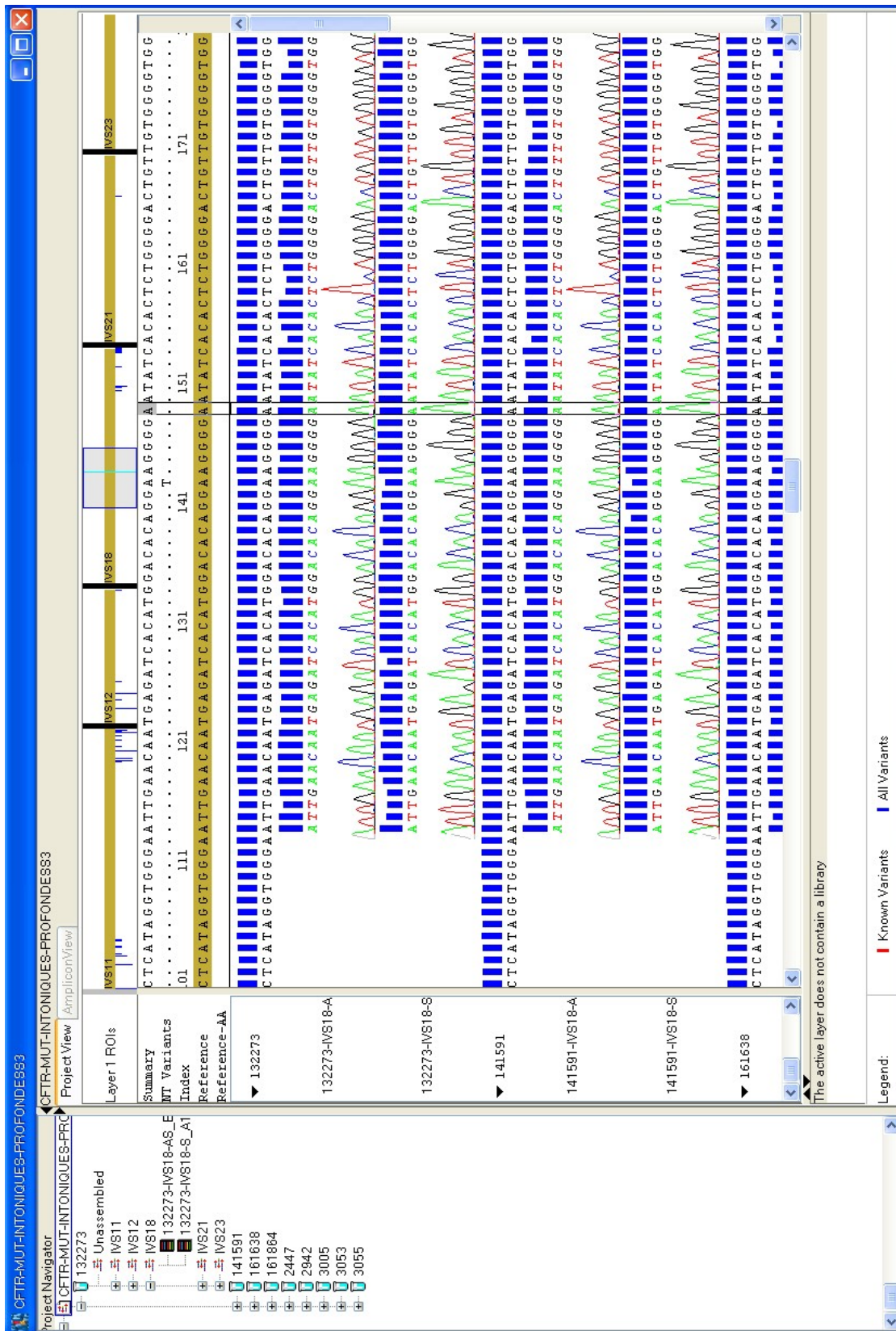


Figure 35 Absence de la mutation c.2989-313A>T chez les patients étudiés  
Présence à l'état homozygote d'une Adénine (A) en position c.2989-313 pour chaque patient

Patients	Âge au diagnostic	Résultats NGS du gène CFTR	Résultats NGS du gène ADGRG2	Recherche de c.1585-9412A>G	Recherche de c.1680-883A>G	Recherche de c.1680-886A>G	Recherche de c.1680-877G>T	Recherche de c.3469-1304C>G	Recherche de c.3874-4522A>G	Recherche de c.2989-313A>T
1656	33	c.[1210-34T[G12];1210-12T[5]] et c.617T>G	Non réalisée (NR)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2447	23	absence de mutation	en cours	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative
2942	41	c.1523T>G à l'état hétérozygote	absence de mutation	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative
3005	33	absence de mutation	absence de mutation	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative
3053	45	absence de mutation	absence de mutation	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative
3055	32	c.224G>A à l'état hétérozygote	absence de mutation	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative
131758	26	absence de mutation	c.1013delC à l'état hémizygote	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
161638	33	absence de mutation	absence de mutation	négative	négative	négative	négative	négative	négative	négative

Figure 36 Tableau récapitulatif des résultats des analyses complémentaires



## D. Discussion

Dans le cadre du bilan génétique d'une infertilité d'origine masculine, trois examens peuvent être réalisés en génétique moléculaire (microdélétion du chromosome Y, gène *CFTR*, gène *ADGRG2*) et un en génétique chromosomique, le caryotype. Notre travail a porté sur les 3 analyses moléculaires. La finalité de la première partie de l'étude était de faire un bilan des résultats en biologie moléculaire au CHU de Bordeaux des infertilités masculines.

La recherche de microdélétions du chromosome Y fait partie des analyses de génétique moléculaire prescrites en présence d'une azoospermie non obstructive ou d'une oligoasthénotéatozoospermie sévère. Elle est cependant souvent demandée quelle que soit l'origine de l'azoospermie. Entre 2004 et 2018, 589 recherches de microdélétions ont été effectuées dont 5% positives. Ce chiffre est comparable à la littérature [10]. Les fréquences des différentes microdélétions ne diffèrent pas non plus de la littérature hormis la microdélétion AZFbc retrouvée à une fréquence légèrement plus élevée que dans d'autres études [10]. Dans la littérature, l'atteinte isolée d'AZFc est la plus fréquente avec un taux variant de 50 à 80% [10,65]. Dans notre population, elle a été retrouvée dans 52% des cas. Concernant la micro délétion complète d'AZFbc, elle est présente dans 26% des atteintes contre 1% à 20% dans d'autres études [10,65]. La délétion partielle gr/gr est responsable à hauteur de 11% du tableau d'azoospermie dans notre cohorte versus 3 à 5% [66]. Elle n'est pourtant pas recherchée de manière systématique dans tous les centres français. En effet, elle est considérée par certains comme un polymorphisme. Nous avons eu une atteinte isolée d'AZFa soit presque 4%. Elle a, par ailleurs, été décrite dans 0.5% à 8% des cas [10,65]. AZFb était absent dans 4% versus 1 à 8% [10,65]. Enfin, l'atteinte de l'ensemble des loci d'AZF représente 4% des patients contre 3 à 5% dans la littérature [66].

Le gène *CFTR* est responsable de mucoviscidose de transmission autosomique récessive mais est également impliqué dans des pathologies moins sévères. En effet, il s'agit du principal gène incriminé dans les tableaux d'agénésie bilatérale des canaux déférents chez des hommes présentant une infertilité par azoospermie obstructive. Il est retrouvé muté sur les deux allèles

dans près de 80% des ABCD [42]. L'indication pour l'analyse du gène *CFTR* repose sur un diagnostic clinique, biologique et radiologique d'une agénésie bilatérale des canaux déférents. De 1993 à 2018, sur les 101 demandes, seuls 36 patients étaient porteurs de deux mutations. Cette différence suggère que dans la majorité des cas, le tableau clinico-biologique n'est pas suffisamment en faveur d'une ABCD. L'association de la mutation CF c.1521\_1523delCTT et de la mutation *CFTR*-RD c.1210-34\_1210-6TG[12]T[5] a été identifiée chez 10 des 36 patients positifs soit 28%, représentant le génotype le plus fréquent dans la cohorte étudiée, ce qui est conforme aux données de la littérature [62].

L'analyse du gène *ADGRG2*, de mise en place récente, est un examen de seconde intention. Elle est à effectuer en présence d'une agénésie bilatérale des canaux déférents lorsque la recherche de mutation du gène *CFTR* n'a pas mis en évidence deux mutations et qu'il n'existe pas d'anomalie rénale associée.

La finalité de la seconde partie de l'étude était de réussir à expliquer une partie des cas non étiquetés d'agénésie bilatérale des canaux déférents après analyse du gène *CFTR* à partir de la cohorte des patients infertiles de sexe masculin du CHU de Bordeaux sur la période de 1993 à 2018.

Nous avons donc repris tous les dossiers pour lesquels une analyse du gène *CFTR* n'a pas permis de mettre en évidence deux variants pouvant expliquer l'ABCD. En utilisant des critères très stricts, de nombreux patients ont été exclus, réduisant le nombre de sujets dans l'étude. Cependant, le fait de sélectionner une population de même phénotype permettait d'augmenter la probabilité de détecter un gène commun responsable d'agénésie bilatérale des canaux déférents.

En parallèle, pour un patient sur les huit, l'analyse du gène *CFTR* datant de 2003 a été reprise avec la technique NGS, ce qui a permis d'identifier une seconde mutation dans ce gène. Il a pu ainsi obtenir un diagnostic de certitude et bénéficier d'un conseil génétique sur le risque de transmission à sa descendance et sur la nécessité d'informer les membres de sa famille afin qu'ils puissent être testés pour ces mutations. Pour les autres patients, aucune mutation supplémentaire du gène n'a été retrouvée lors du séquençage de nouvelle génération.

Sur les sept candidats restants dans notre étude, un patient était porteur d'une mutation du gène *ADGRG2* soit 14% en sachant qu'une analyse parmi les sept est en cours. Ceci est concordant avec l'étude française [46] qui retrouve quatre patients atteints sur les 26 analysés. Le patient porteur d'une mutation du gène *ADGRG2* a également été adressé aux conseillers en génétique pour lui expliquer les conséquences sur la descendance. En effet, le gène se situant sur le chromosome X, la mutation sera systématiquement transmise à ses filles qui seront conductrices. Les enfants de sexe masculin de ces dernières auront un risque de 50% d'hériter de la mutation responsable d'une ABCD isolée.

L'analyse des deux gènes connus dans les ABCD a conduit à 25% d'élucidation dans la population de patients bordelais (2 patients sur 8). Il serait intéressant, en prenant la même population ciblée, d'identifier de nouveaux gènes candidats. Il est admis que le génome humain est composé de l'ordre de 3 milliards de paires de bases. Les exons ne représentent qu'environ un pour cent du génome, pourtant on y trouve la majeure partie des mutations connues (85%). Le Whole Exome Sequencing ou WES est le séquençage haut débit de l'ensemble des séquences codantes du génome, aussi appelé exome. Cette analyse, à partir d'une très faible quantité d'ADN extrait des leucocytes sanguins, permet d'obtenir un exome de manière rapide et de le comparer de manière bio-informatique à la séquence de référence pour filtrer des variations potentiellement pathogènes. Les données générées sont traitées de manière bio-informatique par des logiciels d'interprétation. L'ensemble nécessite des capacités de stockage importantes. Cette technique est très utilisée pour identifier des gènes candidats. L'autre technique récente et plus exhaustive est le Whole Genome Sequencing ou WGS qui correspond au séquençage de l'ensemble du génome, c'est-à-dire les séquences codantes, les exons et les séquences non codantes, les introns au sein des gènes et également les séquences intergéniques. Des variations entraînant des altérations de l'expression de gènes ayant été identifiées en dehors des séquences codantes, le WGS apparaît essentiel pour avancer dans l'identification de nouvelles mutations. L'interprétation reste cependant délicate et ce séquençage, WES ou WGS n'est, pour l'instant, pas utilisé en diagnostic clinique pour l'azoospermie au CHU de Bordeaux. Ces deux techniques sont des perspectives à envisager. En effet, il serait intéressant d'étudier l'ensemble des gènes afin d'en déduire un possible profil mutationnel spécifique de la population d'hommes infertiles. Toutefois, cela implique des coûts bien plus élevés et une mise en place plus difficile. Outre les inconvénients

économiques et organisationnels, il faut aussi considérer les aspects éthiques liés à la découverte d'évènements secondaires et d'évènements non recherchés.

Les difficultés d'interprétation de nombreux variants nouveaux sont également à prendre en considération. En effet, les variations situées entre autres dans les séquences non codantes sont souvent de signification indéterminée et de conséquences très variables. Les logiciels d'interprétation sont des aides mais ne donnent que des prédictions, seules des analyses fonctionnelles peuvent confirmer le caractère délétère d'un variant. Elles ne sont pour la plupart développées que dans des laboratoires de recherche et leur transfert en contexte hospitalier reste limité actuellement.

De plus, pour être à même d'interpréter correctement l'implication d'un nouveau gène dans le phénotype d'agénésie bilatérale des canaux déférents, il est important d'étudier la physiopathologie. Les quelques données recueillies sur des analyses de deux fœtus masculins décédés suite à une interruption médicale de grossesse liée au diagnostic anténatal de mucoviscidose, fait état de la présence des canaux déférents jusqu'à 18 semaines d'aménorrhée [67].

De récents travaux sur les nouvelles molécules disponibles dans le traitement de la mucoviscidose, ont, par ailleurs, fait état d'une réversibilité de la fonction pancréatique lors de l'introduction précoce du traitement par Ivacaftor chez des enfants atteints de mucoviscidose âgés de 12 à 24 mois [68]. Ceci laisse supposer l'idée d'une possible réversibilité de l'atteinte des canaux déférents qu'il est nécessaire d'étudier. Si cela s'avérait possible, les hommes atteints de mucoviscidose retrouveraient une fertilité probablement normale. Le recours à l'assistance médicale à la procréation ne serait plus systématique.

Enfin, des études sur des modèles animaux ont montré que les furets, dont le gène *CFTR* a été invalidé, présentaient une dégénérescence ou une absence des canaux déférents à la naissance, tout comme des porcs mutés pour lesquels les canaux déférents étaient partiellement ou totalement en atrésie en période néonatale.

Les analyses cytologiques et histologiques des canaux déférents montraient des anomalies tissulaires, notamment des plages de tissus fibreux ainsi qu'une sécrétion d'anions, induite

par l'AMP cyclique, insuffisante pour prévenir les mécanismes responsables d'anomalies anatomiques du tractus génital masculin. La théorie de la régression des canaux déférents liée à une accumulation de mucus a été infirmée dans l'étude des porcs. En effet, il n'y avait pas de différence de quantité de mucus dans les canaux déférents entre les porcs sauvages et les porcs mutés [69, 70]. Ceci amène à réfléchir sur de nouvelles approches physiopathologiques et sur l'implication de nouveaux gènes. Chez les souris, de nombreux gènes associés à l'infertilité masculine sont connus, notamment des gènes intervenant durant la méiose au cours de la spermatogénèse. Le gène *SYCP3* code pour la protéine du même nom, liée à l'ADN et appartenant au complexe synaptonémal permettant l'appariement des chromosomes homologues lors de la première division de la méiose dans les cellules germinales. Ce complexe est composé de deux autres protéines de la même famille : *SYCP1* et *SYCP2*. Ces trois gènes n'étant exprimés chez la souris que dans les testicules et les ovaires sont considérés comme spécifiques des cellules germinales. Des résultats suggèrent que *SYCP3* est essentiel dans la spermatogénèse [71]. En effet, il a été montré qu'une souris mâle homozygote pour une mutation de ce gène était stérile par destruction massive de cellules germinales dans les testicules lors de la prophase de la méiose. Chez ces souris mâles porteuses du gène déficient, le complexe synaptonémal ne se forme pas, ne permettant donc pas l'appariement des chromosomes homologues provoquant ainsi un arrêt de la méiose [72].

Devant la découverte de l'importance de la protéine *SYCP3* dans la fertilité chez les souris, des travaux ont été réalisés dans la population humaine. Le gène composé de neuf exons, se situe sur le chromosome 12. L'expression du gène a été retrouvée exclusivement au niveau testiculaire chez les hommes comme cela est le cas chez les souris mâles. Une mutation non-sens (643delA) a été observée chez des hommes infertiles présentant une azoospermie non obstructive. Sur leur biopsie testiculaire, aucune cellule post-méiotique n'a été retrouvée. Le diagnostic retenu était celui d'un arrêt précoce et complet de la maturation de la spermatogénèse. La mutation 643delA à l'état hétérozygote a donc un effet négatif dominant sur l'allèle sauvage. Cependant, des études postérieures réalisées par d'autres équipes ne retrouvent pas d'association probante entre la présence d'une mutation du gène *SYCP3* et un arrêt de la méiose lors de la spermatogénèse chez l'Homme [73]. De nouvelles investigations sont nécessaires afin de comprendre le rôle du gène dans l'infertilité masculine.

Contrairement au phénotype d'agénésie bilatérale des canaux déférents qui est très souvent expliquée par des atteintes du gène *CFTR*, une grande part des azoospermies non obstructives sont encore sans diagnostic étiologique. Un important travail reste à faire dans le diagnostic étiologique de l'infertilité masculine. A titre d'exemple, il a récemment été montré que les champs d'investigation du chromosome Y restaient larges. En effet, le séquençage de celui-ci permet d'étudier l'évolution humaine et de mettre en évidence des gènes intervenant dans des pathologies vasculaires ou neurologiques [74].

## IV. Conclusion et Perspectives

La génétique et l'assistance médicale à la procréation sont intimement liées. La génétique est une cause importante d'infertilité et une prise en charge en AMP est souvent nécessaire pour les patients atteints de pathologies génétiques.

Dans le cadre de la découverte d'une azoospermie, un bilan génétique est indispensable. Selon le caractère obstructif ou non, les analyses diffèrent.

Devant une azoospermie d'allure obstructive avec un bilan en faveur d'une agénésie bilatérale des canaux déférents, il est essentiel de rechercher en première intention des atteintes du gène *CFTR* car ces dernières sont retrouvées dans 80% des tableaux typiques dans les populations d'origine caucasienne. Cependant, cette incidence est nettement plus faible dans les pays asiatiques suggérant l'existence d'autres mécanismes physiopathologiques responsables du même phénotype.

Le gène *ADGRG2* a été découvert en 2016 par les équipes lilloise et toulousaine [46] à la suite d'un séquençage de nouvelle génération. L'exome a été réalisé chez des patients avec le phénotype d'agénésie bilatérale des canaux déférents mais n'ayant pas deux mutations du gène *CFTR* pour expliquer le tableau. Le gène *ADGRG2* faisait partie des gènes potentiellement candidats identifiés dans l'étude. C'est le caractère spécifique de son expression au niveau des canaux efférents qui a permis de l'incriminer dans les phénotypes d'ABCD. Il est désormais intéressant de demander son analyse en seconde intention, après recherche exhaustive des mutations du gène *CFTR*.

Les mutations introniques profondes nouvellement décrites du gène *CFTR* n'ont pas été, pour l'heure, identifiées dans la population d'hommes infertiles. La mise en place en pratique courante de cette recherche pourrait permettre d'expliquer quelques agénésies bilatérales des canaux déférents, en fonction de l'origine géographique des patients.

D'autre part, lors de la découverte d'anomalies génétiques, une prise en charge avec un conseil génétique est essentielle. Il est important d'expliquer au couple les risques qu'il peut exister pour leur descendance. L'information est aussi capitale pour les membres de la famille. Lorsque le ou les membres du couple ne souhaite(nt) pas transmettre l'anomalie, il peut leur être proposé une prise en charge en assistance médicale à la procréation avec un diagnostic préimplantatoire.

La prise en charge en AMP pour les patients dont l'infertilité est expliquée par une agénésie bilatérale des canaux déférents est soumise à la même réglementation que les couples sans atteinte génétique. Selon le bilan clinico-biologique, il peut être proposé au couple la réalisation d'une ponction testiculaire pour extraction de spermatozoïdes dans le cadre d'une fécondation *in vitro* par ICSI en AMP intraconjugale, une insémination intra utérine ou une fécondation *in vitro* avec sperme de donneur. La dernière technique proposée est l'accueil d'embryon dans des cas particuliers, notamment une insuffisance ovarienne prématurée associée ou une pathologie génétique chez la conjointe.

Depuis janvier 2019, le plan France Médecine Génomique 2025 a été ouvert pour la recherche génétique de l'insuffisance ovarienne primitive par séquençage du génome dans la pratique clinique. Elle fait partie des douze préindications retenues par la Haute Autorité de Santé. L'infertilité est donc un problème de Santé Publique au cœur des préoccupations de la classe politique car il concerne l'ensemble de la société et à long terme l'avenir de l'espèce humaine. Cette actualité permet d'espérer un engouement similaire pour le développement de la recherche en génétique dans le cadre des infertilités masculines.

Les perspectives ouvertes par le séquençage haut débit et le séquençage de long fragment d'une molécule d'ADN, permettant le reséquençage du chromosome Y font envisager des nouvelles informations sur la séquence et la structure des répétitions et des palindromes, et de nouvelles anomalies à explorer chez les patients infertiles restant sans diagnostic étiologique.

Enfin, le diagnostic sera peut-être posé à partir d'un dosage d'acides nucléiques circulants. Ils comprennent les micro-ARNs et l'ADN libre. Ce dernier correspond à des molécules d'ADN double brin, présentes sous différentes tailles de fragments. Ces fragments proviennent du



relargage d'ADN mitochondrial ou nucléaire liés à des phénomènes apoptotiques ou nécrotiques cellulaires. Les micro-ARNs correspondent à de très petites séquences non codantes d'ARN simple brin qui régulent l'expression des gènes en interférant avec les ARNm cibles [75].

Les acides nucléiques circulants sont choisis comme biomarqueurs non invasifs diagnostiques et pronostiques car ils se détectent facilement dans les liquides de l'organisme. A l'instar de biomarqueurs utilisables pour l'évaluation de la réserve ovarienne chez la femme, certains marqueurs permettraient de détecter des anomalies de la spermatogénèse chez l'homme, notamment l'ADN libre séminal. Il a été mis en évidence pour la première fois en 2004 par une équipe américaine [76]. La concentration d'ADN libre dans le plasma séminal semble plus élevée dans le cadre d'une azoospermie [77]. Il a été démontré que des micro-ARNs intervenaient au cours de la spermatogenèse des mammifères [78] notamment en régulant les mécanismes post-transcriptionnels [79]. Or différentes études ont permis la mise en évidence d'une variation de l'expression de certains micro-ARNs dans le plasma séminal ainsi que dans le sperme total de patients avec une azoospermie non obstructive, en comparaison à une population d'hommes fertiles. En effet, une étude [80] a montré une diminution significative de la concentration de 7 micro-ARNs dans le plasma séminal de patients avec azoospermie par rapport au groupe contrôle. Parmi eux, miR-34c, impliqué dans la spermatogenèse chez la souris, est produit spécifiquement dans les cellules germinales aux stades tardifs de la méiose [81]. Dans deux autres études [82,83], l'expression de 5 micro-ARNs était augmentée dans le tissu testiculaire parallèlement à leurs concentrations dans le plasma séminal. Il s'agit en particulier de let7-a appartenant à la famille représentant la plus grande quantité de micro-ARNs dans les testicules (80% des micro-ARNs totaux au niveau de testicules pré-pubères chez des souris) [84].

Ces biomarqueurs représentent une perspective d'avenir intéressante pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'infertilité masculine. Ils permettent d'envisager de nouveaux tests dits « compagnons » et sont des cibles possibles pour des futurs traitements régulant leur expression.

## V. Bibliographie

- [1] F. Zegers-Hochschild *et al.*, « The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009 », *Hum. Reprod.*, vol. 24, n° 11, p. 2683-2687, nov. 2009.
- [2] M. Bendayan *et al.*, « [Environment and lifestyle: Impacts on male fertility?] », *Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.*, vol. 46, n° 1, p. 47-56, janv. 2018.
- [3] J. Hotaling et D. T. Carrell, « Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions », *Andrology*, vol. 2, n° 3, p. 339-350, mai 2014.
- [4] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology, « Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion », *Fertil. Steril.*, vol. 109, n° 5, p. 777-782, 2018.
- [5] C. Coat *et al.*, « [Azoospermia: management and results: a series of 90 cases] », *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.*, vol. 21, n° 13, p. 946-954, déc. 2011.
- [6] A. Georges, M. Commenges, A. Papaxanthos, C. Matthieu, J. L. Pariente, et L. Bordenave, « Intérêt du dosage d'inhibine B dans l'exploration d'une stérilité masculine grave en vue d'AMP », *Immuno-Anal. Biol. Spéc.*, vol. 17, n° 3, p. 176-180, juin 2002.
- [7] J. Schlosser, I. Nakib, F. Carré-Pigeon, et F. Staerman, « [Male infertility: definition and pathophysiology] », *Ann. Urol.*, vol. 41, n° 3, p. 127-133, juin 2007.
- [8] Y. Fulla, J. Auger, S. Allali, L. Nonnenmacher, et P. Jouannet, « L'Inhibine B sérique, marqueur sensible de la production spermatique chez l'homme », *Andrologie*, vol. 11, n° 1, p. 21, mars 2001.
- [9] M.-C. Vincent *et al.*, « Cytogenetic Investigations of Infertile Men With Low Sperm Counts: A 25-Year Experience », *J. Androl.*, vol. 23, n° 1, p. 18-22, 2002.
- [10] C. Krausz, L. Hoefsloot, M. Simoni, F. Tüttelmann, European Academy of Andrology, et European Molecular Genetics Quality Network, « EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 », *Andrology*, vol. 2, n° 1, p. 5-19, janv. 2014.
- [11] J. P. Siffroi, S. Chantot-Bastarud, et C. Ravel, « [Genetic origin of spermatogenesis impairments: clinical aspects and relationships with mouse models of infertility] », *Gynecol. Obstet. Fertil.*, vol. 31, n° 6, p. 504-515, juin 2003.
- [12] H. Lejeune, A. Brosse, Groupe Fertipreserve, et I. Plotton, « [Fertility in Klinefelter syndrome] », *Presse Medicale Paris Fr. 1983*, vol. 43, n° 2, p. 162-170, févr. 2014.
- [13] R. B. Sciarano *et al.*, « Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 24, n° 9, p. 2353-2360, sept. 2009.
- [14] I. Plotton, A. Brosse, B. Cuzin, et H. Lejeune, « Klinefelter syndrome and TESE-ICSI », *Ann. Endocrinol.*, vol. 75, n° 2, p. 118-125, mai 2014.
- [15] L. Aksglaede, A. M. Wikström, E. Rajpert-De Meyts, L. Dunkel, N. E. Skakkebaek, et A. Juul, « Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome », *Hum. Reprod. Update*, vol. 12, n° 1, p. 39-48, févr. 2006.
- [16] A. Rock, F. Marcelli, G. Robin, V. Mitchell, C. Leroy, et J.-M. Rigot, « [Clinical and paraclinical features of Klinefelter syndrome consulting for male infertility] », *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.*, vol. 24, n° 12, p. 757-763, oct. 2014.
- [17] H. Tournaye *et al.*, « Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients »,

*Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 11, n° 8, p. 1644-1649, août 1996.

- [18] S. Friedler, A. Raziell, D. Strassburger, M. Schachter, O. Bern, et R. Ron-El, « Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome », *Hum. Reprod.*, vol. 16, n° 12, p. 2616-2620, déc. 2001.
- [19] S. Gunes *et al.*, « Two Males with SRY-Positive 46,XX Testicular Disorder of Sex Development », *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 59, n° 1, p. 42-47, févr. 2013.
- [20] L. Martinerie *et al.*, « Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys », *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 166, n° 4, p. 687-694, avr. 2012.
- [21] D. Sanlaville et C. Turleau, « Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques ». [En ligne]. Disponible sur: [http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique\\_19/site/html/1\\_6.html](http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique_19/site/html/1_6.html). [Consulté le: 03-mars-2019].
- [22] R. Suganthi, V. V. Vijesh, N. Vandana, et J. Fathima Ali Benazir, « Y Chromosomal Microdeletion Screening in The Workup of Male Infertility and Its Current Status in India », *Int. J. Fertil. Steril.*, vol. 7, n° 4, p. 253-266, 2014.
- [23] M. Simoni, F. Tüttelmann, J. Gromoll, et E. Nieschlag, « Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience », *Reprod. Biomed. Online*, vol. 16, n° 2, p. 289-303, janv. 2008.
- [24] A. M. Matsumoto et W. J. Bremner, « Chapter 19 - Testicular Disorders », in *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*, S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, et H. M. Kronenberg, Éd. Philadelphia: Content Repository Only!, 2016, p. 694-784.
- [25] S. E. Kleiman *et al.*, « Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? », *Fertil. Steril.*, vol. 98, n° 1, p. 43-47.e2, juill. 2012.
- [26] B. Maurer et M. Simoni, « Y chromosome microdeletion screening in infertile men », *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 23, n° 10, p. 664-670, nov. 2000.
- [27] L. Visser *et al.*, « Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 24, n° 10, p. 2667-2673, oct. 2009.
- [28] J. R. Riordan *et al.*, « Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA », *Science*, vol. 245, n° 4922, p. 1066-1073, sept. 1989.
- [29] D. C. Gadsby, P. Vergani, et L. Csanády, « The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis », *Nature*, vol. 440, n° 7083, p. 477-483, mars 2006.
- [30] H. Corvol, J. Taytard, O. Tabary, P. Le Rouzic, L. Guillot, et A. Clement, « Les enjeux de la médecine personnalisée appliquée à la mucoviscidose », *Arch. Pédiatrie*, vol. 22, n° 7, p. 778-786, juill. 2015.
- [31] Collège National des Pédiatres Universitaires, « Mucoviscidose chez l'enfant ». [En ligne]. Disponible sur: [http://campus.cerimes.fr/media/campus/deploiement/pediatrie/enseignement/mucoviscidose\\_enfant/site/html/2.html](http://campus.cerimes.fr/media/campus/deploiement/pediatrie/enseignement/mucoviscidose_enfant/site/html/2.html). [Consulté le: 03-mars-2019].
- [32] H. Cai *et al.*, « CFTR variants and renal abnormalities in males with congenital unilateral absence of the vas deferens (CUAVD): a systematic review and meta-analysis of observational studies », *Genet. Med.*, p. 1, sept. 2018.
- [33] Y. Sajjad, « Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo », *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 36, n° 5, p. 929-937, oct. 2010.
- [34] D. G. Darcy, M. Yao-Cohen, T. R. Olson, et S. A. Downie, « Unilateral Complete

- Agenesis of Mesonephric Duct Derivatives in an 82-year-Old Male Cadaver: Embryology, Anatomy and Clinical Considerations », *Urol. Case Rep.*, vol. 15, p. 20-22, sept. 2017.
- [35] S. Bouyé *et al.*, « [Andrological description of a population of azoospermic men with agenesis of the vas deferens] », *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.*, vol. 24, n° 2, p. 132-137, févr. 2014.
- [36] J. Zielenski, « Genotype and phenotype in cystic fibrosis », *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.*, vol. 67, n° 2, p. 117-133, 2000.
- [37] M. Bouhamdan<sup>1</sup>, X. Youming<sup>2</sup>, et F. Sun<sup>1</sup>, « Structure-Function Relationships of CFTR in Health and Disease: The Pancreas Story », *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base*, mars 2018.
- [38] F. A. L. Marson, C. S. Bertuzzo, et J. D. Ribeiro, « Classification of CFTR mutation classes », *Lancet Respir. Med.*, vol. 4, n° 8, p. e37-e38, août 2016.
- [39] S. Ellard *et al.*, « ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2018 », p. 16, 2018.
- [40] L. M. Amendola *et al.*, « Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 99, n° 1, p. 247, juill. 2016.
- [41] G. Veit *et al.*, « From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations », *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, n° 3, p. 424-433, févr. 2016.
- [42] D. a. S. de Souza, F. R. Faucz, L. Pereira-Ferrari, V. S. Sotomaior, et S. Raskin, « Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling », *Andrology*, vol. 6, n° 1, p. 127-135, 2018.
- [43] H. Cuppens et J.-J. Cassiman, « CFTR mutations and polymorphisms in male infertility », *Int. J. Androl.*, vol. 27, n° 5, p. 251-256, oct. 2004.
- [44] V. Mak, K. A. Jarvi, J. Zielenski, P. Durie, et L. C. Tsui, « Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 6, n° 12, p. 2099-2107, nov. 1997.
- [45] E. Dequeker *et al.*, « Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations », *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 17, n° 1, p. 51-65, janv. 2009.
- [46] O. Patat *et al.*, « Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 99, n° 2, p. 437-442, 04 2016.
- [47] B. Davies *et al.*, « Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n° 19, p. 8642-8648, oct. 2004.
- [48] P. Yuan *et al.*, « Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles », *Andrology*, vol. 0, n° 0.
- [49] R. I. McLachlan et M. K. O'Bryan, « State of the Art for Genetic Testing of Infertile Men », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, n° 3, p. 1013-1024, mars 2010.
- [50] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, « Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion », *Fertil. Steril.*, vol. 103, n° 3, p. e18-25, mars 2015.
- [51] C. Le Caignec, « Caryotype humain : Technique - Indications », p. 8, 2011 2010.
- [52] S. Kebir, « Le caryotype ». .
- [53] « Guide de bonnes pratiques en cytogénétique Version 3 - 2014 », p. 1-74, 2014.

- [54] V. Malan et S. Romana, « Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention », *Arch. Pédiatrie*, vol. 19, n° 4, p. 437-442, avr. 2012.
- [55] « Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/AMP>. [Consulté le: 24-févr-2019].
- [56] R. Flannigan, P. V. Bach, et P. N. Schlegel, « Microdissection testicular sperm extraction », *Transl. Androl. Urol.*, vol. 6, n° 4, p. 745-752, août 2017.
- [57] M. Grynberg *et al.*, « [Non-obstructive azoospermia: option of the testicular sperm extraction performed on the day of oocyte retrieval] », *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, vol. 40, n° 2, p. 130-136, avr. 2011.
- [58] ANPGM, « BONNES PRATIQUES DES ETUDES DU GENE CFTR », ASSOCIATION NATIONALE DES PRATICIENS DE GENETIQUE MOLECULAIRE. [En ligne]. Disponible sur: [https://anpgm.fr/media/documents/ANPGM\\_074-v3-CFTR.pdf](https://anpgm.fr/media/documents/ANPGM_074-v3-CFTR.pdf). [Consulté le: 17-mars-2019].
- [59] « Arrêté du 1er juin 2015 déterminant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités d'accès, de prise en charge des femmes enceintes et des couples, d'organisation et de fonctionnement des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal en matière de diagnostic prénatal et de diagnostic préimplantatoire ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/GT-DPI>. [Consulté le: 17-mars-2019].
- [60] E. M. Dahdouh, J. Balayla, et F. Audibert, « Mise à jour technique : Diagnostic et dépistage génétiques préimplantatoires », *J. Obstet. Gynaecol. Can. JOGC J. Obstet. Gynecol. Can. JOGC*, vol. 38, n° 12S, p. S629-S645, déc. 2016.
- [61] D. Beauvillard *et al.*, « [Congenital bilateral absence of vas deferens: From diagnosis to assisted reproductive techniques - the experience of three centers] », *Gynecol. Obstet. Fertil.*, vol. 43, n° 5, p. 367-374, mai 2015.
- [62] C. Bombieri *et al.*, « Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders », *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*, vol. 10 Suppl 2, p. S86-102, juin 2011.
- [63] P. N. Schlegel, D. Shin, et M. Goldstein, « Urogenital anomalies in men with congenital absence of the vas deferens », *J. Urol.*, vol. 155, n° 5, p. 1644-1648, mai 1996.
- [64] A. de la Taille *et al.*, « Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens », *Br. J. Urol.*, vol. 81, n° 4, p. 614-619, avr. 1998.
- [65] S. Y. Kim, H. J. Kim, B. Y. Lee, S. Y. Park, H. S. Lee, et J. T. Seo, « Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men with Non-obstructive Azoospermia and Severe Oligozoospermia », *J. Reprod. Infertil.*, vol. 18, n° 3, p. 307-315, sept. 2017.
- [66] D. Lo Giacco *et al.*, « Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory », *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 22, n° 6, p. 754-761, juin 2014.
- [67] D. A. Gaillard, « Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis », *J. Urol.*, vol. 158, n° 4, p. 1549-1552, oct. 1997.
- [68] M. Rosenfeld *et al.*, « Ivacaftor treatment of cystic fibrosis in children aged 12 to <24 months and with a CFTR gating mutation (ARRIVAL): a phase 3 single-arm study », *Lancet Respir. Med.*, vol. 6, n° 7, p. 545-553, 2018.
- [69] X. Sun *et al.*, « Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis », *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n° 9, p. 3149-3160, sept. 2010.

- [70] F. Pierucci-Alves, V. Akoyev, J. C. Stewart, L.-H. Wang, K. S. Janardhan, et B. D. Schultz, « Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth », *Biol. Reprod.*, vol. 85, n° 3, p. 442-451, sept. 2011.
- [71] M. Aarabi, M. H. Modarressi, H. Soltanghorae, R. Behjati, N. Amirjannati, et M. M. Akhondi, « Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia », *Fertil. Steril.*, vol. 86, n° 2, p. 325-331, août 2006.
- [72] L. Yuan, J. G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, et C. Höög, « The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility », *Mol. Cell*, vol. 5, n° 1, p. 73-83, janv. 2000.
- [73] H. Gurkan, F. Aydin, A. Kadioglu, et S. Palanduz, « Investigation of mutations in the synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) gene among azoospermic infertile male patients in the Turkish population », *Andrologia*, vol. 45, n° 2, p. 92-100, avr. 2013.
- [74] M. A. Jobling et C. Tyler-Smith, « Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 18, n° 8, p. 485-497, 2017.
- [75] E. Scalici *et al.*, « [Circulating nucleic acids and infertility] », *Gynecol. Obstet. Fertil.*, vol. 43, n° 9, p. 593-598, sept. 2015.
- [76] J. S. Chou, J. D. Jacobson, W. C. Patton, A. King, et P. J. Chan, « Modified Isocratic Capillary Electrophoresis Detection of Cell-free DNA in Semen », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 21, n° 11, p. 397-400, nov. 2004.
- [77] H.-G. Li, S.-Y. Huang, H. Zhou, A.-H. Liao, et C.-L. Xiong, « Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities », *Asian J. Androl.*, vol. 11, n° 6, p. 703-709, nov. 2009.
- [78] Z. He, M. Kokkinaki, D. Pant, G. I. Gallicano, et M. Dym, « Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis », *Reproduction*, vol. 137, n° 6, p. 901-911, juin 2009.
- [79] M. D. Papaioannou et S. Nef, « microRNAs in the Testis: Building Up Male Fertility », *J. Androl.*, vol. 31, n° 1, p. 26-33, 2010.
- [80] C. Wang *et al.*, « Altered Profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility », *Clin. Chem.*, vol. 57, n° 12, p. 1722-1731, déc. 2011.
- [81] F. Bouhallier *et al.*, « Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis », *RNA*, vol. 16, n° 4, p. 720-731, avr. 2010.
- [82] W. Wu *et al.*, « Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status », *MHR Basic Sci. Reprod. Med.*, vol. 18, n° 10, p. 489-497, oct. 2012.
- [83] W. Wu *et al.*, « Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p », *Hum. Reprod.*, vol. 28, n° 7, p. 1827-1836, juill. 2013.
- [84] G. M. Buchold, C. Coarfa, J. Kim, A. Milosavljevic, P. H. Gunaratne, et M. M. Matzuk, « Analysis of MicroRNA Expression in the Prepubertal Testis », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 12, déc. 2010.

## VI. Annexes

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdélétion AZF
1478	19	Infertilité	Oligospermatozoospermie sévère	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1741	34	ABCD	Cryptozoospermie, pathologie épидидymo-déférentielle sans précision	NR	c.28566>C (p.Met952Ile, M952I) HTZ	Absence	NR
2857	26	Azoospermie	Cryptozoospermie, normospermie, pH 7,7, échographie normale	Normale	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3220	31	Infertilité	Oligospermatozoospermie sévère	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
3243	35	Infertilité	Cryptozoospermie	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	AZFc complète
3738	36	Infertilité	Oligospermatozoospermie sévère	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3830	47	Infertilité	Cryptozoospermie	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
121180	33	Infertilité	Asthénospermatozoospermie, numération : 40 M/mL, échographie normale	Non fait	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
122271	37	Infertilité	Cryptozoospermie obstructive	NR	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
122584	32	ABCD	Oligospermatozoospermie, nécospermie, varicocèle gauche de grade II, Hypospermie, bilan hormonal normal, échographie normale	Non fait	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6T[G12]T[5] HTZ	Absence
142050	30	Infertilité	Oligospermatozoospermie sévère, normospermie, bilan hormonal normal, échographie normale	NR	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
172514	36	Infertilité	Numération : 15 M/mL	Non fait	Absence (kit 35 mutations)	Absence	NR
183670	42	Infertilité avec antécédents familiaux de mucoviscidose	Numération : 120 M/mL, normospermie	Non fait	Absence (NGS)	Absence	NR
183751	26	Torsion testiculaire	Numération : 80 M/mL, disjonction épидидymo-testiculaire bilatérale	Non fait	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Non fait

Annexe 1 Caractéristiques du groupe de patients sans azoospermie (n=14)  
NR : Non Renseigné

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdéletion AZF
1325	42	ABCD	ABCD	NR	c.350G>A (p.Arg117His, R117H) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1522	31	ABCD	ABCD	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1580	27	Azoospermie	Azoospermie excrétoire, hypospermie, pH acide	NR	c.3528delC (p.Lys1175Serfs*15, 3659delC) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1631	31	ABCD	ABCD (biologie typique)	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1634	38	ABCD	ABCD (biologie typique)	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.617T>G (p.Leu206Trp, L206W) HTZ	NR
1747	40	ABCD	ABCD (agénésie des queues épидидymaires)	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1752	33	ABCD	ABCD	NR	c.1624G>T (p.Gly542*, G542X) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1770	38	ABCD	ABCD	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1849	25	ABCD	Suspicion ABCD, azoospermie, pH acide, hypospermie	NR	c.2051_2052delinsG p.(Lys684Serfs*38, 2183AAA>G) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
1891	29	ABCD	Suspicion ABCD, azoospermie, pH acide, hypospermie	NR	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HMZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
2187	36	Infertilité	Frère porteur d'une ABCD avec mutation Cf, cousin atteint de mucopolysaccharidose	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
2583	35	AUCD	Agénésie unilatérale d'un canal déférent sans précision	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1865G>A (p.Gly622Asp, G622D) HTZ c.3717>45G>A p.(=), 3849>45G>A HTZ	NR
2737	26	ABCD	Suspicion d'ABCD	NR	c.1657C>T (p.Arg553*, R553X) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
2761	26	Azoospermie	Azoospermie excrétoire, normospermie, pH 7.2	Normale	allèle complexe c.220C>T (p.Arg747Trp, R747W) et c.3808G>A (p.Asp1270Asn, D1270N) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
2766	39	Infertilité	Azoospermie excrétoire, normospermie, pH 7.2	NR	c.3189G>A (p.Trp1063*, W1063X) HMZ	c.1408A>G (p.Met670Val, M670V) HMZ	NR
2920	37	ABCD	Suspicion d'ABCD, problèmes pulmonaires dans l'enfance	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.509G>A (p.Arg170His, R170H) HTZ	c.3208C>T (p.Arg1070Trp, R1070W) HTZ	NR
2973	29	ABCD	ABCD, azoospermie excrétoire, Test de la sueur 40 et 45 mmol/L, signes respiratoires	NR	c.1519_1521delATC (p.Ile507del, ΔI507) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
2980	50	ABCD	Suspicion d'ABCD, azoospermie, hypospermie, pH 7.8	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
3043	33	Azoospermie	Suspicion d'ABCD, azoospermie	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.390G>A (p.Arg117His, R117H) HTZ	NR
3446	25	ABCD	ABCD	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
3474	39	Infertilité	Probable ABCD	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.274-6T>C (p.(=), 406-6T>C) HTZ	Absence
3583	25	ABCD	ABCD	NR	c.350G>A (p.Arg117His, R117H) HTZ	c.3276C>A (p.Tyr1092*, Y1092X) HTZ	Absence
3847	40	Azoospermie	Suspicion d'ABCD, azoospermie, normospermie, pH 6.5	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.617T>G (p.Leu206Trp, L206W) HTZ	NR
111804	32	Infertilité	Azoospermie, normospermie, pH 7, dilatation différentielle droite, atrophie épидидyme gauche, bilan hormonal normal	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1052C>G (p.Thr351Ser, T351S) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
121068	35	ABCD	ABCD, azoospermie, bilan hormonal normal	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
140998	43	ABCD	Azoospermie, bilan hormonal normal, examen clinique normal	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.579>1G>T (p.?, 711>1G>T) HTZ	c.617T>G (p.Leu206Trp, L206W) HTZ	NR
141881	34	Infertilité	Azoospermie sans précision	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	c.3276C>A (p.Tyr1092*, Y1092X) HTZ	NR
160058	34	ABCD	ABCD, azoospermie, pH 6.5, bilan hormonal normal	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.3454G>C (p.Asp1152His, D1152H) HTZ	Absence
160619	35	ABCD	ABCD, azoospermie, pH 6.5, hypospermie, bilan hormonal normal	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1657C>T (p.Arg553*, R553X) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
161149	30	Infertilité	ABCD, frère porteur d'une ABCD avec mutation Cf, pH 6.5, bilan hormonal normal	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1657C>T (p.Arg553*, R553X) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	NR
170996	38	ABCD	ABCD, azoospermie excrétoire, pH 7.5, hypospermie, bilan hormonal normal, échographie normale	Non fait	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.2813T>G (p.Val938Gly, V938G) CFTR-RD	Non fait
172871	36	Azoospermie	Azoospermie, hypospermie, bilan hormonal normal, clinique normale, pH 6.5	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.617T>G (p.Leu206Trp, L206W) HTZ	Absence
180524	37	Infertilité	Azoospermie, hypospermie, pH 7, bilan hormonal normal, échographie normale	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Absence
181685	34	Infertilité	ABCD clinique, azoospermie, hypospermie, pH 6.5	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Del Gr/Gr
181594	33	Infertilité	ABCD clinique, azoospermie, hypospermie, pH 6.5	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1327G>T:1727G>C:2002C>T HTZ	Absence
183644	27	Azoospermie	Azoospermie, hypospermie, pH 6.5	Fructose effondré, alpha-glucosidase basse	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HTZ	Non fait
				Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.1210-34_1210-6TG(12)T(5) HMZ		NR

Annexe 2 Caractéristiques du groupe de patients présentant deux mutations du gène CFTR (n=36)



Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdéliation AZF
1754	40	Azoospermie	Azoospermie excrétoire, pH 7,8, normospermie, hypotrophie testiculaire bilatérale	Non fait	Absence (kit 30 mutations)	Absence	Absence
1856	31	Infertilité	Azoospermie sécrétoire, microcalcifications diffuses bilatérales, bilan hormonal normal	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	Absence
1892	35	ABCD	Suspicion d'ABCD, agénésie rénale gauche	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1895	36	ABCD	Azoospermie, hypotrophie testiculaire, bilan hormonal normal	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
3281	36	Azoospermie	Azoospermie excrétoire, absence vésicule séminale et déférent gauches agénésie rénale gauche	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3585	22	Azoospermie	Azoospermie excrétoire, normospermie, cryptorchidie bilatérale	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3691	41	Infertilité	Agénésie vésicule séminale et déférent droits, atrophie testiculaire	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
132273	31	ABCD	Azoospermie, hypospermie, varicoèles bilatérales, agénésie vésicule séminale et déférent droits, bilan hormonal normal	Fructose effondré, alpha-glucosidase normale	c.571T>G (p.Phe191Val, F191V) HTZ	Absence	NR
132324	41	Azoospermie	Azoospermie, normospermie, pH 7,8, ectopie testiculaire droite opérée, bilan hormonal normal	Fructose légèrement diminué, alpha-glucosidase normale	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
140537	30	Infertilité	Azoospermie, hypospermie, varicoèle de grade II, rein unique, bilan hormonal normal	Fructose et alpha-glucosidase diminués	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
141591	24	Infertilité	Azoospermie, clinique normale, pH 8, normospermie, varicoèle gauche de grade III	Normale	c.1624G>T (p.Gly542*, G542X) HTZ	Absence	Absence
142695	33	Azoospermie	Azoospermie, hypospermie, dilatation kystique du canal éjaculateur gauche, uropathie gauche, bilan hormonal normal	Fructose effondré, alpha-glucosidase basse	Absence (kit 35 mutations)	Absence mutation ciblée Sud Ouest	NR
161864	41	Azoospermie	Azoospermie sécrétoire, pH 7,5, normospermie, cryptorchidie testiculaire droite, FSH élevée	Normale	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) HTZ	Absence	Absence
162158	35	Azoospermie	Azoospermie, pH 8, normospermie, varicoèles bilatérales embolisées, bilan hormonal normal	Normale	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
172076	48	Infertilité	Azoospermie, pH 8,5, varicoèle gauche de grade III, clinique normale, bilan hormonal normal	Normale	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence

Annexe 3 Caractéristiques du groupe de patients présentant des anomalies physiques (n=15)

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdélétion AZF
2548	38	Infertilité	Azoospermie sans précision	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	AZFc complète
131431	30	Infertilité	Azoospermie excrétoire, bilan hormonal normal, hypotrophie testiculaire bilatérale, cure de hernie inguinale dans l'enfance	Normale	Absence (kit 35 mutations)	Absence	AZFbc
141433	32	Infertilité	Azoospermie, normospermie, varicocèle gauche de grade II, FSH augmentée	Normale	Absence (kit 35 mutations)	Absence	AZFc complète

#### Annexe 4 Caractéristiques du groupe de patients avec microdélétion du chromosome Y (n=3)

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdélétion AZF
1769	44	ABCD	ABCD, azospermie, pH 7.7, normospermie	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	Absence
1854	35	Infertilité	Suspicion d'ABCD, azospermie excrétoire, échographie normale, normospermie, pH 7.7	Normale	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
2378	29	Infertilité	Epididyme grêle, disjonction épидидymo-testiculaire, pH normal, normospermie	Normale	c.443T>C (p.Ile148Thr, I148T) HTZ	Absence	NR
3095	28	Infertilité	Azoospermie, normospermie, pH 7.8	Alpha-glucosidase effondrée	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
3455	38	Azoospermie	Azoospermie, normospermie, pH 8, hypotrophie testiculaire unilatérale, bilan hormonal normal	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3893	30	Infertilité	Azoospermie, normospermie, pH 8, échographie normale	NR	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
173425	34	Azoospermie	Azoospermie, normospermie, pH 8.2, bilan hormonal normal, disjonction épидидymo-déférentielle bilatérale	Non fait	c.91C>T (p.Arg31Cys) HTZ	Absence	Absence
183802	44	Azoospermie	Azoospermie, clinique normale, bilan hormonal normal, échographie normale	Alpha-glucosidase effondrée	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence

#### Annexe 5 Caractéristiques du groupe de patients ne répondant pas à tous les critères biologiques de l'ABCD (n= 8)

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdélétion AZF
117	32	ABCD	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
347	30	ABCD	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
398	29	Infertilité	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
446	29	ABCD	Anomalies des canaux déférents sans précision	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
519	37	ABCD	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
663	37	ABCD	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 8 mutations)	Absence	NR
1233	45	ABCD	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1500	23	Infertilité	Origine excrétoire sans précision	NR	c.1521_1523delCTT(p.Phe508del; F508del) HTZ	Absence	NR
1506	35	Infertilité	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1677	31	Azoospermie	Azoospermie excrétoire sans précision	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1740	60	ABCD	Doute sur ABCD, polypose naso-sinusienne, dilatation des bronches	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	NR
1773	38	Azoospermie	Azoospermie excrétoire sans précision	NR	Absence (kit 30 mutations)	Absence	Absence
2724	35	Azoospermie	Azoospermie excrétoire sans précision	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
2739	39	Infertilité	Azoospermie excrétoire sans précision	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3277	40	Azoospermie	Azoospermie sans précision	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	Absence
3303	36	Infertilité	Absence de renseignement	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
3823	35	Azoospermie	Azoospermie sans précision	NR	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR

*Annexe 6 Caractéristiques du groupe de patients sans renseignement (n=17)*

Patients	Age au diagnostic	Indication	Renseignements cliniques, biologiques et échographiques	Biochimie séminale	Première mutation	Deuxième mutation	Recherche microdélétion AZF
1656	33	ABCD	ABCD, azoospermie, hypospermie, pH 6.5	NR	c.1210-34_1210-6TG[12]T[5] HTZ	Absence	NR
2447	23	Azoospermie	Azoospermie, hypospermie, pH 6.7	Fructose effondré	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
2942	41	Infertilité	Suspicion d'ABCD, azoospermie, hypospermie, pH 6.8	NR	c.1523T>G (p.Phe508Cys, F508C) HTZ	Absence	NR
3005	33	Azoospermie	Suspicion d'ABCD, azoospermie, hypospermie, pH 6.5	Fructose effondré, alpha-glucosidase basse	Absence (kit 37 mutations)	Absence	NR
3053	45	ABCD	Suspicion d'ABCD, azoospermie, hypospermie, pH 6.5	Fructose légèrement diminué, alpha-glucosidase basse	Absence (kit 35 mutations)	Absence	NR
3055	32	ABCD	Azoospermie, agénésie vésicule séminale et déférent gauches, pH 6.1 hypospermie	Fructose et alpha-glucosidase effondrés	c.224G>A (p.Arg75Gln, R75Q) HTZ	Absence	NR
131758	26	ABCD	Azoospermie excrétoire, déconnexion de l'épididyme droit, bilan hormonal normal, hypospermie, pH 6.5	Fructose effondré	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Absence
161638	33	ABCD	Azoospermie, pH 6.5 hypospermie, bilan hormonal normal	Fructose effondré	Absence (kit 35 mutations)	Absence	Non fait

*Annexe 7 Caractéristiques du groupe de patients retenus pour les analyses de seconde intention (n=8)*