



**HAL**  
open science

# Investigations génétiques d'une large cohorte de patients infertiles avec globozoospermie, implication du gène DPYL19L2 et proposition d'une nouvelle stratégie de diagnostic génétique

Tristan Celse

## ► To cite this version:

Tristan Celse. Investigations génétiques d'une large cohorte de patients infertiles avec globozoospermie, implication du gène DPYL19L2 et proposition d'une nouvelle stratégie de diagnostic génétique. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03027534

**HAL Id: dumas-03027534**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03027534>**

Submitted on 27 Nov 2020

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

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

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine  
Pharmacie de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

Année : 2020

**INVESTIGATIONS GÉNÉTIQUES D'UNE LARGE COHORTE DE  
PATIENTS INFERTILES AVEC GLOBOZOOSPERMIE,  
IMPLICATION DU GENE *DPY19L2* ET PROPOSITION D'UNE  
NOUVELLE STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC GÉNÉTIQUE**

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE  
DIPLOME D'ÉTAT

Tristan CELSE

*[Données à caractère personnel]*

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE  
GRENOBLE

Le : 23/10/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Présidente du jury :

Mme. La Professeure Sylviane HENNEBICQ

Membres :

Mr. Le Professeur Charles COUTTON

Mr. Le Docteur Radu HARBUZ

Mr. Le Professeur Pierre RAY (Directeur de thèse)

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



# LISTE DES ENSEIGNANTS UFR MEDECINE GRENOBLE 2020-2021



Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2020-2021

## ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENO	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre-Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PR Ass. Méd.	BOILLOT Bernard	
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH émérite	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH émérite	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur ; Addictologie
PU-PH émérite	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH émérite	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
MCF Ass.MG	CHAMBOREDON Benoît	Médecine Générale
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	CHAVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENUM	Discipline universitaire
PU-PH émérite	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
PR Ass. Méd.	LARAMAS Mathieu	Cancérologie ; radiothérapie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH émérite	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
PR Ass. Méd.	MATHIEU Nicolas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie ; addictologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie ; radiothérapie
PU-PH émérite	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
PR Ass. Méd.	ORMEZANO Olivier	Cardiologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation



CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PERNOD Gilles	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes ; Addictologie
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PR Ass. Méd.	RECHE Fabian	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH émérite	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH émérite	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
PU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
PR Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
PU-PH émérite	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH émérite	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	THEVENON Julien	Génétique
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VALMARY-DEGANO Séverine	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	VANZETTO Gérard	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH émérite	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers  
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers  
 PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale  
 MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale  
 PR Ass. Méd. : Professeur des Universités Associé de Médecine  
 PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale  
 MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

# **REMERCIEMENTS**

---

## **Remerciements aux membres du jury**

A Sylviane Hennebicq, je vous remercie d'avoir acceptée de présider mon jury de thèse et de juger ce travail. Je tiens également à vous remercier pour le conseil que vous m'avez prodigué au bon moment concernant mes choix professionnels, il m'a beaucoup aidé à avancer dans ma réflexion.

A Pierre Ray, je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse et de m'avoir encadré sur ce sujet tout au long de cette année. J'ai beaucoup appris grâce à vous, vous avez toujours été disponible et extrêmement réactif. Je tiens à vous remercier pour votre sympathie et votre franchise et je suis très heureux de pouvoir poursuivre des projets professionnels avec vous dans les mois qui viennent.

A Radu Harbuz, merci d'avoir accepté de juger ce travail. C'est un plaisir de travailler avec toi au quotidien et j'espère que cela continuera.

A Charles Coutton, un grand merci d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir aidé et soutenu tout au long de ce projet. Un remerciement particulier pour l'attention que tu m'as porté tout au long de ces trois années. Tu as suivi mon parcours dès le début de mon internat, tu as su à la fois m'encadrer parfaitement dans le domaine de la génétique, me former et m'orienter sur différents projets depuis deux ans maintenant. Je te remercie aussi pour ton écoute, ta franchise et tes précieux conseils dans mes choix professionnels, associatifs, et autres. Tu as toujours su remettre les choses en perspectives pour m'aider à me remettre en question et à prendre la meilleure décision. J'espère que l'on pourra continuer encore longtemps à travailler ensemble.

## **Remerciements à l'ensemble de l'équipe GETI-DPI**

Merci à Christophe Arnoult et à l'ensemble de l'équipe GETI pour votre accueil et tout ce que vous m'avez appris au cours de ce travail (un petit merci particulier à Julie pour la bonne humeur et les restaurants).

Merci à Flore, Delphine, Isabelle et Caroline pour votre accueil dans l'équipe et tous les petits conseils prodigués au cours de mon semestre. Flore je te remercie tout particulièrement pour ton soutien au début de ce projet, ta franchise et ta bonne humeur qui m'ont toujours aidé.

Zine-Eddine, merci beaucoup pour tout ce que tu m'as appris au cours de ce travail. J'ai énormément progressé grâce à toi sur des applications techniques et des mises en pratique de ce que l'on ne voit d'habitude qu'en théorie. Merci pour toutes les solutions trouvées là où je restais bloqué, ça a été un plaisir de travailler avec toi.

Caroline Cazin, un très grand merci pour m'avoir formé, pour m'avoir aidé et pour tous les jours où j'ai travaillé à tes côtés tout au long de cette année. Pour toute cette gentillesse et cette bonne humeur. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble et même si ce n'est pas le cas qu'on ne se perdra pas de vue.

## **Remerciements à l'ensemble du service de cytogénétique**

Je tiens à remercier toute l'équipe de cytogénétique qui m'a accueilli avec beaucoup de sympathie et au sein de laquelle je prends vraiment beaucoup de plaisir à travailler tous les jours. Un grand merci aux biologistes, Françoise, Florence et Véronique, qui me font progresser chaque jour un peu plus. Merci aux techniciens, Jérôme, Martine, Sylvie, Béa, Sandrine, Carole, Anaëlle, Emeline, pour la confiance que vous m'accordez et tout ce que vous m'avez appris et que vous m'apprenez encore. Merci Guillaume et Gaëlle pour tous ces conseils et tout ce que vous m'apprenez au quotidien. Guillaume je tiens particulièrement à te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté sur ce travail et ta disponibilité sans faille. Merci aux secrétaires, Claire, Valérie, Flora, Vivianne, Nadia, Delphine, Marie-Thérèse pour tout le travail que vous faites. Merci à Julien, Klaus, Isabelle et Pauline, c'est toujours un plaisir de discuter et de travailler avec vous et j'espère profiter pleinement de l'année à venir à vos côtés.

## **Remerciements à l'ensemble des biologistes et des techniciens avec qui j'ai travaillé**

Je voudrais remercier les personnes avec qui j'ai travaillé, qui m'ont aidé, qui m'ont formé tout au long de ces trois premières années d'internat. Je ne citerai pas tout le monde parce qu'il y en a trop mais je voudrais particulièrement remercier Carole, Dora, Sandrine, Laetitia, William et tous les techniciens de biochimie pour ce semestre où j'ai tant appris et où vous m'avez totalement impliqué dans le travail de l'équipe. Gauthier pour la formation en hématologie et tous les bons moments passés pendant ce premier semestre d'internat. Yvan, Elodie, Xavier, Julia, pour tous les bons moments et pour la grande implication que vous pouvez avoir dans ce laboratoire, en particulier pour les internes. Un grand merci aux techniciens du laboratoire de garde, et particulièrement à Elodie et Sandy, pour m'avoir aidé à supporter ces nuits de travail. Un merci particulier à Julien Bessonnat qui a sa part dans ce travail, j'espère que l'on continuera à collaborer.

Un remerciement particulier à Philippe Vago qui m'a donné envie de me spécialiser en génétique dès mes premières années de médecine, qui m'a beaucoup aidé et conseillé tout au long de mon externat. Je pense qu'une partie de ce travail je vous le dois et je vous remercie de m'avoir suivi et soutenu tout au long de mon cursus.

## **Remerciements à tous mes cointernes, mes amis et mes proches**

Un grand merci à tous les internes de biologie pour ces années passées ensemble et à venir. Claire, Théo, Némoz, des cointernes qui sont devenus des assistants d'exception ! Merci aux anciens, Arnaud pour cette joie de vivre et cette envie que tu m'as donnée de refaire de l'associatif pendant mon internat, VTH et Reza toujours disponibles et attentionnés. Merci à Quentin Despinasse pour ton amitié et à Axelle de supporter Quentin et d'accepter de me le prêter de temps en temps. A Anaëlle pour ces trois années d'internat au cours desquelles nous avons partagé tellement de chose, je suis vraiment content de t'avoir rencontré et je sais qu'on ne se perdra pas de vue. Merci à Léa B et Marie toujours adorables depuis les premiers jours de cet internat. Merci à Caroline Plazy de m'avoir supporté pendant toute cette année associative plus qu'éprouvante, tu as été parfaite ! Une relectrice de mails hors pair évidemment mais surtout une amie géniale, toujours de bon conseil, toujours de bonne humeur et toujours motivée ! Je suis vraiment content que tu prolonges un peu plus cet internat et j'espère que tu ne t'en iras pas trop vite de Grenoble. A Léa P pour les danses et les parties de volley. Merci à Aurélie pour tous ces débats, ces discussions et ces postes de présidents que tu m'auras transmis. A Charlotte et VJP pour votre joie de vivre inépuisable, votre folie et votre accent du sud. Merci à Sabrina et Margot pour ce semestre en bactériologie. Merci à Capucine pour les sorties escalade. Et à tous les autres, Simon, Fanny, Julliane, Lionnel, Lucie, Anne-Sophie, Alexandre, Aurélien, Laura S, Quentin, Arthur, Joris, Edouard, Laura G, Julien, Morgane, Imad, Marine, Oriane, Amélie, Giang, Gabrielle j'espère profiter avec vous de la suite de cet internat. Un merci à tous mes cointernes pharmaciens et médecins que j'ai pu rencontrer tout au long de cet internat, Anthony, Marion, Alex, les deux Pierre, Marie, Ramzi, Quentin, Justine, ZAC, Elise, Florentin, Alexis, Théo et tous les autres.

Aux Amis de la faculté de Clermont, je vous remercie pour toutes ces longues périodes de révisions et ces organisations d'évènements incroyables. Nous nous sommes tous éparpillés un peu partout en Métropole et dans les îles mais j'espère que l'on se recroisera.

A mes amis d'enfance, qui m'ont soutenu pendant toutes mes études et qui ont su être présents dans les moments les plus difficiles.

A toute ma famille et mes proches qui m'ont aimé et soutenu depuis toujours.

A Maud pour ton amour ta force et ton soutien qui m'ont tant apporté depuis toutes ces années

# **TABLE DES MATIERES**

LISTE DES ENSEIGNANTS UFR MEDECINE GRENOBLE 2020–2021.....	3
REMERCIEMENTS .....	8
TABLE DES MATIERES .....	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	15
TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	17
AVANT-PROPOS .....	19
PARTIE 1 – INFERTILITE.....	21
INFERTILITE FEMININE.....	22
INFERTILITE MASCULINE.....	24
DEFAUTS QUANTITATIFS DES SPERMATOZOIDES .....	25
DEFAUTS QUALITATIFS DES SPERMATOZOIDES.....	31
PARTIE 2 (rédigée en anglais) – GLOBOZOOSPERMIA – LITERATURE REVIEW .....	36
SPATA16.....	38
PICK1.....	41
ZPBP1.....	42
CCDC62.....	43
DPY19L2 .....	44
NEW CANDIDATE GENES.....	46
PARTIE 3 – ARTICLE ORIGINAL (rédigé en anglais) -GENETIC ANALYSES OF A LARGE COHORT OF INFERTILE PATIENTS WITH GLOBOZOOSPERMIA, DPY19L2 STILL THE MAIN ACTOR, GGN CONFIRMED AS A GUEST PLAYER.....	47
ABSTRACT.....	50
INTRODUCTION.....	51
MATERIALS AND METHODS .....	56
Patients.....	56
Semen analysis.....	57
DNA extraction.....	58
MLPA analysis.....	58
Whole-exome sequencing and bioinformatics analyses.....	58
DPY19L2 Sanger sequencing.....	60

In-silico analyses of sequence variants .....	60
RESULTS.....	61
DPY19L2 investigations in our cohort of 69 globozoospermic patients .....	62
Whole exome sequencing analysis of other genes involved in globozoospermia in Human.....	67
Comparison of sperm parameters.....	70
DISCUSSION .....	73
Authors' contributions.....	81
Conflict of interest.....	81
PARTIE 4 – INTEGRATION DES CONCLUSIONS DE L'ARTICLE A LA BIBLIOGRAPHIE ET PERSPECTIVES D'ETUDE .....	82
CONCLUSION .....	86
BIBLIOGRAPHIE.....	88
ANNEXES.....	103
ANNEXE 1 : Supplementary Table.....	103
ANNEXE 2 : Première page de l'article original .....	104
ANNEXE 3 : Premières pages de la revue « Genetics of teratozoospermia: back to the head » ....	105
ANNEXE 4 : Serment d'Hippocrate.....	107
ABSTRACT.....	108
RESUME .....	109



## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

Figure 1 - Processus biologiques et causes génétiques impliquées dans l'infertilité féminine.....	23
Figure 2 – Spermatogenèse.....	28
Figure 3 – Principales causes génétiques d'infertilité masculine décrites dans la littérature.....	35
Figure 4 - Known proteins involved in acrosome biogenesis whose functional absence leads to globozoospermia in human.....	39
Figure 5 - Location of mutations in the intron-exon structure and in the protein representation of the five genes ( <i>DPY19L2</i> , <i>PICK1</i> , <i>SPATA16</i> , <i>ZBP1</i> and <i>CCDC62</i> ) associated with globozoospermia in human.....	40
Figure 6 – Optical microscopic observations of spermatozoa.....	52
Figure 7 – Schematic representation of the molecular diagnostic investigations carried out on the cohort of 69 patients with globozoospermia.....	62
Figure 8 – Location of the point mutations found on the <i>DPY19L2</i> gene and their consequence on the <i>DPY19L2</i> protein.....	66
Figure 9 – Representations of the loss of function variant found in <i>GGN</i> and Sanger validation.....	69
Figure 10 – Bar chart representing mean and standard deviation(SD) for each sperm parameters between the three groups of patients according to their <i>DPY19L2</i> genotype.....	71
Figure 11 - Fréquence des mutations dans <i>DPY19L2</i> , <i>PICK1</i> , <i>SPATA16</i> , <i>ZBP1</i> et <i>CCDC62</i> chez 388 patients globozoospermiques décrits dans la littérature.....	83

## ***TABLEAUX***

---

Table 1 - Comparison of sperm parameters between groups according to the patients' genotype.....	57
Table 2 - All point mutations identified in our cohort of 69 globozoospermic patients and their predicted impact according to ACMG classification. All mutations are homozygous or hemizygous unless specified otherwise.....	63
Table 3 – Diagnostic performance according to the rate of round headed spermatozoa.....	72
Supplementary Table - Sequences of the 22 DPY19L2 primers pairs with respective melting temperatures (T <sub>m</sub> ) and amplicon size.....	103

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

---

ACMG classification : Classification of the American College of Medical Genetics

ALT allele : Alternative allele

CNRS : Conseil national de la recherche scientifique (National Scientific Research Council)

CNV : Copy Number Variation

CRB : Centre de Ressources Biologiques (Biological Resource Center)

cDNA : coding DesoxyriboNucleic Acid

DNA : DesoxyriboNucleic Acid

DP : Depth

GQX : Genotype Quality

GRCh38 : Genome Reference Consortium Human Build 38

GVCF : Genomic Variant Call Format

HGVS : Human Genome Variation Society

IAB : Institute of Advanced Biosciences

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection (injection intracytoplasmique de spermatozoïde)

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale (National Institute of Health and Medical Research)

IMSI : Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PMA : Procréation Médicalement Assistée

RNA : RiboNucleic Acid

SD : Standard Deviation

SNVs : Single Nucleotid Variants

UGA : Université Grenoble Alpes (Grenoble Alpes University)

WES : Whole-Exome Sequencing

## **AVANT-PROPOS**

---

Le travail de recherche présenté dans ce document a été réalisé au sein de l'unité médicale de génétique de l'infertilité et de diagnostic préimplantatoire (GI-DPI) du CHU Grenoble Alpes dirigée par le Professeur Ray, Directeur de cette thèse, et en collaboration avec l'équipe de recherche génétique épigénétique et thérapie de l'infertilité (GETI) attachée à l'UGA, l'IAB, l'INSERM (INSERM U1209) et le CNRS (CNRS UMR 5309). L'équipe GETI, codirigée par le Pr Pierre Ray (spécialiste de la génétique de la reproduction, professeur des universités et praticien hospitalier au CHU de Grenoble) et le Dr Christophe Arnoult (spécialiste de la spermatogenèse, docteur vétérinaire et directeur de recherche au CNRS), est leader dans le domaine de l'exploration des gènes responsables des causes génétiques d'infertilités masculines. L'activité diagnostique au sein de l'unité médicale du CHU permet de mettre en application en routine par la réalisation des analyses de biologie médicale, les nouvelles découvertes dans ce domaine. Mon travail au sein de cette unité a porté sur la recherche de nouvelles anomalies génétiques dans une pathologie bien connue de l'équipe de recherche qu'est la globozoospermie, une infertilité masculine primaire causée par la production de spermatozoïdes à têtes rondes avec une absence d'acrosome, en se concentrant en particulier sur un gène découvert par cette même équipe : *DPY19L2*. Ce travail a permis de proposer une nouvelle stratégie diagnostique permettant une meilleure prise en charge des patients globozoocéphales et de contribuer à une meilleure caractérisation des causes génétiques de cette pathologie.

Ce travail est présenté dans ce document sous la forme d'une introduction comprenant une revue de la littérature en deux parties, d'un article scientifique original et d'une conclusion. La première partie de l'introduction présente une revue rapide de la littérature couvrant l'infertilité féminine et masculine, en se concentrant sur les étiologies de ces affections et en particulier sur les causes génétiques. La seconde partie de l'introduction détaille le phénotype au cœur de mon sujet de thèse qu'est la globozoospermie, et les différents gènes impliqués. Cette seconde partie est rédigée en anglais car elle est issue d'une revue de la littérature portant sur les anomalies de la tête du spermatozoïde que j'ai co-rédigée et qui a été acceptée dans la revue « Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism ». La troisième partie de ce manuscrit contient l'article original qui représente l'essentiel de mon travail de thèse et qui porte sur l'analyse génétique d'une cohorte de patients présentant une globozoospermie. Cet article est également présenté en anglais, tel qu'il a été accepté dans le journal « Human Genetics ». Enfin, une quatrième partie permettra de présenter les perspectives de mon travail et de positionner le travail réalisé dans le contexte des connaissances actuelles sur le sujet.

## ***PARTIE 1 – INFERTILITE***

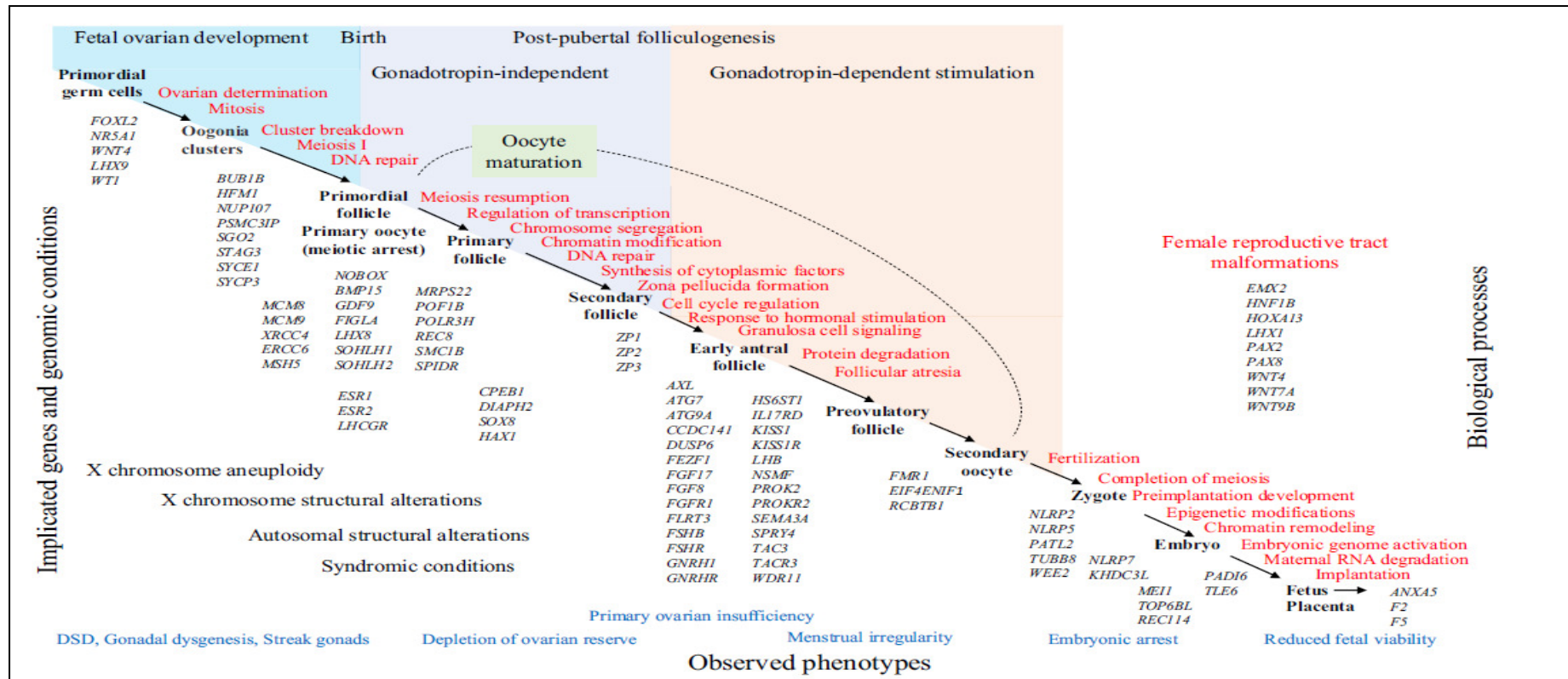
---

L'infertilité est définie par une absence de grossesse après un an de relations sexuelles régulières et non protégées d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il s'agit d'un problème de santé majeur, qui touche environ 50 millions de couples dans le monde (Mascarenhas et al. 2012), soit 12,5 % des femmes et 10 % des hommes (Datta et al. 2016). Dans 30% des cas aucune cause n'est retrouvée (Smith 2003), dans les 70% restants les causes d'infertilités des couples sont partagées à part approximativement égales entre homme et femme. En effet un tiers des causes sont féminines, un tiers sont masculines et le tiers restant est attribué à des facteurs combinés féminins et masculins (Mallepaly et al. 2017).

## **INFERTILITE FEMININE**

Chez la femme les causes d'infertilité sont variées et l'on retrouve à la fois des anomalies génétiques, endocrines, anatomiques ou immunologiques du système reproducteur. Les troubles ovulatoires, première cause retrouvée, constituent environ 25% des cas (Smith 2003) et se manifestent par des aménorrhées dans les cas les plus graves mais parfois seulement par des cycles irréguliers. Ces troubles sont majoritairement liés au syndrome des ovaires polykystiques qui, par un dérèglement hormonal, entraîne un hyperandrogénisme bloquant l'ovulation chez plus de 40% des patientes atteintes (Azziz 2018). L'insuffisance ovarienne prématurée qui se traduit par une réduction importante du stock folliculaire conduisant à une ménopause précoce avant l'âge de 40 ans, est également un trouble fréquent. Même si la majorité des cas reste idiopathique, une origine génétique est évoquée chez 50 à 90% des patientes (Shelling et al. 2015) avec une prédominance des anomalies du chromosome X : les syndromes de Turner et les prémutations du gène *FMR1* étant les plus fréquemment observés (Yatsenko and Rajkovic 2019). Les anomalies anatomiques pour leur part sont dominées par les infertilités tubaires, dans 20% des cas (Smith 2003), suivies par les malformations ou absence de développement utérins ainsi que par l'endométriose. Dans toutes ces pathologies, de nombreuses anomalies génétiques causales ou prédisposantes ont été décrites (Yatsenko and Rajkovic 2019). Globalement, les anomalies génétiques allant de grands déséquilibres chromosomiques aux mutations ponctuelles de séquences géniques, constituent une part importante des causes d'infertilité féminine avec un large panel d'anomalies déjà décrites comme le montre la figure de Yatsenko et al. publiée en 2019 (Figure 1) (Yatsenko and Rajkovic 2019).





**Figure 1 - Processus biologiques et causes génétiques impliquées dans l'infertilité féminine (Yatsenko and Rajkovic 2019).**

Les altérations importantes du chromosome X sont la cause la plus fréquente de la dysgénésie ovarienne. Des phénotypes plus subtils se manifestant par une aménorrhée primaire ou secondaire, une viabilité foetale réduite peuvent également être observés chez les patientes présentant des réarrangements équilibrés, des altérations submicroscopiques et des anomalies monogéniques. Le potentiel reproductif des patientes présentant des altérations génomiques et des atteintes syndromiques dépend fortement du diagnostic, des gènes affectés et des manifestations concomitantes. Les gènes responsables sous-tendent des processus biologiques clés, mais ils peuvent être impliqués dans de multiples voies, affectant plusieurs stades du développement ovocytaire.

## **INFERTILITE MASCULINE**

Chez l'homme, en dehors des origines psychogènes, des troubles vasculaires, métaboliques, ou neurologiques peuvent entraîner des dysfonctions sexuelles érectiles ou de l'éjaculation (anéjaculation ou éjaculation rétrograde). Cependant ces déficits peuvent être contournés par différents systèmes relativement simples de stimulation de l'éjaculation ou de récupération des spermatozoïdes en vue de protocoles de procréation médicalement assistée (PMA). La prise en charge peut être plus complexe pour certains cas d'infertilités masculines dont la cause est liée à un défaut sévère de la production des spermatozoïdes. Ces défauts concernent des troubles de la quantité ou de la qualité des spermatozoïdes, qui peuvent avoir une origine multifactorielle impliquant des composantes environnementales (polluants, tabac, infections,...), anatomiques, ou traumatique. On estime cependant que la principale étiologie des troubles spermatiques est la cause génétique. En effet plus de 4000 gènes sont impliqués dans la spermatogenèse humaine (Jan et al. 2017) et grâce aux récentes évolutions technologiques du séquençage, la cause de l'anomalie est de plus en plus fréquemment retrouvée chez les patients. Cependant, environ 50% des cas d'infertilité masculine restent idiopathiques (Krausz 2011), il est donc important de parvenir à améliorer ces performances diagnostiques. C'est pourquoi ce travail s'est concentré sur la recherche de nouvelles anomalies génétiques, qui pourraient représenter jusqu'à 50% des cas idiopathiques (Yatsenko et al. 2010), cela afin d'accroître les diagnostics étiologiques et d'améliorer la prise en charge des nombreux hommes atteints de troubles de la fertilité.

## **DEFAUTS QUANTITATIFS DES SPERMATOZOÏDES**

Concernant les troubles quantitatifs de la spermatogenèse, ils sont définis par l'OMS comme une quantité de spermatozoïdes dans l'éjaculat inférieure à 39 millions (Cooper et al. 2010). Ils représentent environ un quart des troubles de la spermatogenèse. Ces déficits peuvent aller d'une diminution plus ou moins sévère de la quantité de spermatozoïdes dans l'éjaculat, appelée oligozoospermie, jusqu'à l'absence totale de spermatozoïdes, l'azoospermie. Ce dernier phénotype concerne environ 10% des patients infertiles (Tournaye et al. 2017), et se divise en azoospermie sécrétoire et excrétoire.

## **ANOMALIES EXCRETOIRES**

Les anomalies excrétoires sont dues à une obstruction des canaux déférents qui limite le transport des spermatozoïdes produits dans le testicule, empêchant ainsi leur éjaculation. La cause génétique de ce trouble n'est plus à démontrer avec une prédominance des anomalies du gène *CFTR* retrouvées dans plus de 60% des tableaux d'Absence Bilatérale des Canaux Déférents (ABCD) (Bieth et al. 2020). Le gène *ADGRG2* a également été décrit dans cette pathologie de manière plus sporadique et enfin quelques gènes candidats tels que *SLC9A3* et *PANK2* pourraient être impliqués mais ne bénéficient pas encore d'un niveau de preuve suffisant chez l'homme (Bieth et al. 2020).

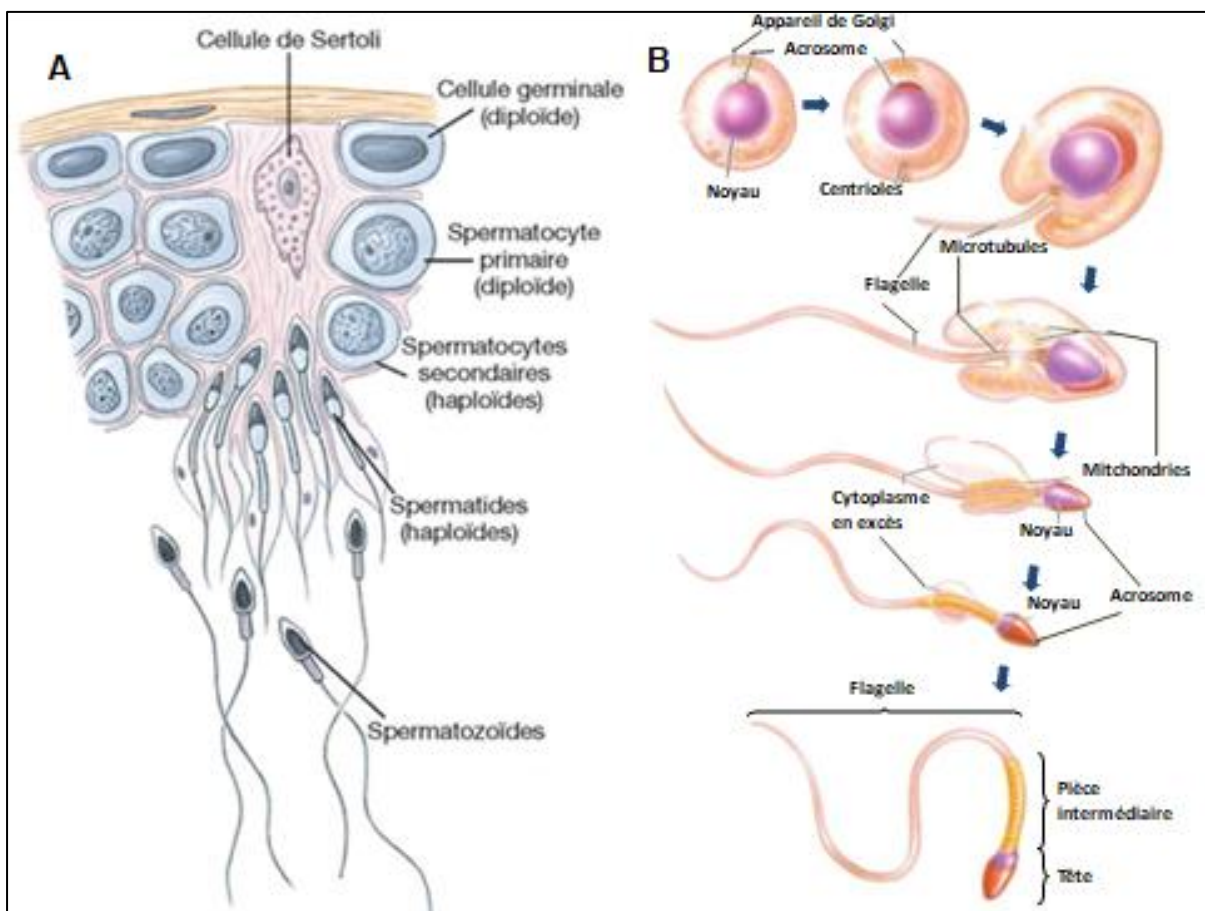
## ANOMALIES SECRETOIRES

### **Rappel concernant la spermatogenèse**

Les anomalies sécrétoires, aussi appelées azoospermies non obstructives, correspondent à un défaut de production testiculaire des spermatozoïdes, c'est-à-dire à un défaut de la spermatogenèse dans ses premières étapes. Pour rappel la spermatogenèse est un processus complexe qui permet de produire en 74 jours des spermatozoïdes matures à partir de cellules germinales indifférenciées, les spermatogonies. En effet, dès l'âge de la puberté chez l'homme, en parallèle du renouvellement mitotique qui perdure pour maintenir le stock de cellules souches, les spermatogonies de type A initient une division hétéronyme qui constitue le début de la différenciation. Les cellules filles produites, spermatogonies de types B, effectuent plusieurs divisions mitotiques pendant 27 jours afin de produire un stock de clones qui pourra poursuivre sa différenciation dans la lumière des tubules séminifères du testicule. Chaque spermatogonie B permet de produire deux spermatocytes primaires qui rentreront dans une phase de méiose en deux étapes. Une première méiose durant 23 jours permet de produire deux spermatocytes secondaires haploïdes puis la seconde division méiotique aboutit en un jour seulement à quatre spermatides rondes haploïdes (Figure 2A). Ces spermatides rentrent ensuite dans une étape de différenciation morphologique durant 23 jours, la spermiogénèse, au cours de laquelle de nombreuses modifications ont lieu : la formation de l'acrosome à partir des vésicules du Golgi, l'apparition du flagelle, l'élimination du cytoplasme et l'allongement du spermatide et de son noyau associé à une compaction de la chromatine, le tout aboutissant à un spermatozoïde mature haploïde qui sera libéré dans la lumière du tubule séminifère afin d'être excrété (Figure 2). L'ensemble de ces modifications a lieu simultanément dans le compartiment adluminal du tubule séminifère. Concernant le

noyau, il va évoluer progressivement d'une forme ronde contenant une chromatine pâle et homogène à une forme allongée contenant une chromatine compactée plus sombre. De plus la membrane nucléaire s'épaissit aux deux pôles apical et caudal, respectivement en regard de l'acrosome et du système centriolaire. En parallèle de cette condensation du noyau, l'acrosome se forme au pôle apical de la future tête. Sa biogenèse débute par la production de vésicules pro-acrosomales par l'appareil de Golgi renfermant les enzymes protéolytiques nécessaires à la réaction acrosomique (exocytose du contenu de l'acrosome permettant la lyse de la zone pellucide et donc la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte). Ces vésicules fusionnent pour former une unique poche enzymatique, l'acrosome, qui vient ensuite coiffer la moitié apicale du noyau. Dans le spermatozoïde mature, l'acrosome est divisé en deux segments : la partie antérieure qui fusionnera avec la membrane cytoplasmique pour former des pores et libérer les enzymes lors de la réaction acrosomique ; la partie postérieure, ou équatoriale, qui persiste après la réaction acrosomique et permet la fusion avec la membrane de l'ovocyte. Dans le même temps, la biogenèse de l'axonème débute par la migration des deux centrioles au futur pôle caudal, le centriole proximal au contact du noyau reste inactif initialement tandis que le centriole distal forme des microtubules à l'origine de l'axonème. Par la suite l'axonème s'allonge pour progressivement former le flagelle mature du spermatozoïde. Enfin, dès les premières étapes de la spermiogénèse, des microtubules se forment de part et d'autre du noyau pour constituer la manchette. Ces microtubules permettent l'allongement de la tête et la migration du cytoplasme et de son contenu vers le pôle distal. Dans ce contenu cytoplasmique les mitochondries s'allongent et vont s'enrouler autour de l'axonème pour former le manchon mitochondrial au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, ce manchon constituera la principale source d'énergie pour la réalisation des

mouvements du flagelle. A la fin de la spermiogénèse, la synthèse protéique s'arrête et l'appareil de Golgi accompagné d'autres organelles inutiles au spermatozoïde mature migre avec le reste du cytoplasme vers le pôle caudal. L'ensemble forme la gouttelette cytoplasmique qui est éliminée du spermatozoïde sous forme de corps résiduel qui sera phagocyté par les cellules de Sertoli. La spermiation permettra la libération du spermatozoïde mature dans la lumière du tubule séminifère en vue de son excrétion.



**Figure 2 – Spermatogenèse.** A) Spermatogenèse dans le tubule séminifère des cellules germinales diploïdes indifférenciées aux spermatozoïdes haploïdes matures. B) Spermiogénèse : maturation des spermatides rondes aboutissant à la formation d'un spermatozoïde mature libéré dans la lumière du tubule séminifère.

## **Etiologies des anomalies sécrétoires**

Il existe de nombreuses causes d'azoo- et d'oligozoospermie non obstructives incluant des antécédents de chimio- ou radiothérapie, la présence de varicocèle qui est une dilatation variqueuse des veines du cordon spermatique, les traumatismes et les infections telle que l'orchi-épididymite. On retrouve également des causes endocriniennes, dites pré-testiculaires, par altération de l'axe hypothalamo-hypophysaire tel que le déficit en GnRH isolé ou le syndrome de Kallmann (MIM308700) qui associe une anosmie a un déficit en GnRH induisant un hypogonadisme hypogonadotrophique entraînant une absence de puberté. Mais l'étiologie principale est la présence d'une anomalie génétique impactant la spermatogenèse dans le testicule. En premier lieu les anomalies chromosomiques représentent environ 15% des azoospermies non obstructives (Krausz and Riera-Escamilla 2018) avec une prédominance des anomalies gonosomiques associées aux phénotypes les plus sévères (Mallepaly et al. 2017). Le syndrome de Klinefelter, patients présentant un caryotype 47,XXY ou une mosaïque 46,XY/47,XXY, est la principale étiologie recherchée. Il associe aux troubles de la fertilité des pathologies hormonales, auto-immunes, thromboemboliques, cognitives ou psychiatriques. On retrouve parmi ces hommes plus de 90% de patients azoospermiques, le pourcentage restant présentent à minima une cryptozoospermie (spermatozoïdes non détectables dans l'éjaculat à l'état frais mais présence de spermatozoïdes dans le culot après centrifugation) ou une oligozoospermie sévère (oligozoospermie inférieure à 1 million de spermatozoïdes dans l'éjaculat) (Krausz and Riera-Escamilla 2018). Les autres anomalies détectables sur un caryotypes sont moins fréquentes et correspondent au syndrome de De la Chapelle, ou syndrome du mâle 46,XX, et aux remaniements chromosomiques de structures tels que les chromosomes Y isodictriques, tronqués

ou en anneau ou encore les translocations réciproques ou Robertsoniennes qui sont plus fréquemment retrouvées dans les phénotypes d'oligozoospermie (Ceylan et al. 2009). Concernant les anomalies moléculaires, la microdélétion du locus AZF, reliée aux troubles quantitatifs de la spermatogenèse pour la première fois en 1976 (Tiepolo and Zuffardi 1976), est retrouvée chez 10% des patients azoospermiques et 3 à 5% des patients oligozoospermiques (Tournaye et al. 2017). Le locus AZF regroupe différentes sous-régions pouvant être délétées et conduisant à différents types d'azoospermie : la région AZFa est la plus rarement délétée mais la plus pathogène entraînant un syndrome Sertoli-cell only (SCOS) avec absence de cellules germinales tandis que les délétions des régions AZFb ou AZFb+c entraînent un blocage méiotique. Enfin, la majorité des patients délétés (environ 80%) ont une microdélétion AZFc isolée et présentent une spermatogenèse résiduelle permettant dans plus de la moitié des cas, de récupérer des spermatozoïdes grâce à une ponction testiculaire en vue d'une prise en charge en PMA par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) (Krausz et al. 2014). Les autres anomalies génétiques moléculaires décrites sont des anomalies monogéniques, avec en premier lieu *TEX11* décrit chez 1% des patients azoospermiques (Mitchell et al. 2017), suivi de *TAF4B*, *ZMYND15*, *TEX15*, *MCM8*, *SPINK2*, et *SYCE1*. Les anomalies de *TAF4B* décrites bloquent la prolifération des spermatogonies (Falender et al. 2005), *TEX11*, *TEX15*, *MCM8* et *SYCE1* lorsqu'ils sont altérés bloquent la spermatogenèse au stade méiotique (Yang et al. 2008; Bolcun-Filas et al. 2009; Lutzmann et al. 2012), tandis que les anomalies de *ZMYND15* et de *SPINK2* ont un impact post-méiotique avec un arrêt au stade de spermatide (Yan et al. 2010; Kherraf et al. 2017, p. 2). Il existe encore d'autres anomalies plus rares que nous ne détaillerons pas ici mais il faut noter que de nombreux cas d'azoo- ou d'oligozoospermie restent idiopathiques à l'heure actuelle et il est donc important de



continuer à rechercher de nouveaux gènes candidats dans ces pathologies et c'est le travail que mène actuellement l'équipe GETI.

### **DEFAUTS QUALITATIFS DES SPERMATOZOÏDES**

J'en viens maintenant à la dernière partie de cette introduction sur l'infertilité avec les défauts qualitatifs des spermatozoïdes. Cette catégorie rassemble la tératozoospermie qui correspond aux anomalies morphologiques des spermatozoïdes avec moins de 4% de formes typiques, l'asthénozoospermie pour les anomalies de la mobilité avec moins de 32% de mobilité progressive et la nécrozoospermie concernant la vitalité avec moins de 58% de formes vivantes (Cooper et al. 2010).

Je ne m'attarderai pas ici sur les causes de la nécrozoospermie qui sont rarement d'origine génétique mais le plus souvent liées au stress oxydatif, à une température trop élevée ou à des infections. On estime que la nécrozoospermie ne représente que 0,2 à 0,4% des infertilités masculines (Dumont et al. 2017).

Concernant les asthénozoospermies isolées, 3 gènes ont été décrits : *SEPT12* avec des mutations altérant la structure du flagelle en empêchant la formation de filaments de septine au niveau de l'anneau de Jensen qui fait la jonction entre pièce intermédiaire et flagelle, *CATSPER2* qui s'exprime dans le flagelle et qui a été relié à un défaut d'influx calcique réduisant la motilité des spermatozoïdes, et *SLC26A8* qui participe à la structure de la pièce intermédiaire en formant un complexe *SLC26A8/CFTR* nécessaire à la capacitation et à l'activation de la motilité du spermatozoïde (Ray et al. 2017). Cependant, la plupart des anomalies du flagelle entraînant des défauts de motilité sont à la fois morphologiques et fonctionnelles et sont donc qualifiées d'asthénotératozoospermie, qui est fréquemment retrouvée chez

les hommes infertiles (Curi et al. 2003). Le principal phénotype d'asthénotérazoospermie, est le phénotype MMAF pour anomalies morphologiques multiples du flagelle ou « multiple morphological abnormalities of the sperm flagella », qui associe différentes anomalies morphologiques comprenant : des flagelles courts ("short tails") ou une absence totale ou quasi-totale de flagelle ("stumptails"), des flagelles enroulés, avec une angulation anormale, de calibre irrégulier ou avec un cytoplasme résiduel anormal, ainsi que des anomalies de la gaine mitochondriale, de la jonction tête-flagelle ou pièce médiane - pièce principale (Touré et al. 2020). Il a tout d'abord été associé à des délétions des gènes *AKAP3* et *AKAP4* décrites chez un seul patient (Baccetti et al. 2005) qui doivent encore être confirmées. Par la suite *DNAH1* a été décrit avec une absence de la protéine entraînant une désorganisation axonemale globale incluant une anomalie de localisation des doublets de microtubules périphériques et une absence de la paire centrale et des bras de dynéine internes (Ben Khelifa et al. 2014). Au cours des deux dernières années le séquençage exomique ou whole exome sequencing (WES) a permis de découvrir 17 autres gènes impliqués dans cette pathologie (Touré et al. 2020). Les protéines codées par ces gènes sont trouvées dans le flagelle à différents niveaux, principalement dans l'axonème, mais également au niveau des structures périaxonémales, l'espace axonémo-periaxonémal et de la pièce centrale, soulignant la complexité des réseaux de protéines et des mécanismes qui régissent le fonctionnement du flagelle spermatique. Malgré ces récentes découvertes 50% des MMAF restent idiopathiques à ce jour (Touré et al. 2020).

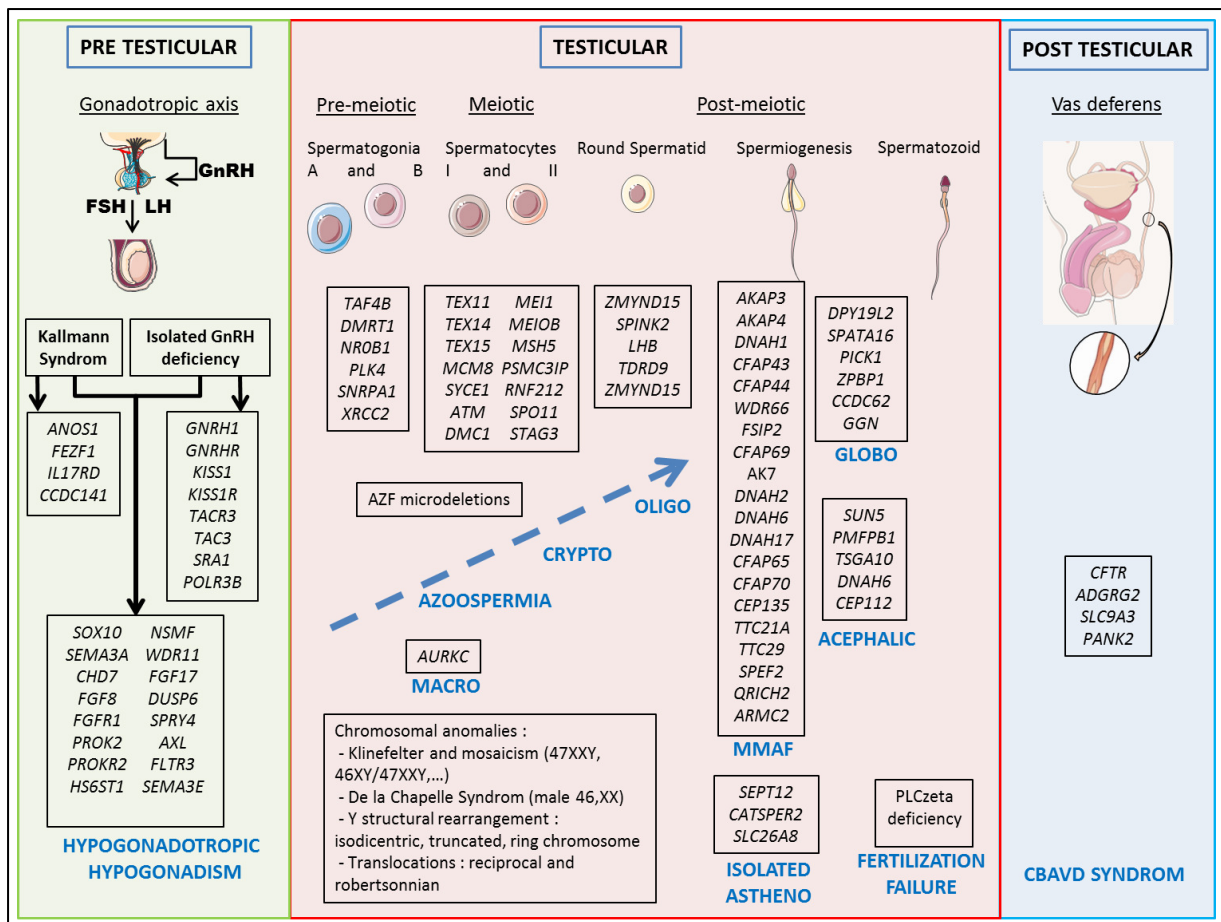
Les autres térazoospermies rencontrées sont les anomalies affectant la tête du spermatozoïde avec trois phénotypes décrits : la macrozoospermie avec des spermatozoïdes à tête large, la globozoospermie pour les spermatozoïdes à tête ronde

et enfin les spermatozoïdes acéphaliques en cas d'absence de la tête. Seul le gène *AURKC* a été impliqué dans la macrozoospermie à flagelles multiples chez l'homme, décrit pour la première fois par Dieterich et al. en 2007 (Dieterich et al. 2007). Ce gène code pour un composant du complexe CPC (Chromosome Passenger Complex) (Slattery et al. 2008), il est donc impliqué dans la liaison des chromosome au kinétochore et joue un rôle essentiel dans les divisions cellulaires et la cytokinèse. L'absence de la protéine fonctionnelle *AURKC* entraîne un défaut méiotique et une macrozoospermie avec la production de spermatozoïdes tétraploïdes (Dieterich et al. 2009). Concernant les spermatozoïdes acéphaliques, lorsqu'ils sont retrouvés dans l'éjaculat la cause principale est une anomalie du gène *SUN5* qui code pour une protéine localisée dans la membrane nucléaire interne au niveau de la jonction tête-flagelle dans les spermatides allongés et les spermatozoïdes matures (Yassine et al. 2015a). Les protéines à domaine SUN interagissent directement avec les domaines KASH des protéines à domaine KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne Homology) pour former le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) entre les membranes nucléaires interne et externe afin de relier le noyau au cytosquelette, *SUN5* assurant ainsi la liaison tête-flagelle du spermatozoïde (Tzur et al. 2006). Deux autres gènes ont été décrits dans cette pathologie: *PMFBP1* dont la protéine est localisée à la jonction tête-flagelle et interagit avec *SUN5* et *SPATA6* pour établir la liaison tête-flagelle (Zhu et al. 2018) et *TSGA10* exprimé dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde qui pourrait en cas d'anomalie entraîner une cassure de la pièce intermédiaire du spermatozoïde (Sha et al. 2018). Enfin, des anomalies des gènes *DNAH6*, *BRDT* et *CEP112* ont été retrouvées chez des patients présentant des spermatozoïdes acéphaliques mais ces gènes nécessitent encore des investigations pour confirmer leur implication dans cette pathologie. La globozoospermie est la dernière anomalie

morphologique de la tête des spermatozoïdes décrite et c'est le cœur de ce travail, elle sera détaillée dans la deuxième partie de l'introduction.

Pour terminer il est important de noter qu'un défaut qualitatif du spermatozoïde peut aussi concerner sa capacité à féconder l'ovocyte car c'est là son unique fonction. Un défaut dans cette capacité a été retrouvée chez quelques patients et reliée à un déficit de la protéine Phospholipase C Zeta 1 (PLCZ1)(Escoffier et al. 2016). Les anomalies génétiques de l'infertilité masculine sont donc extrêmement variées et concernent l'ensemble des étapes de production et de maturation des spermatozoïdes (Figure 3)

Pour conclure cette première partie, l'infertilité est un problème majeur de santé publique et il a été résumé ici les principales étiologies en se concentrant sur les principales anomalies génétiques décrites dans la littérature. Au cours de la seconde partie de l'introduction je détaillerai le phénotype ainsi que les différents gènes impliqués dans la globozoospermie, étiologie simplement citée précédemment.



**Figure 3 – Principales causes génétiques d'infertilité masculine décrites dans la littérature.** GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone ; FSH : Follicle Stimulating Hormone ; LH : Luteinizing Hormone ; MMAF : Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella ; Oligo : Oligozoospermia ; Crypto : Cryptozoospermia ; Globo : Globozoospermia ; Astheno : Asthenozoospermia ; Macro : Macrozoospermia ; CBAVD : Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. Trois stades d'atteintes impactent l'infertilité masculine : pré-testiculaire (fond vert), testiculaire (fond rouge) et post-testiculaire (fond bleu). Les différents mécanisme et cellules touchées sont représentés par des images, de l'axe gonadotrope aux canaux déférents en passant par les différents stades de développement du spermatozoïde. Les étiologies sont listées dans des encadrés noirs. Les différents phénotypes observés sont notés en bleu en dessous des encadrés correspondant.

## **PARTIE 2 (rédigée en anglais) – GLOBOZOOSPERMIA – LITERATURE REVIEW**

First described in humans in 1971, globozoospermia (MIM 613958, Spermatogenic Failure 9 (SPGF9)) is a rare (incidence 0.1%) and severe form of teratozoospermia characterized by the presence in the ejaculate of a large majority of round spermatozoa lacking acrosome (Sen et al. 1971; Dam et al. 2007a). Globozoospermic sperm are unable to adhere to or penetrate the zona pellucida, causing primary infertility. This phenotype exhibits two forms: “total” globozoospermia referring to patients with a homogeneous phenotype with ~100% round-headed sperm and “partial” globozoospermia characterized by a mosaic of normal and round-headed sperm in the ejaculate even if no precise cut-off threshold was clearly established. However, considering that globozoospermic sperm cells can be found with a proportion up to 9% in the general fertile population (Auger et al. 2016), globozoospermia is in practice diagnosed by semen analysis when a minimum of 20% to 50% of round-headed sperm cells is found in the ejaculate (Dam et al. 2011; Modarres et al. 2018; Oud et al. 2020). A rarer subtype of globozoospermia also known as pseudo-globozoospermia or acrosome hypoplasia has been described as the presence of an atrophied acrosome and almost systematically detached from the sperm head (Chemes 2018). Although some contradictory results were reported in literature, an increased aneuploidy rate was regularly described in round headed sperm as well as DNA damages related to defective chromatin condensation and DNA fragmentation compared to normal sperm cells (Yassine et al. 2015b; Coutton et al. 2015).

The physiopathological mechanism leading to globozoospermia was widely explored and, even if some uncertainty persists, it has been demonstrated that this

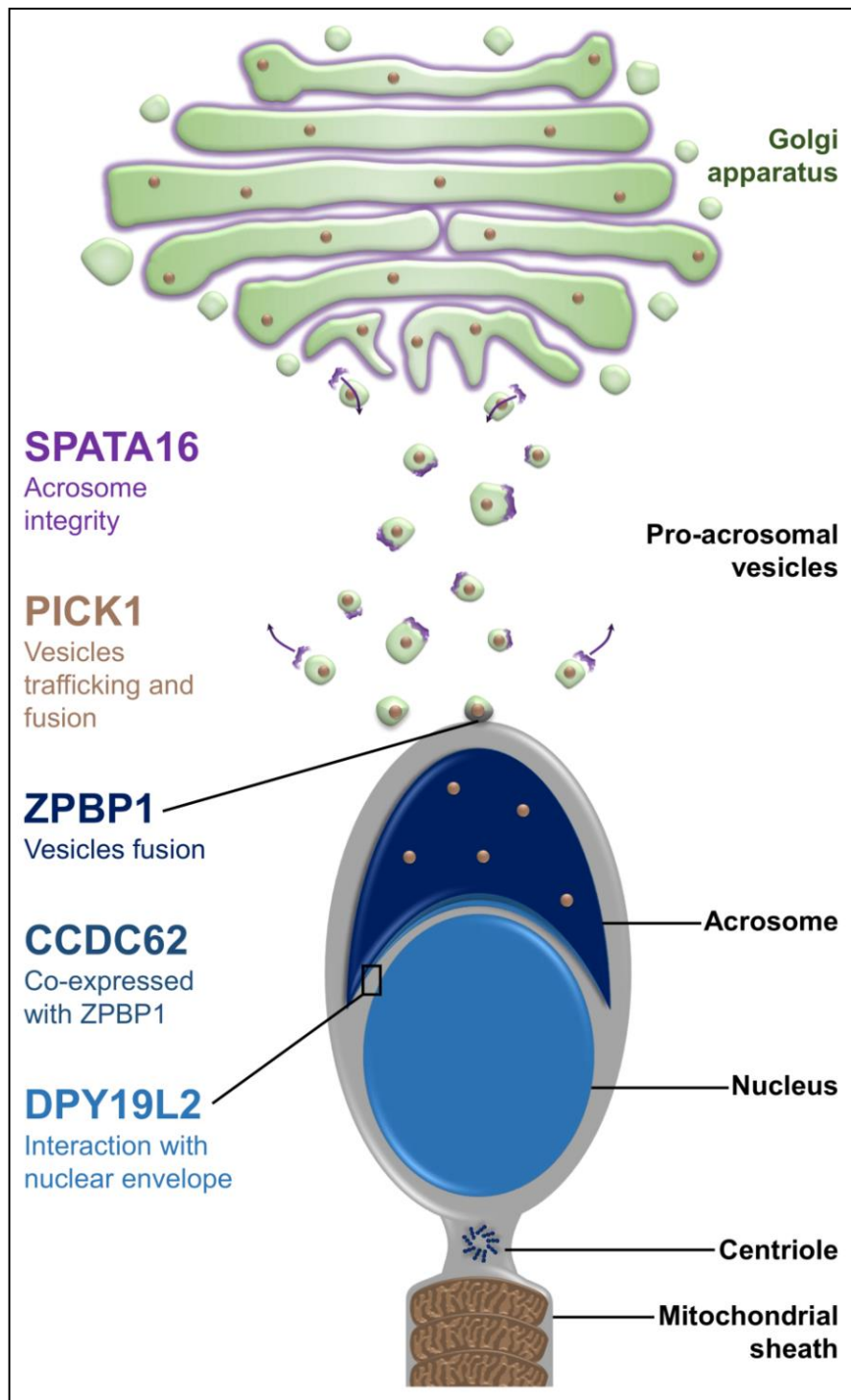
phenotype mainly arises from a failure of pro-acrosomal Golgi-derived vesicles formation, trafficking and fusion and/or a disruption of the interaction between the acrosome and the sperm nuclear envelope through the acroplaxome junction(Coutton et al. 2015). From a functional point of view, this abnormal acrosome formation results in a total depletion of hydrolytic and proteolytic acrosomal enzymes indispensable for the sperm-egg adhesion and penetration as well as for the oocyte activation with the phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) which is a sperm-borne specific phospholipase located along the inner acrosomal membrane and in the perinuclear theca(Yoon et al. 2008; Escoffier et al. 2015).

Genetic exploration of the globozoospermia phenotype began first with the creation of different knock-out mouse models allowing the identification of several genes involved in the different steps of the acrosome biogenesis(de Boer et al. 2014; Coutton et al. 2015). To date, more than 60 genetically modified mice reported in the Mouse Genome Informatics database (<http://www.informatics.jax.org>) contain in their phenotypic description a term related to “globozoospermia”. This finding is not surprising in view of the complexity and the multitude of proteins involved in acrosome biogenesis (Alvarez Sedó et al. 2012). Despite of this large list of candidate genes, only a few mutations have been identified in their human orthologs. In fact, currently, only 5 genes are confidently associated with globozoospermia in human: *SPATA16*, *DPY19L2*, *PICK1*, *ZPBP1* and *CCDC62*.

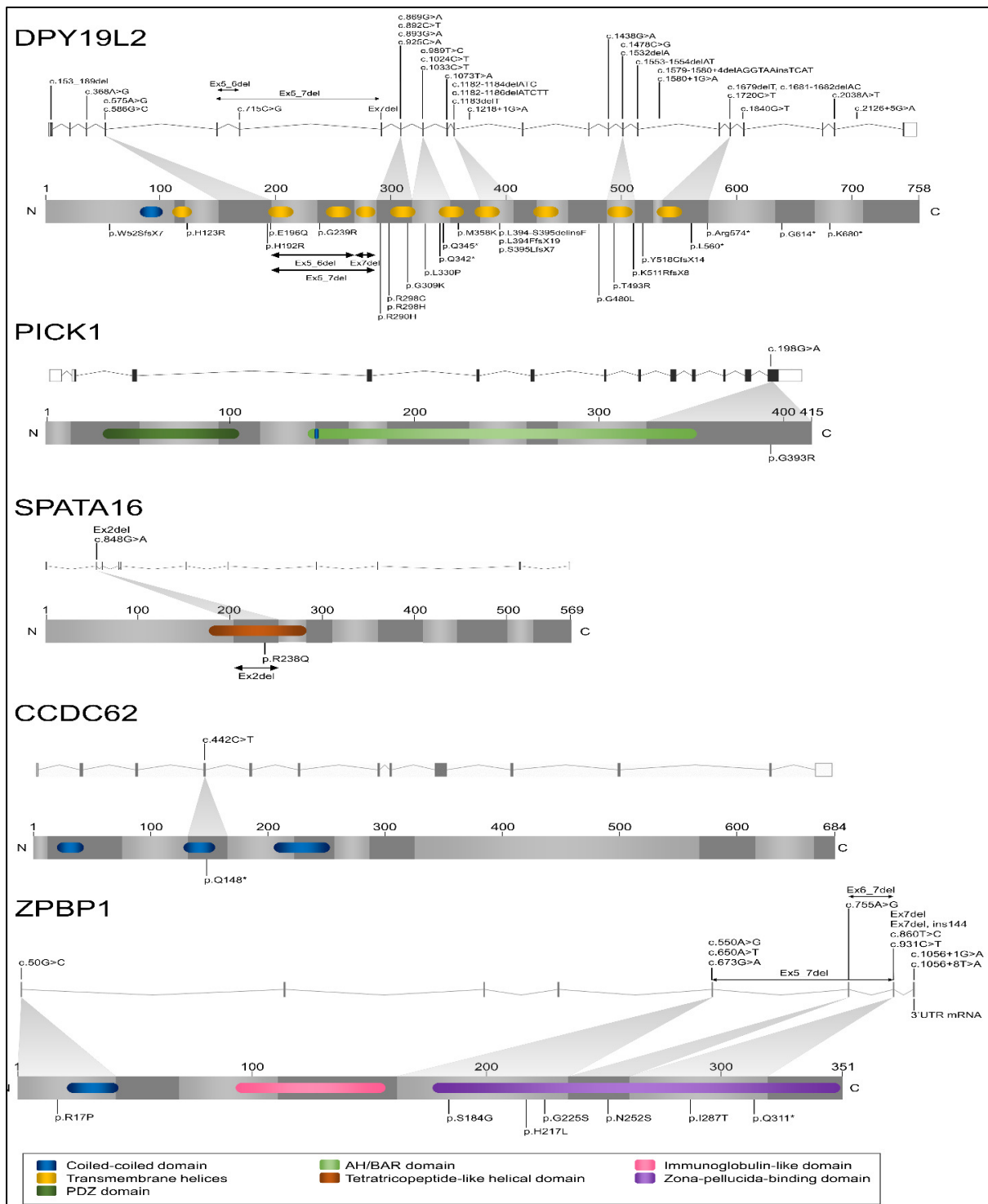
## **SPATA16**

Spermatogenesis associated 16 or SPATA16 (also previously named NYD-SP12) is a protein highly expressed in human testis (Dam et al. 2007b), which is located in the Golgi apparatus and in pro-acrosomal vesicles which fuse to form the acrosome during spermiogenesis (Xu et al. 2003; Dam et al. 2007b) and whose function is hypothetically to be involved in maintaining the integrity of the sperm acrosome (Figure 4). It was the first gene found to be responsible of human globozoospermia in 2007: a homozygous mutation (c.848G>A, p.R283Q) in SPATA16 was identified in three affected brothers from a consanguineous Ashkenazi Jewish family (Dam et al. 2007b). This variant induces the fourth exon skipping which causes a disruption in the C-terminal tetratricopeptide repeat domain (TPR domain) of SPATA16 (Figure 5). It is described as a protein-protein interaction module, highly conserved in mammals, which probably interact with GOPC and HRB proteins (Dam et al. 2007b). Moreover, in 2016, two out of nineteen globozoospermic patients showed a new *SPATA16* homozygous deletion affecting the exon 2 (Elhnati et al. 2016) (Figure 5). Interestingly, this new mutation led, in addition of severe total globozoospermia, to 39% of spermatozoa with double or multiple heads, 26% of spermatozoa with multiple flagella (two or more), a high rate of aneuploidy (6% in *SPATA16* mutated patients against 2.38% in controls) but also an important DNA damage like fragmentation (44% in *SPATA16* mutated patients against 10.25% in controls) (Ghédér et al. 2019). *SPATA16* mutations may thus disturb the TPR domain, disorganizing numerous protein-protein interactions and leading to an abnormal meiosis, which could explain this particular phenotype of total globozoospermia.





**Figure 4 - Known proteins involved in acrosome biogenesis whose functional absence leads to globozoospermia in human.** Acrosome biogenesis includes several steps including protein processing within the endoplasmic reticulum, vesicle trafficking from the Golgi apparatus, vesicle fusion, acrosome integrity, interaction of the acrosomal and nuclear membranes with the acroplaxome and maintaining integrity of the acrosomal matrix.



**Figure 5 - Location of mutations in the intron-exon structure and in the protein representation of the five genes (DPY19L2, PICK1, SPATA16, ZPBP1 and CCDC62) associated with globozoospermia in human. Exons are indicated as a black box, untranslated region as a clear box, introns as a line and the localization of the identified point mutations is shown by a line and the span of the identified genomic deletions is indicated by a line with two arrows at the end. Colored boxes indicate the known identified domains of the corresponding proteins.**

## **PICK1**

PICK1 or Protein interacting with C kinase 1 is a peripheral membrane protein involved in protein trafficking, a function that has been initially well characterized in neurons. PICK1 is ubiquitously expressed but mostly abundant in the brain and testis and remarkably contains both PSD-95/DlgA/ZO-1 (PDZ) domain and Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) domain through which the protein binds to a large number of membrane proteins and lipid molecules (Li et al. 2016). In testis, PICK1 was highly expressed in round spermatids and localized to Golgi-derived proacrosomal granules. Xiao et al. first observed that PICK1 interacted with GOPC and the primary catalytic subunit of protein kinase 2 (CK2 $\alpha'$ ), proteins whose deficiencies lead to globozoospermia in mice, and thus suggested that PICK1 is involved in vesicle trafficking from the Golgi apparatus to the acrosome (Xiao et al. 2009) (Figure 4). More recently, ICA1L, a protein which is also critical for acrosome formation at spermiogenesis, was identified as a new binding partner of PICK1 (He et al. 2015). In human, only one mutation in *PICK1* gene has been reported in 2010 (Liu et al. 2010) in a Chinese total globozoospermic patient with homozygous missense mutation (c.198G>A) in exon 13 (p.G393R) (Figure 5). Authors suggested that the altered amino acid G393R in the C-terminal domain may influence the negative regulation with the BAR domain and affect the formation of the acrosome because of the perturbation of lipid-BAR domain binding. Although PICK1 is involved in numerous biological functions, only isolated infertility with no other clinical features were reported for this patient, suggesting that the altered amino acid G393R only may induce alteration of germinal functions of PICK1 (Liu et al. 2010). In 2012, PICK1 was studied by Yatsenko's team in 381 teratozoospermic and 204 controls patients. No statistically

significant and functionally relevant mutations were discovered in the *PICK1* gene(Yatsenko et al. 2012).

## **ZPBP1**

The mouse ortholog ZPBP1 (sp38) was first shown to be required for sperm acrosome formation, compaction and sperm-egg binding(Lin et al. 2007). The lack of this protein in KO mice leads to acrosome fragmentation, disrupted Sertoli-spermatid junctions and a defective sperm head morphology with characteristics reminiscent of globozoospermia in human. In human, ZPBP1 is involved in sperm-egg interaction (binding and penetration) during fertilization and is located in the acrosomal membrane and likely interacts with multiple acrosomal matrix proteins(Lin et al. 2007) (Figure 4). In 2012, Yatsenko et al. identified homozygous and heterozygous missense and splicing mutations in *ZPBP1* in 15 out of the 381 men with abnormal sperm head morphology (Figure 5). These mutations were not observed in 240 matched controls(Yatsenko et al. 2012). They hypothesized that most of the missense mutations exert a dominant-negative effect due to altered ZPBP1 protein folding and protein-protein interactions in the acrosome(Yatsenko et al. 2012). All the identified mutations were found in patients with 64% to 98% of heads defects(Yatsenko et al. 2012)resembling the abnormal head morphology phenotype of *Zpbp1* mouse knockout model(Yatsenko et al. 2012). More recently Oud et al. identified a nonsense mutation, c.931C>T; p.(Gln311Ter), in a total globozoospermic patient (Figure 5). This variant is absent of the general population and is located in a homozygosity region of approximately 24 Mb on chromosome 7. This mutation may lead to a truncated protein lacking the 40 last amino acids of the conserved SP38 domain of the protein.

## **CCDC62**

Coiled Coil Domain-Containing 62 (CCDC62) was first described in 2017 in infertile male mice presenting spermatozoa with low motility (only less than 5% motile spermatozoa), middle piece, head and acrosome defects (Li et al. 2017). CCDC62 is likely present in the Golgi apparatus during the first stages of spermatogenesis and then in the acrosome during the elongation and maturation phases (Figure 4). It appeared that CCDC62 was required for cytoplasm removal and acrosome formation during spermiogenesis. CCDC62 shares similar coiled-coil domains with GOPC and PICK1, proteins whose deficiencies lead to globozoospermia in mice, but may interact only with GOPC (Wang et al. 2015). Interestingly, in humans, CCDC62 was also shown to be co-expressed with ZBP1. Recently, Oud et al. identified two homozygous mutations in CCDC62 in one patient with globozoospermia: one nonsense mutation c.442C > T; p.(Gln148Ter) and one missense mutation c.847C > T; p.(His283Tyr) (Figure 5). The premature stop codon is located before the missense variant and is predicted to cause nonsense-mediated decay resulting in an absence of protein.

## **DPY19L2**

In 2011, a recurrent whole-gene deletion of *DPY19L2* was reported in 15 patients out of 20 globozoospermic patients (Harbuz et al. 2011). In spermatozoa, the *DPY19L2* protein is located in the inner nuclear membrane and anchors the developing acrosome to the nuclear envelope through a cytoskeletal plate designated acroplaxome (Pierre et al. 2012) (Figure 4). In fact, in spermatozoa from *DPY19L2* mutated patients, the inner nuclear membrane is destabilized and then separated from the outer nuclear membrane, leading to the entire detachment of the acrosome. Furthermore, it has been shown that other nuclear proteins, like SUN proteins, expressed during spermatogenesis were involved in sperm head formation. Once stabilized in the inner nuclear membrane of spermatozoa, SUN proteins enroll KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne Homology) proteins (Pasch et al. 2015), located in the outer nuclear membrane, thus forming the LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complex binding the two inner and outer nuclear envelopes, ensuring the maintenance of the nuclear membrane rigidity and anchoring the nucleus to cytoplasmic structure through the cytoplasmic domain of KASH proteins. It was then hypothesized that *DPY19L2*, SUN and KASH proteins may be potential interacting partners (Ray et al. 2016) and that *DPY19L2* may stabilize the LINC complex. *DPY19L2* has also a large N-terminus intra-nuclear domain, which may bind at the same time the nuclear dense lamina. The super structure comprising the *DPY19L2* and the LINC complex may therefore links luminal component of the nucleus to the acroplaxome. A recent study using three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH) demonstrated that *DPY19L2*-deficient globozoospermic patients display impaired sperm chromocenter organization and altered spatial organization of chromosome 7, 18 and X (Abdelhedi et al. 2019). This study further strengthens the

hypothesis that DPY19L2 might be considered as a LINC-like protein having a crucial role in the organization of nuclear chromatin in sperm nucleus through its interaction with nuclear lamina. Therefore, after a first step of acroplaxome-acrosome complex docking on the outer nuclear membrane during spermatogenesis, a second step of partnership between DPY19L2, SUN proteins and KASH proteins would allow and stabilize the establishment and spreading of the acrosome (Pereira et al. 2019). This hypothesis has however not been formally confirmed and the molecular partners of DPY19L2 remain to be characterized. Comparative testicular transcriptome studies of wild type and globozoospermic Dpy19l2 KO mice were also realized to attempt to identify Dpy19l2 molecular partners but no conclusive result was obtained (Karaouzène et al. 2013). More recent proteomic sperm analyses of globozoospermic patient carrying a *DPY19L2* homozygous deletion showed that 491 sperm proteins differentially expressed between patients and controls (Guo et al. 2019) including protein involved in acrosome biogenesis but also in chromatin composition, sperm-egg binding and egg activation. In particular, authors identified IZUMO family proteins (IZUMO1-4) among the mostly downregulated (Guo et al. 2019). In addition to its structural function during acrosome biogenesis, the C-mannosyltransferase function of its ancestral protein DPY-19 has raised the hypothesis that DPY19L2 may have also a function in glycosylation of sperm proteins but this remains to be demonstrated (Buettner et al. 2013).

## **NEW CANDIDATE GENES**

Using whole-exome sequencing, a recent study also identified interesting five candidate genes to explain the globozoospermia in a cohort of 15 patients (Oud et al. 2020). They identified rare missense mutations in *C2CD6* (also known as *ALS2CR11*), *CCIN*, *C7orf61* and *DHNA17* in one patient each and a frameshift mutation in *GGN* in two patients. All these genes may have putative location or function in acrosome but these assumptions are not clearly supported by the mutant model when available. Moreover, these missense mutations were not validated with functional work and should be interpreted with caution. As example, missense and truncating mutations in *DNAH17* were formally associated with another teratozoospermia leading to severe flagellum malformations known as MMAF phenotype in human and mouse in three recent and independent publications (Touré et al. 2020).

The next part of this work is an original article presenting the genetic analyses performed on a large cohort of 69 globozoospermic patients in order to obtain an etiological diagnosis of their pathology.



**PARTIE 3 – ARTICLE ORIGINAL (rédigé en anglais) -  
GENETIC ANALYSES OF A LARGE COHORT OF INFERTILE  
PATIENTS WITH GLOBOZOOSPERMIA, DPY19L2 STILL THE  
MAIN ACTOR, GGN CONFIRMED AS A GUEST PLAYER**

Cette troisième partie se décline sous la forme d'un article scientifique original tel qu'il a été accepté dans le journal « Human Genetics ». Ce travail de thèse a été réalisé dans un contexte de diagnostic génétique chez des patients masculins atteints d'une infertilité causée par la présence de spermatozoïdes globozoospermiques dans l'éjaculat. Comme expliqué en introduction, le gène *DPY19L2* est la principale cause de cette affection, nous avons donc dans un premier temps recherché la présence d'anomalies de ce gène puis, dans un second temps, au niveau des autres gènes décrits chez l'homme comme étant impliqués dans la globozoospermie. Nous avons également confronté leurs résultats de spermocytogrammes aux résultats des analyses génétiques. L'ensemble de ce travail avait pour objectifs d'analyser l'implication de *DPY19L2* et d'autres gènes candidats au sein d'une large cohorte de patients globozoospermiques et d'étudier la corrélation génotype-phénotype dans leur pathologie, le tout afin d'envisager une amélioration de la stratégie diagnostique actuellement utilisée chez ces patients pour perfectionner leur prise en charge.

# Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, *DPY19L2* still the main actor, GGN confirmed as a guest player.

Tristan Celse<sup>1,2</sup>, Caroline Cazin<sup>1,2</sup>, Flore Mietton<sup>2</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,3</sup>, Delphine Martinez<sup>2</sup>, Nicolas Thierry-Mieg<sup>4</sup>, Amandine Septier<sup>4</sup>, Catherine Guillemain<sup>5,6</sup>, Julie Beurois<sup>1</sup>, Antoine Clergeau<sup>7</sup>, Selima Fourati Ben Mustapha<sup>8</sup>, Mahmoud Kharouf<sup>8</sup>, Abdelali Zoghmar<sup>9</sup>, Ahmed Chargui<sup>10</sup>, Aline Papaxanthos<sup>11</sup>, Béatrice Dorphin<sup>12</sup>, Bernard Foliguet<sup>13</sup>, Chema Triki<sup>14</sup>, Christophe Sifer<sup>15</sup>, Dominique Lauton<sup>16</sup>, Gérard Tachdjian<sup>17</sup>, Gilles Schuler<sup>18</sup>, Hervé Lejeune<sup>19</sup>, Jacques Puechberty<sup>20</sup>, Julien Bessonnat<sup>21</sup>, Laurent Pasquier<sup>22</sup>, Lionel Mery<sup>23</sup>, Marine Poulain<sup>24</sup>, Myriam Chaabouni<sup>8</sup>, Nathalie Sermondade<sup>25</sup>, Rosalie Cabry<sup>26</sup>, Sebti Benbouhadja<sup>9</sup>, Ségolène Veau<sup>27</sup>, Cynthia Frapsauce<sup>28</sup>, Valérie Mitchell<sup>29</sup>, Vincent Achard<sup>30</sup>, Veronique Satre<sup>1,3</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,21</sup>, Raoudha Zouari<sup>5</sup>, Christophe Arnoult<sup>1</sup>, Zine-Eddine Kherraf<sup>1,2</sup>, Charles Coutton<sup>1,3</sup> and Pierre F. Ray<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> CHU Grenoble Alpes, UM GI-DPI, Grenoble, 38000, France

<sup>3</sup> CHU Grenoble Alpes, UM de Génétique Chromosomique, 38000 Grenoble, France.

<sup>4</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France

<sup>5</sup> Assistance-Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Pôle Femmes-Parents-Enfants, Centre Clinico-biologique AMP-CECOS, Plateforme Cancer et Fertilité ONCOPACA-Corse, Marseille, France

<sup>6</sup> Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, UMR\_S 1251, Marseille, France

<sup>7</sup> Diabetes Care Unit, University Hospital of Caen, Caen, France

<sup>8</sup> Polyclinique les Jasmins, Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Centre Urbain Nord, 1003 Tunis, Tunisia

<sup>9</sup> Reproduction Sciences and Surgery Clinique, Ibn Rochd, Constantine, Algeria

<sup>10</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Assistance

Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Universitaire Paris Centre, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Cochin, Service d'Histologie-Embryologie-Biologie de la Reproduction, Paris, France

<sup>11</sup> Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

<sup>12</sup> AMP74, CH Alpes Léman, Contamine-sur-Arve, France

<sup>13</sup> Toxicology and Molecular Biology, Institute Jean Lamour UMR 7198 du CNRS, Université de Lorraine, F-54000, Nancy, France

<sup>14</sup> Clinique Hannibal, Centre d'AMP, les berges du lac, 1053 Tunis, Tunisia

<sup>15</sup> Service de Biologie de la Reproduction, d'Histo-Embryologie et Cytogénétique, Hôpital Jean-Verdier, Avenue du 14 Juillet, Bondy 93140, France.

<sup>16</sup> Department of Endocrinology, Diabetes, Nutrition, Montpellier University Hospital, Montpellier, France

<sup>17</sup> UMR 967, INSERM, Service d'Histologie Embryologie et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, AP-HP, Clamart, France

<sup>18</sup> Gynécologie obstétrique, Sallanches, France

<sup>19</sup> Reproductive Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>20</sup> Département de Génétique Médicale, Maladies rares et Médecine personnalisée, Université Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

<sup>21</sup> CHU de Grenoble, UF de Biologie de la procréation, 38000, Grenoble, France

<sup>22</sup> Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest, CHU Rennes, Rennes, France

<sup>23</sup> Service de Médecine de la Reproduction, CHU de Saint-Étienne, Hôpital Nord, 42055 Saint-Étienne Cedex 2, France.

<sup>24</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Hôpital Foch - Université de Paris Ouest (UVSQ), France

<sup>25</sup> Service de biologie de la reproduction - CECOS, hôpital Tenon, 75020 AP-HP, Paris, France

<sup>26</sup> Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, Picardie University Jules Verne, Amiens University Medical Centre, Amiens, France

<sup>27</sup> Univ Rennes, CHU, Centre d'AMP- CECOS, 16 Boulevard de Bulgarie, 35000, Rennes, France

<sup>28</sup> CHU Bretonneau, Médecine et Biologie de la Reproduction-CECOS, Tours, France

<sup>29</sup> EA 4308, Department of Reproductive Biology and Spermiology-CECOS Lille, University Medical Center, Lille, 59037, France

<sup>30</sup> CECOS-laboratoire de biologie de la reproduction, pôle de gynécologie obstétrique et reproduction (Gynépôle), Assistance publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM) la Conception, 13005 Marseille, France; Centre clinico-biologique d'assistance médicale à la procréation, pôle de gynécologie obstétrique et reproduction (Gynépôle), Assistance publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM) la Conception, 13005 Marseille, France; Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie (IMBE UMR 7263), équipe biogénotoxicologie, santé humaine et environnement, faculté de médecine, Aix Marseille université, CNRS, IRD, université Avignon, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

\*Correspondence: [pray@chu-grenoble.fr](mailto:pray@chu-grenoble.fr)

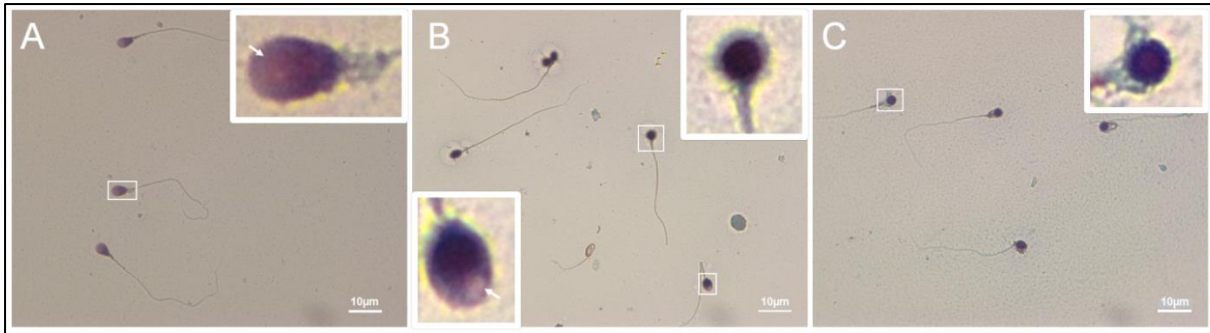
## **ABSTRACT**

Globozoospermia is a rare phenotype of primary male infertility inducing the production of round-headed spermatozoa without acrosome. Anomalies of *DPY19L2* account for 50 to 70% of all cases and the entire deletion of the gene is by far the most frequent defect identified. Here, we present a large cohort of 69 patients with 20% to 100% of globozoospermia. Genetic analyses including multiplex ligation-dependent probe amplification, Sanger sequencing and whole exome sequencing identified 25 subjects with a homozygous *DPY19L2* deletion (36%) and 14 carrying other *DPY19L2* defects (20%). Overall, 11 deleterious single nucleotide variants were identified including 8 novel and 3 already published mutations. Patients with a higher rate of round-headed spermatozoa were more often diagnosed and had a higher proportion of loss of function anomalies, highlighting a good genotype phenotype correlation. No gene defects were identified in patients carrying <50% of globozoospermia while diagnosis efficiency rose to 77% for patients with >50% of globozoospermia. In addition, results from whole exome sequencing were scrutinized for 23 patients with a *DPY19L2* negative diagnosis, searching for deleterious variants in the nine other genes described to be associated with globozoospermia in human (*C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZBP1*). Only one homozygous novel truncating variant was identified in the *GGN* gene in one patient, confirming the association of *GGN* with globozoospermia. In view of these results, we propose a novel diagnostic strategy focusing on patients with at least 50% of globozoospermia and based on a classical qualitative PCR to detect *DPY19L2* homozygous deletions. In the absence of the latter, we recommend to perform whole exome sequencing to search for defects in *DPY19L2* as well as in the other previously described candidate genes.

**KEY WORDS (4 to 6)** : globozoospermia / DPY19L2 / sequence analysis / point mutations / genotype-phenotype correlation / diagnostic strategy

## **INTRODUCTION**

Infertility is a major health concern, affecting approximately 50 million couples worldwide (Mascarenhas et al. 2012), or 12.5% of women and 10% of men (Datta et al. 2016). Among the factors leading to male infertility, alterations of spermatogenesis are the major cause including quantitative defects (azoo- or oligozoospermia) or qualitative defects (teratozoospermia or asthenozoospermia). Globozoospermia is a rare (incidence 0.1%) and severe form of teratozoospermia characterized by the presence in the ejaculate of a large majority of round spermatozoa without acrosome (#MIM102530). Globozoospermic sperm are thus unable to adhere and to penetrate the zona pellucida, causing primary infertility. It is important to differentiate total globozoospermia referring to patients with a homogeneous phenotype with ~100% round-headed sperm and partial globozoospermia with a variable percentage of spermatozoa of typical shape (Figure 6). A minimum threshold of 20 to 50% of round headed spermatozoa is commonly used in the literature to confirm the diagnosis of globozoospermia (Dam et al. 2007, 2011; Modarres et al. 2018; Oud et al. 2020).



**Figure 6 – Optical microscopic observations of spermatozoa.** Scale = 10µM. The acrosome is at the tip of the white arrow. A) Semen of a control patient with only normal spermatozoa (absent from the cohort). Zoom on a spermatozoon's head of typical shape (white square in the upper right corner). The acrosome can be identified as the white halo at the front of the head. The nucleus is the black part closer to the intermediate piece. B) Semen from a patient with partial globozoospermia. Zoom on a round headed spermatozoon without acrosome, the shape of the head follows the shape of the nucleus (white square in the upper right corner). Zoom on a spermatozoon with an intermediate shape close to the normal spermatozoon in image A but with a smaller irregular acrosome at the front (white square in the lower left corner). C) Semen of a patient with total globozoospermia containing only globozoospermic spermatozoa. Zoom on a round headed spermatozoon without acrosome, similar to the one on image B (white square in the upper right corner).

Genetics analyses permitted to decipher the different factors involved in the pathogenesis of globozoospermia. Alterations of many genes encoding for proteins involved in several critical steps of acrosome biogenesis such as the vesicle transport from the Golgi to the acrosome, vesicle fusion, and membrane interaction, have been demonstrated to be responsible for globozoospermia or globozoospermia-like phenotypes (Coutton et al. 2015). As the phenotype is very severe and specific, all cases of total globozoospermia are believed to have a genetic cause. To date, mutations in *C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZBP1* have all been described in globozoospermia patients, but only a handful of patients carrying variants in any of these genes have been described (Dam et al. 2007; Liu et al. 2010; Yatsenko et al. 2012; Elnati et al. 2016; Oud et al. 2020). The main genetic causes of total globozoospermia are alterations of the *DPY19L2* gene which are found in approximately two-thirds of globozoospermia patients (Coutton et al. 2015).

*DPY19L2*, located in 12q14.2, is predominantly expressed in the testis and encodes a transmembrane protein which is part of the DPY19 protein family. The study of wild type and homozygous knock out (KO) *Dpy19l2* male mice demonstrated that the protein is present from the round spermatid stage onwards and that it localizes to the inner nuclear membrane, exclusively in regards to the forming acrosome (Pierre et al. 2012). In the absence of *DPY19L2*, the forming acrosome separates from the nucleus before being totally removed from the sperm with the cytoplasmic droplets, demonstrating that *DPY19L2* is necessary to anchor the acrosome to the nucleus (Pierre et al. 2012). In addition to its structural function during acrosome biogenesis, the C-mannosyltransferase function of its ancestral protein DPY-19 has raised the hypothesis that *DPY19L2* may have a function in glycosylation of sperm proteins but

this remains to be demonstrated (Buettner et al. 2013). A recurrent 200-kb homozygous deletion is the most frequent event affecting *DPY19L2*, identified in a variable proportions of globozoospermic patients ranging from 19%(Koscinski et al. 2011) to 75%(Harbuz et al. 2011). This variability may be explained in part by the geographical origins of the studied cohorts of patients, the degrees of consanguinity of the studied patients but mainly by the inclusion of different proportion of patients with partial globozoospermia(Ray et al. 2017). The mechanism leading to the deletion is however consensual and was described to be due to a Non-Allelic Homozygous Recombination (NAHR) occurring between two homologous 28-kb low copy repeats (LCRs) located on each side of the gene(Harbuz et al. 2011; Koscinski et al. 2011; Elinati et al. 2012; Coutton et al. 2013). Many point mutations and small deletions have also been described as causal (Elinati et al. 2012; Modarres et al. 2016; Chianese et al. 2015; Shang et al. 2019; Coutton et al. 2012b; Zhu et al. 2013; Ghédir et al. 2016; Oud et al. 2020). Overall, a total of 22 deleterious variants has been described including 5 splice variants, 9 loss of function variants, a deletion of three nucleotides and 7 missense variants. All of them represent approximately 20% of the pathological alleles (Ray et al. 2017). Based on these data, the consensual diagnosis strategy for patients presenting a total or partial globozoospermia is to first screen for the presence of the *DPY19L2* gene deletion before searching for *DPY19L2* point mutations and then defects in other candidate genes.

Here we present the genetic results from a large cohort of 69 patients presenting with globozoospermia. We performed a first-line screening using MLPA for all patients allowing to quantify the number of *DPY19L2* alleles present in each patient. In the absence of a homozygous deletion of the whole gene, we subsequently performed either Sanger sequencing of the 22 *DPY19L2* exons and/or whole-exome sequencing



(WES). We identified 8 novel homo- or hemizygous point mutations, 3 causal variants already reported in other publications and 2 heterozygous variants of unknown significance. Then we continued the analysis in 23 patients without a causal *DPY19L2* anomaly and for which we performed a whole exome sequencing allowing us to look for variants in the genes described to be associated with globozoospermia in Human (*C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZPBP1*). For these 9 genes analyzed in 23 subjects, we only identified one deleterious variant present in a single patient. The variant was a homozygous loss of function variant affecting the *GGN* gene. We also compared the sperm parameters in our cohort of patients according to their *DPY19L2* genotype to explore a potential genotype-phenotype correlation. This work permitted to identify new deleterious variants and to refine the current diagnostic strategy for globozoospermia.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

We recruited 73 patients, all addressed to Grenoble Hospital between 2012 and 2019 for the genetic investigation of globozoospermia. All patients had a medical consultation for infertility and a sperm analysis revealing complete or partial globozoospermia. Informed consent was obtained from all the patients participating in the study according to local protocols and the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by local ethics committees, and samples were then stored in the CRB Germethèque (certification under ISO-9001 and NF-S 96-900) following a standardized procedure or were part of the Fertithèque collection declared to the French Ministry of health (DC-2015-2580) and the French Data Protection Authority (DR-2016-392). Most patients originated from France (43/73 patients) or North Africa (n=26 including 13 from Tunisia, 12 from Algeria and 1 from Morocco) but also from Turkey (n=3), Cape-Verde (n=1), Iraq (n=1). All patients were unrelated and unpublished globozoospermic patients except for 3 Algerian patients who are brothers. Within our cohort, 10 patients reported consanguinity in their family. Their geographical origin is representative of the cohort with 5 patients from France, 3 patients from North Africa (2 Tunisians and 1 Algerian), 1 patient from Iraq and finally 1 of Turkey. We excluded patients with less than 20% of round headed spermatozoa without acrosome and patients with a sperm concentration under 1 Million per milliliter (Figure 7). Overall 69 patients were analyzed and are presented here.

## Semen analysis

Sperm analysis was performed during the routine biological examination of the patients according to World Health Organization Guidelines (Cooper et al. 2010). It was carried out in different source laboratories and protocol variations cannot be excluded. Sperm parameters from the different groups of patients were compared according to their genotype, as described in Table 1. A two-tailed t test analyzing was employed to identify significant differences between patient groups using GraphPad Prism version 8.4.2 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

**Table 1 - Comparison of sperm parameters between groups according to the patients' genotype.**

Patients	Group 1 : Loss of function anomaly (n=30)		Group 2 : Hemi- or Homozygous missense mutation (n=10)		Group 3 : Absence of causal anomaly (n=29)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Sperm volume (mL)	3.42	1.32	3.07	1.78	3.64	1.53
Nb spz (x10 <sup>6</sup> per mL)	73.18	47.95	49.34	56.20	33.03	38.22
Vitality	68.67	14.43	62.86	16.70	53.70	16.37
Motility (A+B. 1h)	30.62	10.94	20.13	9.78	23.50	16.86
Round cells (x10 <sup>6</sup> per mL)	3.22	4.26	4.38	7.73	3.18	3.08
Normal spermatozoa	0.06	0.24	0.00	0.00	2.08	3.60
Intermediate piece angulation	16.00	10.19	17.33	9.78	24.04	14.16
Rolled flagella	14.07	8.81	21.17	11.98	12.12	9.10
Flagella of irregular caliber	2.93	6.42	1.00	0.89	2.77	8.54
Shortened flagella	0.93	1.34	1.80	2.71	3.15	2.80
Absence of flagella	1.43	2.06	4.00	3.90	3.12	4.08
Multiple flagella	1.29	1.58	1.67	1.37	2.12	3.57
Multiple heads	1.43	1.72	2.67	4.68	2.85	3.59
Acrosome anomaly	98.96	3.21	97.75	3.67	92.75	11.14
Round head	94.33	11.51	89.33	17.26	60.08	29.43
Microcephaly	81.79	32.62	68.67	26.66	40.77	28.72
Base anomaly	23.23	34.96	23.00	24.80	47.48	31.31
Multiple anomalies index	2.62	0.59	2.35	0.54	2.66	0.58

Values are expressed in percent, unless specified otherwise. SD = Standard deviation

### **DNA extraction**

DNA was extracted from blood and saliva samples. Saliva was collected with ORAGEN DNA OG-500 kits from DNA GENOTEK Inc and extraction was performed using the manufacturer's recommendation. Concerning blood samples, DNA was isolated from EDTA blood using the DNeasy Blood & Tissue Kits from QIAGEN SA (Courtaboeuf, France).

### **MLPA analysis**

MLPA analysis uses probes specific of exons 1, 17 and 22 according to our protocol, already described by Coutton et al. 2012a, b. We realized it to investigate *DPY19L2* entire gene deletion in 69 patients.

### **Whole-exome sequencing and bioinformatics analyses**

Whole-exome sequencing was performed for 28 out of 69 patients without *DPY19L2* homozygous deletion. Coding regions and intron/exon boundaries were sequenced after enrichment using Sure Select Human All Exon V6 –from Agilent. An alignment-ready GRCh38 reference genome (including ALT, decoy and HLA) was produced using "run-gen-ref hs38DH" from Heng Li's bwa kit package (<https://github.com/lh3/bwa>). The exomes were analyzed using a bioinformatics pipeline developed in-house. The pipeline consists of two modules, both distributed under the GNU General Public License v3.0 and available on github. The first module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Primary>) takes FASTQ files as input and produces a single merged GVCF file, as follows. Adaptors are trimmed and low-quality reads filtered with fastp 0.20.0(Chen et al. 2018), reads are aligned with BWA-MEM

0.7.17 (Li 2013), duplicates are marked using samblaster 0.1.24 files are sorted and indexed with samtools 1.9 (Li et al. 2009). SNVs and short indels are called from each BAM file using strelka 2.9.10 (Kim et al. 2018) to produce individual GVCF files. These are finally merged with merge GVCFs\_strelka.pl to obtain a single multi-sample GVCF, which combines all exomes available in our laboratory. The second module (<https://github.com/ntm/grexome-TIMC-Secondary>) takes this merged GVCF as input and produces annotated analysis-ready TSV files. This is achieved by performing up to 15 streamlined tasks, including the following. Low-quality variant calls (DP<10, GQX<20, or less than 15% of reads supporting the ALT allele) are discarded. Variant Effect Predictor v92 (McLaren et al. 2016) is used to annotate the variants and predict their impact, allowing to filter low-impact variants and/or prioritize high-impact ones (e.g. stop-gain or frameshift variants). Gene expression data from the Genotype-Tissue Expression project (GTEx v7) are added. Variants with a minor allele frequency greater than 1% in gnomAD v2.0, 3% in 1000 Genomes Project phase 3, or 5% in NHLBI ESP6500 are filtered. Variants are also compared to those obtained from 250 exomes of healthy control individuals or of patients presenting a clearly different phenotype. Because all variants result from the same bioinformatics pipeline, this allows to filter artifacts due to the pipeline itself, as well as genuine variants that may be missing from public databases but are actually not so rare in our cohorts. Finally, the resulting TSV files can be opened with spreadsheet software such as Libre Office Calc or Microsoft Excel for further filtering and sorting, in order to identify candidate causal variants.

Candidate variants identified in *DPY19L2* and other genes were subsequently confirmed by Sanger sequencing using an Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer. Analyses were performed according to the protocol described below.

### **DPY19L2 Sanger sequencing**

Full *DPY19L2* Sanger sequencing was performed for 16 patients including five patients without *DPY19L2* deletion and eleven patients with a heterozygous deletion.

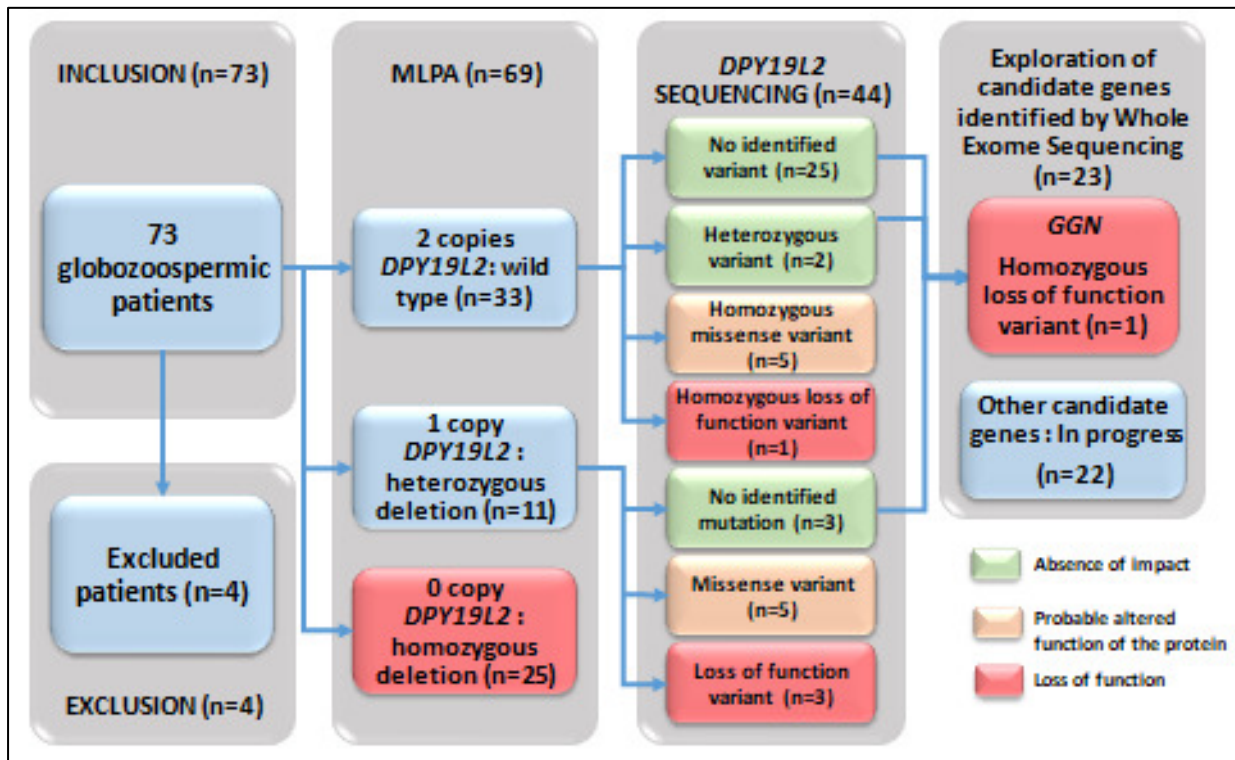
The 22 *DPY19L2* exons and intronic boundaries were amplified using the PCR primers described in supplementary table 1. Sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) and sequence analyses were carried out on an ABI3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using the Seqscape software (Applied Biosystems). The nomenclature of the identified variants was established according to Human Genome Variation Society (HGVS)(den Dunnen and Antonarakis 2000). Sequence numbering refers to ENST00000324472 for the cDNA sequence and variations or probes are based on the UCSC GRCh38/hg38 assembly.

### **In-silico analyses of sequence variants**

The pathogenicity of the identified variants was predicted using Varsome (<https://varsome.com/>) (Kopanov et al. 2019) and Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) (Adzhubei et al. 2010). The potential effect of these variants on RNA splicing was assessed with Human Splicing Finder – V3.1 (<http://www.umd.be/HSF>) (Desmet et al. 2009).

## RESULTS

A total of 73 globozoospermic men were addressed for the genetic analysis of *DPY19L2*. Four patients were excluded as they did not pass the eligibility criteria: one had less than 20% of globozoospermic spermatozoa and three had an insufficient sperm concentration (<1million per milliliter) (Figure 7).



**Figure 7 – Schematic representation of the molecular diagnostic investigations carried out on the cohort of 69 patients with globozoospermia.** 73 patients were recruited, we excluded 4 subjects because of a low rate of round-headed spermatozoa ( $n = 1$ ) or a low concentration of sperm in the ejaculate ( $n = 3$ ). We performed MLPA on 69 patients and diagnosed 25 homozygous *DPY19L2* deletions. We carried out Sanger sequencing of *DPY19L2* 22 exons in 11 heterozygous patients and diagnosed 5 patients with a missense variant and 3 patients with loss of function variant on their only allele. Among 33 patients without any *DPY19L2* deletion detected by MLPA, we detected 1 patient with a homozygous loss of function variant, 5 patients with a missense variant and 2 patients with a single heterozygous variant. 25 Patients presented no anomalies in *DPY19L2*. Among the 30 patients without any detected *DPY19L2* causal anomaly, we performed Whole Exome Sequencing for 23 of them and detected only one homozygous loss of function variant in *GGN* in one patient.

Gene defects were only search in the genes already associated with globozoospermia in Human (*C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZPBP1*). For the 22 other patients, no deleterious variants were identified in these genes and investigations are pursued to identify new globozoospermia candidate genes.

### **DPY19L2 investigations in our cohort of 69 globozoospermic patients**

We performed MLPA analysis on 69 DNA samples extracted from globozoospermic patients: 25 carried a homozygous deletion of the whole *DPY19L2* gene (36.2%) including the three Algerian brothers, 11 had a heterozygous deletion (15.9%) and 33 patients harbored no *DPY19L2* deletion (47.8%) (Figure 7).

Further analyses were carried out for the 44 subjects who did not carry a homozygous deletion. Sanger sequencing of *DPY19L2* 22 exons was performed for 16 patients including the first five recruited patients without *DPY19L2* deletion and all patients (n=11) carrying a heterozygous deletion. Whole exome sequencing was performed on the remaining 28 non-deleted patients.

For the heterozygous deleted subjects, eight patients (73%) harbored a hemizygous deleterious mutation on their unique allele and no deleterious variants were identified in the three remaining subjects (Figure 7). For the 33 patients without the *DPY19L2* deletion, six had a homozygous variant (6/33, 18.2%) and two had a heterozygous variant (2/33, 6.1%) (Figure 7). These two variants correspond to a missense mutation in exon 14, c.1478C>G ; p.Thr493Arg, with an uncertain impact on the protein (Polyphen score of 0.372, predicted as benign while SIFT indicated the variant as pathogenic with a score of 0.01) and the other is a synonymous mutation, c.1461G>A ; p.Ala487=, affecting the last nucleotide of the exon 14 and predicted by Human Splicing Finder (HSF) to alter the donor splice site of the intron 14 (Table 2).



**Table 2 - All point mutations identified in our cohort of 69 globozoospermic patients and their predicted impact according to ACMG classification. All mutations are homozygous or hemizygous unless specified otherwise.**

Patient	Genomic mutation	Type of mutation	Localization	Protein modification	ACMG Classification(Richards et al. 2015)
16IF004	c.1461G>A	Synonymous (heterozygous)	Exon 14	p.Ala487=	Likely pathogenic
15IF010	c.1478C>G	Missense (heterozygous)	Exon 14	p.Thr493Arg	Uncertain significance
17IF120	c.153_189del	Frameshift	Exon 1	p.Trp52SerfsTer7	Pathogenic
16IF026	c.575A>G	Missense	Exon 4	p.His192Arg	Likely pathogenic
14IF073	c.586G>C	Missense	Exon 4	p.Glu196Gln	Likely pathogenic
19U0060 15IF090	c.869G>A *	Missense	Exon 8	p.Arg290His	Likely pathogenic
12IF037 14IF051 17IF104	c.892C>T **	Missense	Exon 8	p.Arg298Cys	Likely pathogenic
19U0058	c.893G>A	Missense	Exon 8	p.Arg298His	Likely pathogenic
15IF087	c.925C>A	Missense	Exon 8	p.Gln309Lys	Likely pathogenic
14IF02	c.1183delT***	Frameshift	Exon 11	p.Ser395LeufsTer9	Pathogenic
13IF035	c.1438G>A	Missense	Exon 14	p.Glu480Lys	Uncertain significance
17IF108	c.1580+1G>A	Splice-site mutation	Intron 16	p.512_527delfsTer5	Pathogenic
14IF069	c.1840G>T	Nonsense	Exon 19	p.Glu614Ter	Pathogenic

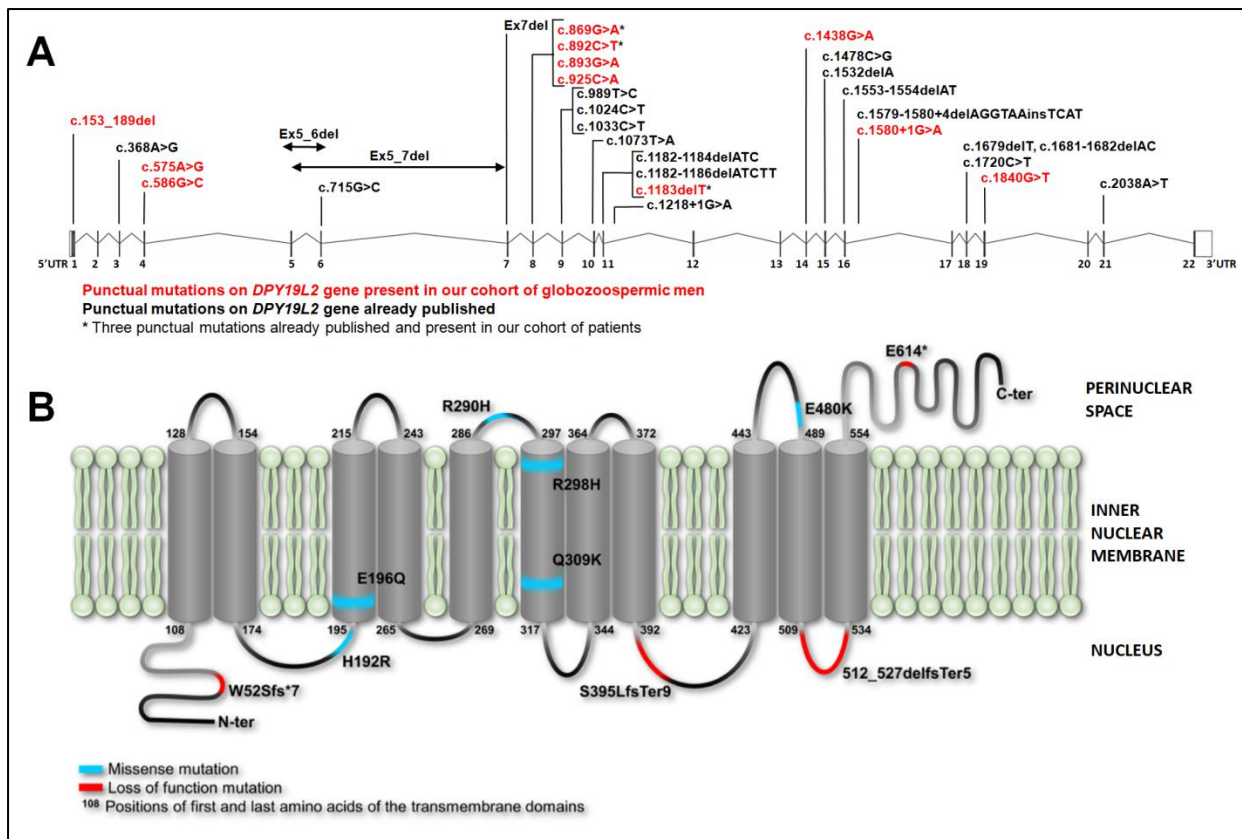
\* Coutton et al., 2012 ; Elinati et al., 2012 ; Zhu et al., 2013(Coutton et al. 2012b; Elinati et al. 2012; Zhu et al. 2013)

\*\* Elinati et al., 2012 ; Ghédir et al., 2016(Elinati et al. 2012; Ghédir et al. 2016)

\*\*\*Elinati et al., 2012(Elinati et al. 2012)

Overall 14 patients out of 44 without a homozygous deletion (32%) were considered to have a positive *DPY19L2* diagnosis including 8 compound heterozygous with a heterozygous deletion and a point mutation and 6 with a homozygous variant. In total 11 different causal variants were identified. There were 4 loss of function variants and 7 missense mutations (Figure 7 and 8). Patient 14IF02 presents a c.1183delT ; p.Ser395LeufsTer9 variant associated with a heterozygous deletion of the other allele (Table 2). This variant has already been reported in 2012 (Elinati et al. 2012), it produces a 403 amino acid truncated protein and removes the last three transmembrane domains and the C-terminal end (Figure 8). The variant c.153\_189del ; p.Trp52SerfsTer7 is a homozygous frameshift mutation presents in patient 17IF120 (Table 2) which introduces a premature stop codon and leads to a truncated protein of 58 amino acids instead of 758. The mutation of patient 15IF090, c.1840G>T; p.Glu614Ter is associated with a heterozygous deletion of the entire gene (Table 2). It is also a truncating mutation which produces a protein of 613 amino acids by replacing the glutamine by a stop codon, eliminating the C-terminal domain of the protein (Figure 8). We detected one splice site variant, c.1580+1G>A; p.512\_527delfsTer5, on the only allele of patient 17IF108, abrogating the donor site at the beginning of the intron 16 (Table 2). The alternative splicing is predicted to cause skipping of exon 16 inducing a stop codon in position 517 (Figure 8).

Concerning the missense variants, 2 were already reported in the literature and five are novel (Table 2 and Figure 8). The variant c.869G>A ; p.Arg290His is the most frequently reported point mutation of *DPY19L2* (Coutton et al. 2012b; Elinati et al. 2012; Zhu et al. 2013) and was found in two patients from our cohort in association with a heterozygous deletion of the other allele (Table 2). This variant affects an extramembrane domain likely located in the perinuclear space (Figure 8). The c.892C>T ; p.Arg298Cys variant is present with a homozygous status in three patients from our cohort (Table 2). It was also already described previously (Elinati et al. 2012) as a deleterious mutation affecting a conserved amino-acid in *DPY19L2* sixth transmembrane domain (Figure 8). Indeed, the change of an arginine at position 298 into a cytosine is extremely rare (GnomAD:  $3.99 \times 10^{-6}$ ) and this alteration is predicted to be deleterious by SIFT (score: 0) and Polyphen (score: 1). Interestingly, another patient (19U0058) presents a different coding variant affecting the same arginine in position 298: c.893G>A ; p.Arg298His (Table 2). Three other missense variants (c.586G>C ; p.His192Arg , c.575A>G ; p.Glu196Gln and c.925C>A ; p.Gln309Lys) are each present in one patient of our cohort, all of them in association with a heterozygous deletion of *DPY19L2* gene (Table 2). A last homozygous missense variant was detected in patient 13IF035: c.1438G>A ; p.Glu480Lys (Table 2). These four missense variants are all absent of the general population according to GnomAD and have a deleterious impact on *DPY19L2* protein according to SIFT (score <0.005) and Polyphen (score > 0.94).



**Figure 8 – Location of the point mutations found on the *DPY19L2* gene and their consequence on the *DPY19L2* protein.** (A) Location of the 30 deleterious variants present on *DPY19L2* including 6 splice variants, 11 loss of function variants, a deletion of three nucleotides and 12 missense variants. Exons are indicated as a black box, untranslated region as a clear box, introns as a line, the localization of the identified point mutations is shown by a line and the span of the identified genomic deletions is indicated by a black line with two arrows at the end. The numbers under the boxes indicate the exon number. Point mutations identified in our present work among 69 globozoospermic patients are represented in red and bold. Point mutations in 319 already published patients are represented in black and bold. An asterisk marks the three variants present in our cohort and already present in the literature. Adapted from Zhu et al. (2013)(Zhu et al. 2013). (B) Representation of the *DPY19L2* protein and its eleven transmembrane domains with first and last transmembrane domains amino-acid (black numbers), our missense mutations (blue segment) and truncating mutations (red segment). Exon 8 contains 4 different missense mutations, impacting 56.5% of all published patients with a causal missense mutation on the third extramembrane domain in the perinuclear space and the sixth transmembrane domain.

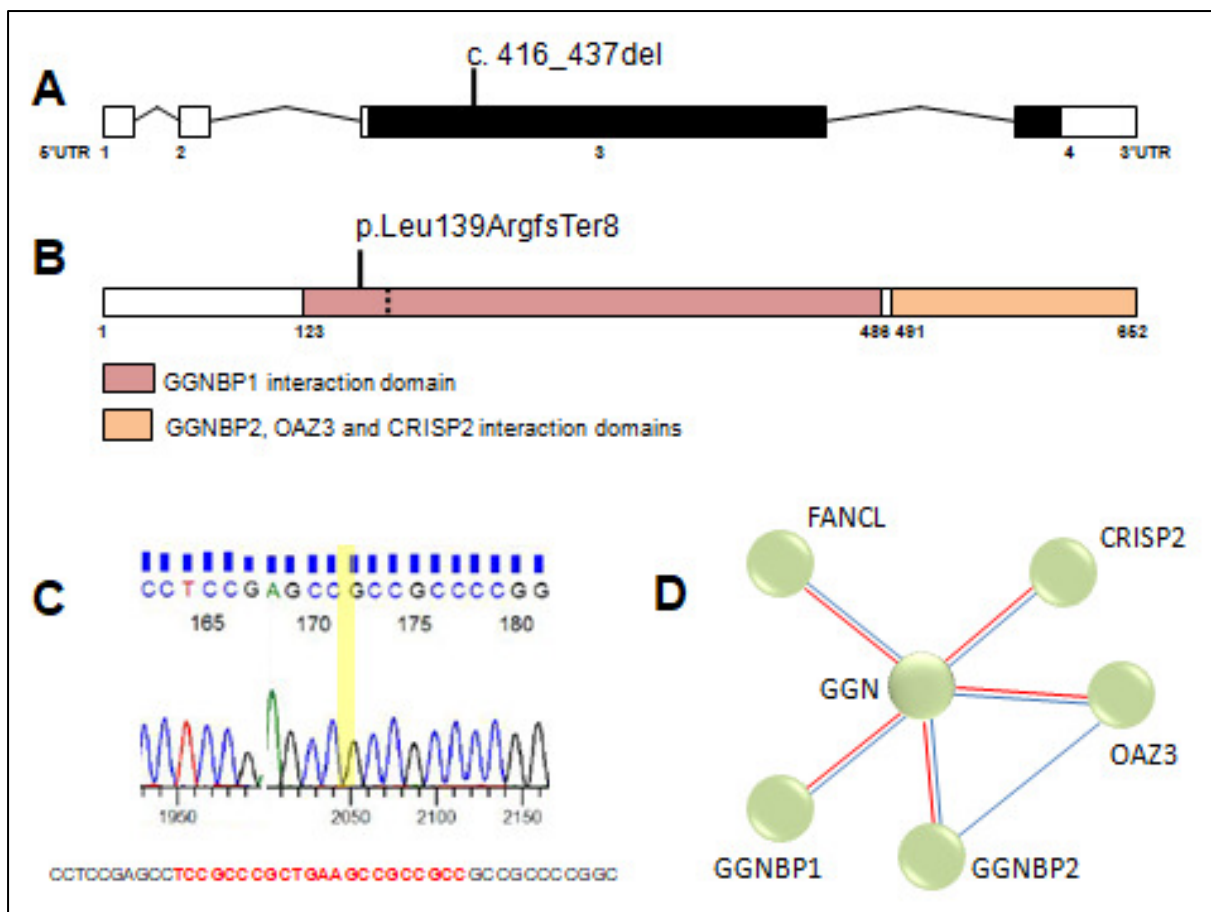
Overall, a causal alteration of the *DPY19L2* gene was found in 39 patients (39/69, 56.5%) including 25 patients with a homozygous deletion of the full gene (25/69, 36.2%), 6 carrying a homozygous deleterious point mutation (6/69, 8.7%) and 8 carrying a heterozygous deletion and a hemizygous deleterious variant (8/69, 11.6%). No *DPY19L2* defects were identified in 25 subjects (25/69, 36%) and five patients harbored a single pathogenic alteration (5/69, 7.2%) including a heterozygous *DPY19L2* deletion for 3 patients (3/69, 4.35%) and a heterozygous point mutation for the other two (2/69, 2.9%). As the transmission of *DPY19L2* related globozoospermia is strictly recessive these events were not considered to be responsible for the patients' phenotype and a total of 30 patients were considered to have a negative diagnosis (30/69, 43.5%) (Figure 7).

Among the 10 patients reporting inbreeding in their family only 30% (3/10) had a homozygous deletion, 20% (2/10) had a homozygous missense mutation and 50% (5/10) had no *DPY19L2* abnormalities.

### **Whole exome sequencing analysis of other genes involved in globozoospermia in Human**

Among the 30 patients without causal anomaly detected in *DPY19L2*, 23 had a whole exome sequencing performed (Figure 7) and the 7 others had only a Sanger sequencing of the *DPY19L2* exons. Whole exome sequencing allowed us to search for anomalies in all the known candidate genes in globozoospermic patients (*C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZPBP1*) (Dam et al. 2007; Liu et al. 2010; Yatsenko et al. 2012; Ellnati et al. 2016; Oud et al. 2020). We only considered the variants affecting one of the 9 candidate genes with a protein

impact predicted to be deleterious. Only one homozygous frameshift variant was detected in one patient affected by a partial globozoospermia with 82% of round headed spermatozoa. This alteration is a deletion of 22 nucleotides in *GGN* exon 3, c.416\_437del, introducing a stop codon in position 147 of the Gametogenetin protein, p.Leu139ArgfsTer8 (Figure 9). It induces the production of a truncated protein of 146 amino acids losing the interaction domain with GGNBP2 and OAZ3 in positions 491 to 652 and truncating the GGNBP1 interaction domain located in positions 123 to 486 (Figure 9).



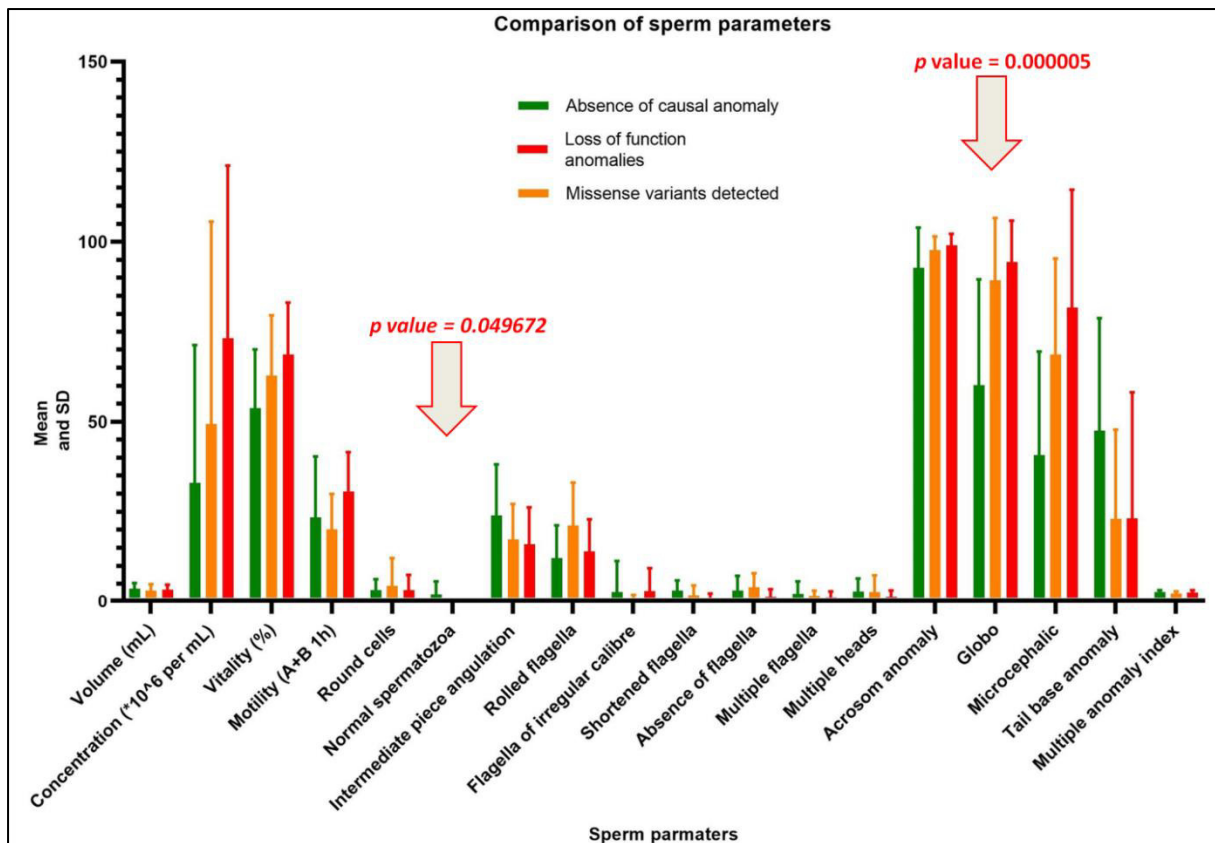
**Figure 9 – Representations of the loss of function variant found in GGN and Sanger validation.** A) GGN has 4 exons indicated as boxes including 2 coding exons (exons 3 and 4) indicated as black colored boxes, introns are represented with a line, the localization of the identified point mutations is shown by a line. Numbers under the boxes depict the exons and UTR domains of the gene. B) Representation of GGN protein; the anomaly is represented by a black line on amino acid 139 and the induced stop codon represented by a dotted line in position 147. Three interaction domains are localized on the protein. The GGNBP1 interaction domain from amino acid 123 to 486 and the GGNBP2 and OAZ3 interaction domain between positions 491 and 652. The CRSIP2 interaction domain overlaps the GGNBP2 and OAZ3 interaction domain and extends on the 158 C-terminal amino acids. All these domains are impacted by the loss of function mutation of GGN. C) Electropherograms of Sanger sequencing showing the deletion of 22 nucleotids in patient. The deleted nucleotids are represented in red and bold on the sequence below. D) String representation of GGN proteic interactions with FANCL, CRISP2, GGNBP1, GGNBP2 and OAZ3. Proteins are represented by green circles linked by strings according to the existing evidence of functional link: an experimental or biochemical data (red string), the co-mention in a Pubmed abstract (blue string).

### **Comparison of sperm parameters**

Sperm parameters were compared between three groups of patients according to their *DPY19L2* genotype. The first group is composed of 28 patients who carry bi-allelic loss of function variants (25 patients with a homozygous deletion of *DPY19L2* and 4 patients with homo- or hemizygous truncating mutations) for whom no functional *DPY19L2* protein is expected (Figure 7). The second group is composed of 10 patients carrying a deleterious homo- or hemizygous missense variant of *DPY19L2* with an unpredictable effect on the protein expression or function (Figure 7). The third group contains the 30 patients without bi-allelic alteration of *DPY19L2*, including patients with a unique heterozygous variant (Figure 7).

Mean and standard deviation of all the sperm parameters for each group are presented in the Table 1 and in Figure 10. Several sperm parameters are statistically different between the first group of patients (without functional protein) and the third group of patients (without genetic alterations) (Figure 10). The first group presents a higher proportion of round headed spermatozoa with an adjusted  $p$  value = 0.000005 and more microcephalic spermatozoa with an adjusted  $p$  value = 0.000061. Vitality and concentration of sperm are also increased in the first group with a respective adjusted  $p$  values of 0.006799 and 0.010454. The third group shows an increased frequency of shortened flagella (adjusted  $p$  value = 0.004551). The normal spermatozoa proportion is enhanced in the third group (adjusted  $p$  value = 0.049672). There was no significant difference between these two groups concerning the other sperm parameters (Figure 10). No statistically significant differences were identified between the second group of patients carrying a missense mutation and the two other groups (Figure 10).





**Figure 10 – Bar chart representing mean and standard deviation (SD) for each sperm parameters between the three groups of patients according to their DPY19L2 genotype. No statistically significant differences exist between the group of patients carrying a missense mutation and the two other groups. The rate of normal spermatozoa is significantly enhanced, and the rate of globozoospermia significantly decreased, in patients without causal anomaly detected in DPY19L2 in comparison with patients with a loss of function variant, respective p values of 0.049672 and 0.000005 (grey arrows).**

## Diagnostic performances

Table 3 presents the genetic results of *DPY19L2* screening according to the rate of round headed spermatozoa in our patients. We divided our cohort in three groups of patients: less than 50% of round headed spermatozoa, 50 to 89% and more than 90%. In these three groups we determined the proportion of each genetic profile (presence of a loss of function anomaly, presence of a causal missense mutation and the absence of *DPY19L2* causal anomaly) to determine the diagnostic performance in each group. Interestingly, we observed no positive diagnosis in the first group of patients with less than 50% of globozoospermia whereas a positive diagnosis was obtained for nearly 74% of patients carrying a minimum of 50% of round headed spermatozoa (Table 3). Logically, if we compare the patients with what could be described as total globozoospermia (>90% of globozoospermia) with those with partial globozoospermia (50-89% of globozoospermia) we observe in the first group a higher diagnosis rate (80% vs 54%) and a higher percentage of loss of function variants (63% vs 31%).

**Table 3 – Diagnostic performance according to the rate of round headed spermatozoa**

<u>Round-headed sperm</u>			<u>Loss of function anomalies</u>		<u>Missense variants</u>		<u>Absence of causal anomaly</u>		<u>Positive diagnosis (all biallelic variants)</u>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<50	16	23,19	0	0,00	0	0,00	16	100,00	0	0,00
50-89	13	18,84	4	30,77	3	23,08	6	46,15	7	53,85
90-100	40	57,97	25	62,50	7	17,50	8	20,00	32	80,00
>50	53	76,81	29	54,72	10	18,87	14	26,42	39	73,58
All	69	100	29	42,03	10	14,49	30	43,48	39	56,52

## **DISCUSSION**

This study outlines the genetic diagnosis investigations performed in the largest cohort of globozoospermic patients published so far. We analyzed the *DPY19L2* gene in 69 patients from Europe, Africa and the Middle East, with a variable percentage of round headed spermatozoa ranging from 20 to 100%. We detected a *DPY19L2* homozygous deletion of the entire gene in 36.2% of our patients and causal point mutations in 20.3% (Figure 7). We found 3 causal mutations already published in 6 patients: p.Arg290His, p.Arg298Cys and p.Ser395LeufsTer9 (Table 2) and discovered 8 novel point mutations each present in one patient including 5 missense (p.His192Arg, p.Glu196Gln, p.Arg298His (c.893G>A), p.Gln309Lys and p.Glu480Lys) and 3 loss of function mutations (p.Trp52SerfsTer7, p.512\_527delfsTer5 and p.Glu614Ter) (Table 2). Comparing the phenotype of different groups of patients according to their genotype allowed us to observe a genotype-phenotype correlation and led us to new recommendations in terms of diagnosis process.

Our statistical results allowed us to correlate the identification of *DPY19L2* loss of function anomalies with a higher rate of globozoospermic spermatozoa and logically with a lower proportion of normal spermatozoa in comparison with patients without causal bi-allelic alteration of *DPY19L2*. In accordance with these correlations we obtained a higher diagnostic performance, reaching 80%, in patients with at least 90% of round headed spermatozoa (Table 3) who could be considered as total globozoospermic patients. We observed that we found *DPY19L2* bi-allelic causal anomalies exclusively in patients with more than 50% of globozoospermia with a diagnostic performance of 73.6% whereas our diagnostic performance was null in patients with less than 50% of globozoospermic spermatozoa (Table 3). This results led us to recommend to initiate a targeted search for *DPY19L2* defects only in patients

with a minimum of 50% of globozoospermic spermatozoa. Interestingly loss of function variants (in particular the complete *DPY19L2* deletion) were twice as frequent in subjects with total globozoospermia (>90%) compared with those with partial globozoospermia (50-89%).

Surprisingly we observed a decrease in shortened flagella and an increased in microcephaly, vitality and sperm concentration in the group with loss of function variants. The difference in the rate of microcephalic sperm is probably explained by discrepancies in the semantic of different biologists: some characterizing round-headed sperm as globozocephalic, others as microcephalic. We therefore do not feel that the observed difference is relevant. The other differences observed could be explained by the low specificity of the recruitment, some centers prescribing the genetic analysis of *DPY19L2* for patients with low percentage of globozoospermic spermatozoa. In addition, the size of our cohort and the wide geographical origins of our patients could also contribute to the observed phenotypic heterogeneity, in opposition to studies focusing on specific populations (Harbuz et al. 2011; Zhu et al. 2013; Chianese et al. 2015). Furthermore, the fact that the sperm analyses were realized in many different centers is on one hand a guarantee of the representativeness of the general population and on the other hand a weakness as it induces a great variability in the characterization of the sperm samples. Another explanation is a biased interpretation of biologists when a high rate of globozoospermic spermatozoa is observed in a semen sample, we can assume that they could then pay less attention to other anomalies such as head or flagella anomalies. Finally, two phenotypes are close to globozoospermia : acrosomal hypoplasia which can coexist with globozoospermia in the same semen sample (Chemes 2018) and pseudo-globozoospermia (Anton-Lamprecht et al. 1976; Singh 1992; Coutton et al. 2015). It

could be relevant to verify that those phenotypes are not mistaken for real globozoospermia and that criteria used to characterize round-headed spermatozoa by the different centers are the same in order to avoid any recruitment bias.

In this large study we found 36.2% of *DPY19L2* homozygous deletions in 69 globozoospermic patients. This value seems low, compared to what has been described in the past with an average rate of 52.3% of *DPY19L2* homozygous deletion (Ray et al. 2017). Nevertheless the proportion of homozygous deletion is still concordant with the literature varying from 19% (Koscinski et al. 2011) to 75% (Harbuz et al. 2011) and very close to a recent study with 35% of *DPY19L2* homozygous deletions among a large cohort of 63 patients (Alimohammadi et al. 2020). In fact several globozoospermia studies recruited only total globozoospermic patients (Zhu et al. 2013; Shang et al. 2019; Ghédir et al. 2019) and observed a much higher rate of *DPY19L2* positive diagnosis. This is consistent with the correlation that we observed here between the high rate of globozocephalic spermatozoa and the presence of loss of function *DPY19L2* variants or deletions.

Concerning the causal point mutations found in our cohort we observed a mutational hotspot in exon 8 (Figure 8). In fact, this latter concentrates 4 out of the eleven variants identified in this study concerning half of the mutation carriers and 7 out of 10 missense mutations carriers (Table 2). If we add our patients to the literature, the proportion of exon 8 missense mutation carriers represent approximately 56.5% of all published patients with a causal missense mutation (Coutton et al. 2012b; Elinati et al. 2012; Zhu et al. 2013; Modarres et al. 2016; Ghédir et al. 2016; Shang et al. 2019; Oud et al. 2020). In addition, 4 of our patients harbor a missense mutation impacting the conserved arginine in position 298 (Table 2) described to be essential for the C-

mannosyltransferase activity of DPY-19, the DPY19L2 ortholog in *Caenorhabditis elegans* (Buettner et al. 2013). This supports the idea that the central domain of DPY19L2 protein has a critical function (Ray et al. 2017) and we could go further assuming that this critical function concern in particular the third loop of the internuclear space and the sixth transmembrane domain coded by the exon 8 (Figure 8). We also identified a truncating mutation toward the end of the cDNA (p.Glu614Ter) indicating that the C-terminal domain of the protein also plays a critical role in protein function, perhaps permitting to anchor the acrosome to the acroplaxome.

There was no significant difference in the *DPY19L2* abnormalities found in the whole cohort and in patients declaring a familial consanguinity. Indeed, the percentages of loss of function and missense anomalies of 30% and 20% respectively are very close to those of the whole cohort corresponding to 36.2% and 20.3%. As could be expected, only homozygous abnormalities were found in patients with related parents. These results are to be put in perspective as all patients probably did not declare their consanguinity. The anomalies identified in our cohort and the genotype-phenotype relationship confirms the predominance of *DPY19L2* defects in globozoospermia. However five patients carried a single heterozygous event (3 with a whole deletion and 2 with a heterozygous variant). As heterozygous fathers are fully fertile, *DPY19L2* globozoospermia is considered to have a strict recessive inheritance. The presence of a single variant thus cannot explain the five patient's phenotype, even if their impact on the protein is predicted to be deleterious. We did not find any other point mutation in these patients, nevertheless the sequencing technique used cannot detect the presence of deep intronic mutations or partial deletions of one or more *DPY19L2* exons.

Among the 30 patients without causal *DPY19L2* anomalies, 23 had a whole exome sequencing performed after MLPA (Figure 7). In these patients, after the analysis of the 9 genes described to be associated with human globozoospermia (*C2CD6*, *C7orf61*, *CCDC62*, *CCIN*, *DNAH17*, *GGN*, *PICK1*, *SPATA16* and *ZPBP1*) (Dam et al. 2007; Liu et al. 2010; Yatsenko et al. 2012; Ellnati et al. 2016; Oud et al. 2020) we only found one homozygous deleterious variant in *GGN* in one patient with partial (82%) globozoospermia. Only one globozoospermic patient with a *GGN* defect has been described before and carried a homozygous truncating mutation in the same exon than the subject described here (Oud et al. 2020). *GGN* is located on chromosome 19 in 19q13.2 and encodes for the Gametogenetin, a protein of 652 amino acids almost exclusively expressed in the testis. This protein has been detected in late pachytene spermatocytes and round spermatids before being incorporated into the principal piece of the sperm tail (Jamsai et al. 2008). *GGN* interacts with several other proteins such as *FANCL* (Lu and Bishop 2003), *GGNBP1*, *GGNBP2*, *OAZ3* (Zhang et al. 2005; Zhou et al. 2005) and *CRISP2* (Jamsai et al. 2008). All these genes have been related to sperm development, however only *GGNBP1* has been described to be associated with round headed spermatozoa and the lack of acrosome (Han et al. 2020). In fact *GGN* has been described to be related to *FANCL* which is implicated in double strand breaks repairs and the survival of pre-implantation embryos (Jamsai et al. 2013). *GGNBP2* was also described to be involved in cellular division (Guan et al. 2012). *OAZ3* is implicated in spermatogenesis but was described to be necessary for the formation of a rigid junction between head and tail (Tokuhiro et al. 2009). *CRISP2* is expressed in the acrosome of the spermatozoon, however the *GGN*-*CRISP2* interaction was described to take place in the sperm tail (Jamsai et al. 2008). Thus the link between *GGN* anomalies and globozoospermia does not seem to be connected to

the interactions it may have with these proteins. In contrast GGNBP1, is also predominantly expressed in the testis, has been related to acrosome development and sperm head shape(Han et al. 2020). Finally the GGN knock out male mice are not described to have globozoospermia but present an embryonic lethality at the beginning of the pre-implantation development and Ggn +/- mice present defects in double strand break repairs(Jamsai et al. 2013). Therefore although our results provide some strong evidence to link GGN with globozoospermia, further investigations should be performed to understand GGN function and clarify its implication in globozoospermia. It's interaction with GGNBP1 seems to be the best lead to follow.

No deleterious variants were identified in the other candidate genes explored but the phenotype-genotype relationship is not clearly proved for the last published genes *C2CD6*, *CCIN*, *C7orf61* and *DHNA17*. In fact all these genes may have a putative location or function in acrosome but these assumptions are not clearly supported by their mutant models when available. Moreover, the published missense mutations were not validated with functional work and should be interpreted with caution. For example, missense and truncating mutations in *DNAH17* were formally associated with another severe flagellum malformations known as the MMAF phenotype in human and mouse in three recent and independent publications (Touré et al. 2020). The association of *DNAH17* with globozoospermia should therefore be strongly questioned. Exome sequencing data from the remaining 22 patients without any identified variant will now be fully explored in order to identify deleterious variants in new undescribed candidate genes.



Analysis of exome data permitted to identify *DPY19L2* deleterious variants in five patients, demonstrating that the technique is efficient to detect small gene defects in *DPY19L2* despite the presence of a highly homologous pseudogene *DPY19L2P1* (Harbuz et al. 2011). This observation brought us to balance the benefit of MLPA against a classic qualitative PCR. In fact the only advantage of MLPA in our procedure was to detect the presence of heterozygous deletion of the entire *DPY19L2* gene but we demonstrated that this information has no interest when it comes alone and further sequencing has to be performed. Here we observed that MLPA only allowed the identification of a causal anomaly in 36.2% of patients, and those with a homozygous deletion, could be detected simply by standard PCR of several exons of the gene. We then recommend to use exome sequencing to complete the analysis of patients without a homozygous deletion. The addition of a CNV module for the detection of copy number variations (CNV) will permit to detect the whole *DPY19L2* heterozygous deletions previously detected by MLPA as well as yet undetected CNVs removing one or several exons. Naturally, as demonstrated here, WES also permits to detect *DPY19L2* point mutations and to explore other genes already involved in globozoospermia, as demonstrated here by the identification of a homozygous *GGN* mutation. It could also permit to identify new genes in patients without variants in known candidate genes. In financial terms, this strategy is also relevant as we expect an improved diagnostic performance, for a lower price. In fact, concerning the first diagnosis step of *DPY19L2* homozygous deletion, the cost of an MLPA is around 120 Euros for the laboratory, including reagents and technical time (with an estimated charged cost of 25 euros per hour for an experienced technician), when a simple PCR of the same three exons is invoiced 30 euros for an equivalent diagnostic efficiency. In the second diagnosis phase using Sanger sequencing would cost at least 70 euros per

exon which accounts for approximately 1500 euros to sequence the 22 exons of *DPY19L2*, whereas a whole exome sequencing cost between 500 and 800 euros under current market conditions. Thus our previous strategy using MLPA and Sanger sequencing had an average cost around 1660 euros when the novel strategy combining a classical qualitative PCR and whole exome sequencing would cost approximately 830 euros, half the cost of the initial strategy.

In conclusion the work presented here permitted to propose a strategy for the routine genetic investigation of globozoospermic patients: subjects with less than 50% of round-headed sperm should not be considered globozoospermic and *DPY19L2* should not be investigated. For the other patients, a classical qualitative PCR should be used to detect homozygous deletions of *DPY19L2*, and in the absence of the homozygous deletion of the gene, instead of the usual Sanger sequencing of *DPY19L2*, we recommend sequencing the entire exome, which allows a cost-effective detection of genetic defects in the *DPY19L2* gene but also in the other candidate genes described. The interest of this strategy was demonstrated by allowing the detection a mutation in *GGN*, thus confirming its likely association with globozoospermia.

### **Authors' contributions**

TC, Ca.Ca., FM, ZEK, CA and P.F.R. carried out and interpreted all the molecular work. TC and P.F.R. performed all data analysis. TC and GM designed figures. TC and PR supervised all the patient's information and SFMB, MK, RZ, AZ, AC, AP, AB, AC, BF, CG, CT, CS, DL, GT, GS, HL, JP, JB, LP, LM, MP, MC, NS, RC, SB, SV, CF, SH, VM, VS, VA contributed to the acquisition of data. TC, Ch.Co and P.F.R. wrote the main draft of the manuscript. P.F.R. designed the overall study, supervised all molecular laboratory work, had full access to all of the data and takes responsibility for the integrity of the data and its accuracy.

### **Conflict of interest**

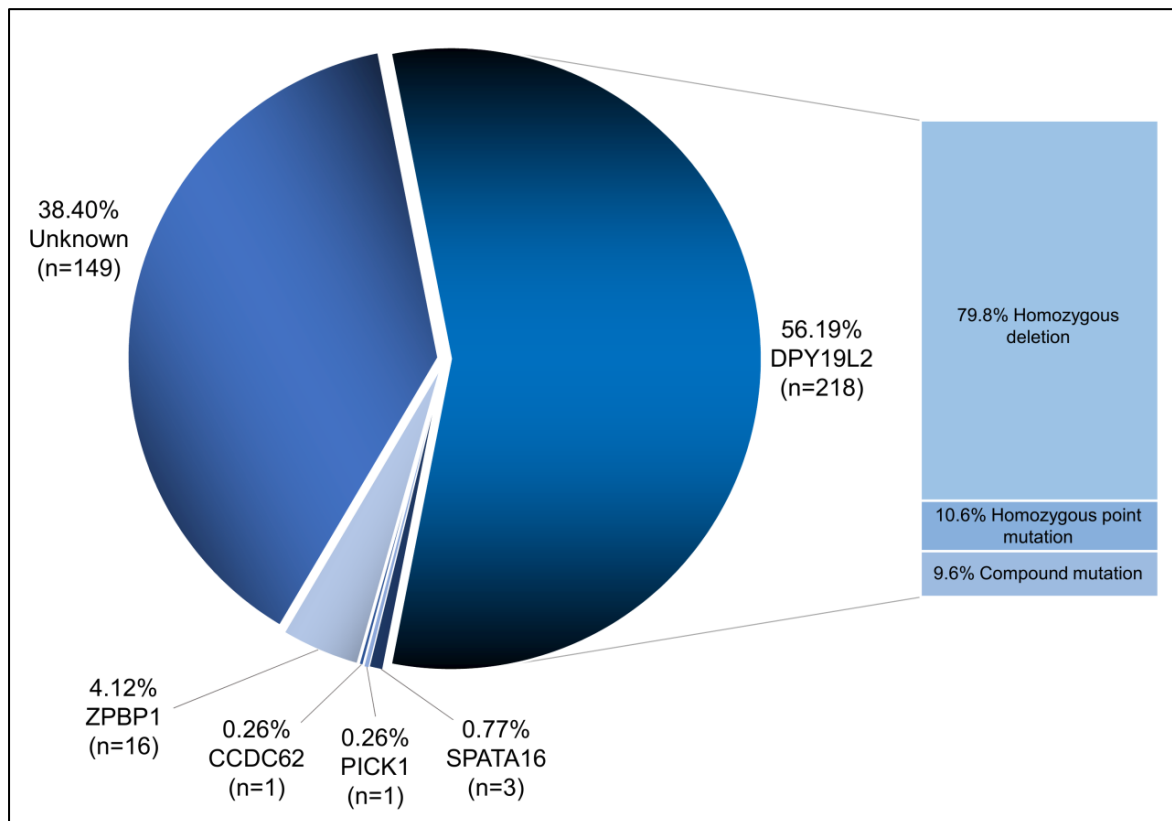
The authors declare no conflict of interest

## **PARTIE 4 – INTEGRATION DES CONCLUSIONS DE L'ARTICLE A LA BIBLIOGRAPHIE ET PERSPECTIVES D'ETUDE**

---

A ce jour, en incluant l'article présenté dans la partie précédente et qui a été accepté dans la revue *Human Genetics*, la globozoospermie est donc décrite chez 388 patients dans la littérature. Les mutations dans *SPATA16* ont été retrouvées chez 0,77% des cas (Figure 11) en Europe et en Afrique du Nord, ce qui suggère que les mutations *SPATA16* sont une cause récurrente mais rare de globozoospermie chez l'homme. Concernant *PICK1*, jusqu'à présent, la mutation faux-sens homozygote (c.198G>A) découverte dans l'exon 13 n'a été retrouvée que dans un cas sporadique et isolé de patient globozoospermique représentant 0,26% de l'ensemble des cas de globozoospermie (Figure 11). Des anomalies du gène *ZBP1* ont été retrouvées chez 4,12% des patients (Figure 11) incluant 15 patients décrits par Yatsenko et al. dont le phénotype n'était pas clairement établi comme globozoocéphale mais comme une morphologie anormale de la tête du spermatozoïde. Ce chiffre est donc à relativiser vis-à-vis de l'implication de *ZBP1* dans la globozoospermie. Deux mutations de *CCDC62* ont été identifiées chez un même patient, constituant seulement 0,26% des patients globozoocéphales (Figure 11). Enfin *DPY19L2* a été mis en cause chez 218 patients globozoospermiques entre 2011 et 2020, soit 56,19% des patients publiés à ce jour (Figure 11). Au total, en plus de la délétion homozygote du gène entier représentant près de 80% des anomalies de *DPY19L2*, 31 variants délétères ont été décrits, dont 7 variants d'épissage, 11 variants perte de fonction, une délétion de trois nucléotides et 12 variants faux-sens (Figure 8A). En revanche il est important de noter

que 38,4% des globozoospermies décrites dans la littérature restent idiopathiques (Figure 11).



**Figure 11 - Fréquence des mutations dans DPY19L2, PICK1, SPATA16, ZPBP1 et CCDC62 chez 388 patients globozoospermiques décrits dans la littérature. La distribution des mutations DPY19L2 est également signalée (à droite).**

Dans les perspectives de ce travail, trois sujets restent à explorer. D'une part il sera important de poursuivre l'investigation des résultats de l'exome afin d'identifier de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans la globozoospermie. Leur présence chez des patients devra être appuyée par l'étude de modèles fonctionnels afin de pouvoir asseoir leur pathogénicité. L'intérêt de ce type d'étude est de permettre à la fois une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans

la pathologie et une amélioration des performances diagnostiques chez les patients. A cela s'ajoute l'analyse des CNV grâce à l'exome, qui permettra non seulement de détecter les délétions hétérozygotes de *DPY19L2* mais également les délétions d'un ou plusieurs exons dans *DPY19L2* qui pourraient s'associer à certaines mutations ponctuelles chez des patients hétérozygotes composites. D'autre part, toujours concernant les anomalies génétiques de la globozoospermie, il sera nécessaire de poursuivre les investigations concernant la Gamétogénétine (*GGN*) et son lien avec *GGNBP1* pour mieux comprendre leur rôle dans la globozoospermie. Enfin, concernant le management clinique des patients, j'ai présenté ici une proposition d'innovation dans la réalisation des analyses génétiques chez ces derniers. Il est aussi important de se poser la question de la prise en charge en PMA pour ces patients. Ces patients sont actuellement parfois pris en charge en ICSI avec des taux très élevés d'échecs de fécondation causés par l'absence de la protéine PLCzeta, nécessaire à l'activation ovocytaire, qui est secondaire à la perte de l'acrosome. Pour pallier à ces échecs de fécondation, l'utilisation de ionophores calciques, interdite en France à ce jour, a été décrite comme une solution efficace quel que soit le génotype du patient. Il est donc envisagé dans la suite de ce travail d'étudier les résultats des ICSI réalisées chez certains patients de la cohorte que je viens de vous présenter. De nombreux patients de la cohorte ont pu avoir accès à une prise en charge en ICSI et il serait pertinent de d'évaluer avec précision les chances de réussite des patients présentant différents génotypes : 1) Patients sans protéine *DPY19L2*, 2) patients avec des mutations faux-sens permettant la synthèse d'une protéine avec une fonctionnalité altérée et 3) les patients sans mutations *DPY19L2*, 4) les patients avec des variants dans d'autres gènes candidats, en particulier notre patient homozygote pour un variant

non-sens *GGN*. Ce travail permettrait de progresser sur les recommandations de prise en charge des patients globozoospermiques en PMA.

Ce travail de thèse constitue donc à la fois un travail diagnostique pour des patients atteints de globozoospermie et un travail de recherche pouvant conduire à une meilleure connaissance de la pathologie et à une amélioration de sa prise en charge. Les perspectives, sur lesquelles je compte travailler, me permettent d'espérer la découverte de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie et une corrélation génotype-phénotype encore renforcée par l'analyse des résultats d'ICSI. De plus cela permettra potentiellement de mieux comprendre les mécanismes qui font défaut dans les spermatozoïdes globozoocéphales au cours de la fécondation.

# **CONCLUSION**

---

**THÈSE SOUTENUE PAR :** Tristan CELSE

**TITRE :**

INVESTIGATIONS GENETIQUES D'UNE LARGE COHORTE DE PATIENTS INFERTILES AVEC GLOBOZOOSPERMIE, IMPLICATION DU GENE *DPY19L2* ET PROPOSITION D'UNE NOUVELLE STRATEGIE DE DIAGNOSTIC GENETIQUE

**CONCLUSION :**

J'ai étudié dans le cadre de mon travail de thèse la plus grande cohorte de patients globozoospermiques décrite à ce jour. Dans un premier temps, les analyses réalisées ont porté sur les anomalies de *DPY19L2*, ce qui m'a permis de mettre en évidence un taux de délétions homozygotes de la totalité du gène *DPY19L2* de 36,2%. Ce taux, plus bas que ceux rapportés précédemment dans la littérature scientifique, traduit probablement le fait que les patients ne présentaient pas tous un phénotype pur, mais que le taux de spermatozoïdes globocéphales présents dans l'éjaculat des patients analysés variait de 20 à 100%. De plus, j'ai détecté 11 mutations ponctuelles de *DPY19L2*, dont 8 nouvelles mutations ponctuelles qui s'ajoutent au spectre mutationnel de *DPY19L2* décrit dans la littérature scientifique. J'ai également réussi à établir une relation génotype-phénotype grâce à la détection plus fréquente d'anomalies perte de fonction chez les patients présentant un taux plus élevé de globozoospermie.

De manière intéressante, aucune anomalie génétique de *DPY19L2* n'a été détectée chez les patients ayant moins de 50% de spermatozoïdes globocéphales, ce qui a permis de fixer une limite inférieure au taux de globozoospermie nécessaire à l'exploration de *DPY19L2* chez des patients globozoospermiques. Enfin, la réalisation d'un séquençage de l'exome entier chez 23 de nos patients sans anomalie causale de *DPY19L2* nous a permis de détecter une délétion de 22 nucléotides dans le premier



exon codant du gène de la gametogenetin (*GGN*) qui a récemment été proposé comme un gène candidat dans la globozoospermie humaine. Ce résultat confirme donc l'association du gène *GGN* à la globozoospermie.

Ces résultats m'ont permis de proposer une nouvelle stratégie pour l'investigation génétique en routine chez les patients globozoospermiques : la limite inférieure de 50% de la globozoospermie doit être considérée pour explorer les anomalies spécifiques de *DPY19L2*, une PCR qualitative classique doit être utilisée pour détecter les délétions homozygotes de *DPY19L2*, et en l'absence de la délétion homozygote du gène, au lieu du séquençage Sanger de *DPY19L2* réalisé habituellement, nous recommandons d'effectuer un séquençage de l'exome entier qui permet de détecter à moindre cout les défauts génétiques au niveau du gène *DPY19L2* mais également dans les autres gènes candidats décrits. L'absence d'anomalies causales chez 22 de nos patients nous amènera certainement à poursuivre les recherches dans les résultats du séquençage de l'exome entier pour détecter des anomalies au sein de nouveaux gènes candidats. En outre, une des perspectives à l'issu de ce travail, est d'explorer les résultats de la prise en charge des patients suite à une fécondation in vitro par injection intra cytoplasmique afin d'étudier le lien entre les types d'anomalies identifiées et les taux de fécondation obtenus.

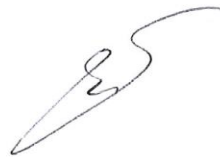
**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

Grenoble, le : 23/09/2020

**LE DOYEN**  
**Pr. Patrice MORAND**

  
Pour le Président  
et par délégation  
Le Doyen de Médecine  
Pr. Patrice MORAND

**LA PRÉSIDENTE DE LA THÈSE**  
**Pr. Sylviane HENNEBICK**



## ***BIBLIOGRAPHIE***

---

Abdelhedi F, Chalas C, Petit J-M, et al (2019) Altered three-dimensional organization of sperm genome in DPY19L2-deficient globozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 36:69–77. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1342-y>

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>

Alimohammadi F, Ebrahimi Nasab M, Rafeae A, et al (2020) Deletion of dpy-19 like 2 (DPY19L2) gene is associated with total but not partial globozoospermia. *Reprod Fertil Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD19025>

Alvarez Sedó C, Rawe VY, Chemes HE (2012) Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum Reprod* 27:1912–1921. <https://doi.org/10.1093/humrep/des126>

Anton-Lamprecht I, Kotzur B, Schopf E (1976) Round-headed human spermatozoa. *Fertil Steril* 27:685–693. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)41900-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)41900-x)

Auger J, Jouannet P, Eustache F (2016) Another look at human sperm morphology. *Hum Reprod* 31:10–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev251>

Azziz R (2018) Polycystic Ovary Syndrome: *Obstetrics & Gynecology* 132:321–336. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002698>

Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, et al (2005) Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod* 20:2790–2794. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei126>

Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, et al (2014) Mutations in DNAH1, which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Am J Hum Genet* 94:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.017>

Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R (2020) Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet*. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02122-w>

Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, et al (2009) Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 5:e1000393. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000393>

Buettner FFR, Ashikov A, Tiemann B, et al (2013) *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol Cell* 50:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.003>

Ceylan GG, Ceylan C, Elyas H (2009) Genetic anomalies in patients with severe oligozoospermia and azoospermia in eastern Turkey: a prospective study. *Genet Mol Res* 8:915–922. <https://doi.org/10.4238/vol8-3gmr616>

Chemes HE (2018) Phenotypic varieties of sperm pathology: Genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 194:41–56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.074>

Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

Chianese C, Fino MG, Riera Escamilla A, et al (2015) Comprehensive investigation in patients affected by sperm macrocephaly and globozoospermia. *Andrology* 3:203–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12016>

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics\*‡. *Human Reproduction Update* 16:231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>

Coutton C, Abada F, Karaouzene T, et al (2013) Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet* 9:e1003363. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003363>

Coutton C, Escoffier J, Martinez G, et al (2015) Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Human Reproduction Update* 21:455–485. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv020>

Coutton C, Vieville G, Satre V, et al (2012a) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) et sondes « à façon » entièrement synthétiques. Guide pratique, recommandations et expérience au CHU de Grenoble. *IRBM* 33:227–235. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2012.04.004>

Coutton C, Zouari R, Abada F, et al (2012b) MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Human Reproduction* 27:2549–2558. <https://doi.org/10.1093/humrep/des160>

Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, et al (2003) Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 49:343–349. <https://doi.org/10.1080/01485010390219656>

Dam AH, Ramos L, Dijkman HB, et al (2011) Morphology of partial globozoospermia. *J Androl* 32:199–206. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009530>

Dam AHDM, Feenstra I, Westphal JR, et al (2007a) Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 13:63–75. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml047>

Dam AHDM, Kosciński I, Kremer JAM, et al (2007b) Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 81:813–820. <https://doi.org/10.1086/521314>

Datta J, Palmer MJ, Tanton C, et al (2016) Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Hum Reprod* 31:2108–2118. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew123>

de Boer P, de Vries M, Ramos L (2014) A mutation study of sperm head shape and motility in the mouse: lessons for the clinic. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.300>

den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N)

Desmet F-O, Hamroun D, Lalonde M, et al (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>

Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, et al (2007) Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 39:661–665. <https://doi.org/10.1038/ng2027>

Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, et al (2009) The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Human Molecular Genetics* 18:1301–1309. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp029>

Dumont A, Barbotin A-L, Lefebvre-Khalil V, et al (2017) La necrozoospermie : du diagnostic étiologique à la prise en charge thérapeutique. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 45:238–248. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2017.01.010>

Ellnati E, Fossard C, Okutman O, et al (2016) A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 33:815–820. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0715-3>

Elinati E, Kuentz P, Redin C, et al (2012) Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet* 21:3695–3702. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds200>

Escoffier J, Lee HC, Yassine S, et al (2016) Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Hum Mol Genet* 25:878–891. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv617>

Escoffier J, Yassine S, Lee HC, et al (2015) Subcellular localization of phospholipase C $\zeta$  in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Mol Hum Reprod* 21:157–168. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau098>

Falender AE, Freiman RN, Geles KG, et al (2005) Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev* 19:794–803. <https://doi.org/10.1101/gad.1290105>

Ghédir H, Braham A, Viville S, et al (2019) Comparison of sperm morphology and nuclear sperm quality in SPATA16- and DPY19L2-mutated globozoospermic patients. *Andrologia* 51:e13277. <https://doi.org/10.1111/and.13277>

Ghédir H, Ibalá-Romdhane S, Okutman O, et al (2016) Identification of a new *DPY19L2* mutation and a better definition of *DPY19L2* deletion breakpoints leading to globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 22:35–45. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav061>

Guan R, Wen X-Y, Wu J, et al (2012) Knockdown of ZNF403 inhibits cell proliferation and induces G2/M arrest by modulating cell-cycle mediators. *Mol Cell Biochem* 365:211–222. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1262-6>

Guo Y, Jiang J, Zhang H, et al (2019) Proteomic Analysis of Dpy19l2-Deficient Human Globozoospermia Reveals Multiple Molecular Defects. *Proteomics Clin Appl* 13:e1900007. <https://doi.org/10.1002/prca.201900007>

Han T, Wang L, Tang W, et al (2020) GGNBP1 ensures proper spermiogenesis in response to stress in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 525:706–713. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.118>

Harbuz R, Zouari R, Pierre V, et al (2011) A Recurrent Deletion of DPY19L2 Causes Infertility in Man by Blocking Sperm Head Elongation and Acrosome Formation. *American Journal of Human Genetics* 88:351. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.007>

He J, Xia M, Tsang WH, et al (2015) ICA1L forms BAR-domain complexes with PICK1 and is crucial for acrosome formation in spermiogenesis. *J Cell Sci* 128:3822–3836. <https://doi.org/10.1242/jcs.173534>

Jamsai D, Bianco DM, Smith SJ, et al (2008) Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. *REPRODUCTION* 135:751–759. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0485>

Jamsai D, O'Connor AE, DeBoer KD, et al (2013) Loss of GGN Leads to Pre-Implantation Embryonic Lethality and Compromised Male Meiotic DNA Double Strand Break Repair in the Mouse. *PLoS ONE* 8:e56955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056955>

Jan SZ, Vormer TL, Jongejan A, et al (2017) Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development* 144:3659–3673. <https://doi.org/10.1242/dev.152413>

Karaouzene T, ElAtifi M, Issartel J-P, et al (2013) Comparative testicular transcriptome of wild type and globozoospermic Dpy19l2 knock out mice. *Basic and Clinical Andrology* 23:

Kherraf Z, Christou-Kent M, Karaouzene T, et al (2017) SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med* 9:1132–1149. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607461>



Kim S, Scheffler K, Halpern AL, et al (2018) Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat Methods* 15:591–594.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0051-x>

Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al (2019) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 35:1978–1980.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>

Koscinski I, Ellnati E, Fossard C, et al (2011) DPY19L2 Deletion as a Major Cause of Globozoospermia. *Am J Hum Genet* 88:344–350.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.01.018>

Krausz C (2011) Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25:271–285.  
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>

Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F (2014) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2:5–19. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>

Krausz C, Riera-Escamilla A (2018) Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15:369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>

Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bio]

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li Y, Li C, Lin S, et al (2017) A nonsense mutation in *Ccdc62* gene is responsible for spermiogenesis defects and male infertility in *repro29/repro29* mice †. *Biology of Reproduction* 96:587–597. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141408>

Li Y-H, Zhang N, Wang Y-N, et al (2016) Multiple faces of protein interacting with C kinase 1 (PICK1): Structure, function, and diseases. *Neurochem Int* 98:115–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.03.001>

Lin Y-N, Roy A, Yan W, et al (2007) Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol* 27:6794–6805. <https://doi.org/10.1128/MCB.01029-07>

Liu G, Shi Q-W, Lu G-X (2010) A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl* 12:556–560. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.47>

Lu B, Bishop CE (2003) Mouse GGN1 and GGN3, Two Germ Cell-specific Proteins from the Single Gene *Ggn*, Interact with Mouse POG and Play a Role in Spermatogenesis. *J Biol Chem* 278:16289–16296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211023200>

Lutzmann M, Grey C, Traver S, et al (2012) MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell* 47:523–534. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.048>

Mallepaly R, Butler PR, Herati AS, Lamb DJ (2017) Genetic Basis of Male and Female Infertility. In: Vogt PH (ed) *Monographs in Human Genetics*. S. Karger AG, pp 1–16

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al (2012) National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine* 9:e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>

McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 17:122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>

Mitchell MJ, Metzler-Guillemain C, Toure A, et al (2017) Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies: Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin Genet* 91:208–216. <https://doi.org/10.1111/cge.12900>

Modarres P, Tanhaei S, Tavalae M, et al (2016) Assessment of DPY19L2 Deletion in Familial and Non-Familial Individuals with Globozoospermia and DPY19L2 Genotyping. *Int J Fertil Steril* 10:196–207

Modarres P, Tavalae M, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH (2018) An Overview of The Globozoospermia as A Multigen-ic Identified Syndrome. *IJFS* 12:. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5561>

Oud MS, Okutman Ö, Hendricks L a. J, et al (2020) Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia. *Hum Reprod* 35:240–252. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez246>

Pasch E, Link J, Beck C, et al (2015) The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. *Biology Open* 4:1792–1802. <https://doi.org/10.1242/bio.015768>

Pereira CD, Serrano JB, Martins F, et al (2019) Nuclear envelope dynamics during mammalian spermatogenesis: new insights on male fertility. *Biol Rev Camb Philos Soc* 94:1195–1219. <https://doi.org/10.1111/brv.12498>

Pierre V, Martinez G, Coutton C, et al (2012) Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of

the acrosome to the nucleus. *Development* 139:2955–2965.  
<https://doi.org/10.1242/dev.077982>

Ray PF, Coutton C, Arnoult C (2016) Sun proteins and Dpy19l2 forming LINC-like links are critical for spermiogenesis. *Biology Open* 5:535.  
<https://doi.org/10.1242/bio.016626>

Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C, et al (2017) Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function: Genetic abnormalities leading to qualitative sperm defects. *Clin Genet* 91:217–232. <https://doi.org/10.1111/cge.12905>

Richards S, Aziz N, Bale S, et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Sen CGS, Holstein AF, Schirren C (1971) über die Morphogenese rundköpfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologia* 3:117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1971.tb02106.x>

Sha Y-W, Sha Y-K, Ji Z-Y, et al (2018) TSGA10 is a novel candidate gene associated with acephalic spermatozoa. *Clin Genet* 93:776–783.  
<https://doi.org/10.1111/cge.13140>

Shang Y-L, Zhu F-X, Yan J, et al (2019) Novel DPY19L2 variants in globozoospermic patients and the overcoming this male infertility. *Asian J Androl* 21:183–189.  
[https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_79\\_18](https://doi.org/10.4103/aja.aja_79_18)

Shelling A, Chapman C, Cree L (2015) The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. *IJWH* 799. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S64024>

Singh G (1992) Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil* 37:99–102

Slattery SD, Moore RV, Brinkley BR, Hall RM (2008) Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of cenp-A and borealin during mitosis. *Cell Cycle* 7:787–795. <https://doi.org/10.4161/cc.7.6.5563>

Smith S (2003) Diagnosis and Management of Female Infertility. *JAMA* 290:1767. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1767>

Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119–124. <https://doi.org/10.1007/BF00278879>

Tokuhiro K, Isotani A, Yokota S, et al (2009) OAZ-1/OAZ3 Is Essential for Rigid Connection of Sperm Tails to Heads in Mouse. *PLOS Genetics* 5:e1000712. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000712>

Touré A, Martinez G, Kherraf Z-E, et al (2020) The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>

Tournaye H, Krausz C, Oates RD (2017) Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 5:544–553. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30040-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30040-7)

Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y (2006) SUN-domain proteins: “Velcro” that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. <https://doi.org/10.1038/nrm2003>

Wang J, Qi L, Huang S, et al (2015) Quantitative phosphoproteomics analysis reveals a key role of insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase in human sperm capacitation. *Mol Cell Proteomics* 14:1104–1112.

<https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045468>

Xiao N, Kam C, Shen C, et al (2009) PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest* 119:802–812.

<https://doi.org/10.1172/JCI36230>

Xu M, Xiao J, Chen J, et al (2003) Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol Hum Reprod* 9:9–17.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gag005>

Yan W, Si Y, Slaymaker S, et al (2010) Zmynd15 Encodes a Histone Deacetylase-dependent Transcriptional Repressor Essential for Spermiogenesis and Male Fertility.

*J Biol Chem* 285:31418–31426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116418>

Yang F, Eckardt S, Leu NA, et al (2008) Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*

180:673–679. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709057>

Yassine S, Escoffier J, Abi Nahed R, et al (2015a) Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5

is not involved in acrosome attachment to the nuclear envelope. *PLoS ONE*

10:e0118698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118698>

Yassine S, Escoffier J, Martinez G, et al (2015b) Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the

initiation of embryo development. *Mol Hum Reprod* 21:169–185.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gau099>

Yatsenko AN, O'Neil DS, Roy A, et al (2012) Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. *Mol Hum Reprod* 18:14–21. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar057>

Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedon JW, et al (2010) Comprehensive 5-Year Study of Cytogenetic Aberrations in 668 Infertile Men. *Journal of Urology* 183:1636–1642.  
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.12.004>

Yatsenko SA, Rajkovic A (2019) Genetics of human female infertility†. *Biology of Reproduction* 101:549–566. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox084>

Yoon S-Y, Jellertette T, Salicioni AM, et al (2008) Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca<sup>2+</sup> release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 118:3671–3681. <https://doi.org/10.1172/JCI36942>

Zhang J, Wang Y, Zhou Y, et al (2005) Yeast two-hybrid screens imply that GGNBP1, GGNBP2 and OAZ3 are potential interaction partners of testicular germ cell-specific protein GGN1. *FEBS Letters* 579:559–566.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.112>

Zhou Y, Zhao Q, Bishop CE, et al (2005) Identification and characterization of a novel testicular germ cell-specific gene *Ggnbp1*. *Mol Reprod Dev* 70:301–307.  
<https://doi.org/10.1002/mrd.20214>

Zhu F, Gong F, Lin G, Lu G (2013) DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Molecular Human Reproduction* 19:395–404. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat018>

Zhu F, Liu C, Wang F, et al (2018) Mutations in PMFBP1 Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Am J Hum Genet* 103:188–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.06.010>



## **ANNEXES**

### **ANNEXE 1 : Supplementary Table**

**Supplementary Table- Sequences of the 22 DPY19L2 primers pairs with respective melting temperatures (T<sub>m</sub>) and amplicon size.**

<b>Exons</b>	<b>Forward primer sequences (5' → 3')</b>	<b>Reverse primer sequences (5' → 3')</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Amplified sequences size (pb)</b>
exon 1	GCACCCACAAACCCTTGC	GAGCACGTGAGGGGACACT	61.57	650
exon 2	AAAGCAGCTATTAATGAC	GCTGTTTCACATATGAG	47.19	235
exon 3	ATTCAGGTGTGTGCCATAC	GAAACAGTGCAGTTGACCAG	56.02	373
exon 4	GCGAGAAGTGATTAGGAAGTCTT	TGGCCATTATTTACACACTAAGG	58.25	498
exon 5	TAATATCAAAACACGCAGT	ATAGTCAAGATTGCCTTACA	49.98	573
exon 6	AACTATATAATCACTCATT	ATGACTTTGAGATAGAA	43.09	566
exon 7	GTAAGCTGAGATTTTCGACA	TAAGGCAAGAGATTTTCATGT	52.43	590
exon 8	GGTAGTTAATTGCTGTCTAC	GCCTTCGTTTTATAAATCG	51.03	310
exon 9	AGTTCTTTTTAGTACTTTAAG	GCATACATTTACCTACAT	47.85	353
exon 10	GCCATCCATCTTTTTAATTCTG	CCAAAGAGGAGGTACCGTATAA	53.78	426
exon 11	TTGGCCAAGAGTCATT	AACCTCCTCAAGTGACTION	49.22	516
exon 12	ATTAGCCTGCAGAAAATGGT	GAAGGTTAATTGAAGCTAGA	55.28	650
exon 13	GCTATTAACCTTTCACTC	CGTCTAGAGACCTTAGAG	49.76	478
exon 14	CTTAGAGGGATGTCTAAATAT	TCCAAGTGGCCTAGATTATC	49.12	544
exon 15	AATGTAAAAATTGTAAGTAACC	CCGGGTGTACCTACAAATGTTAAT	48.72	375
exon 16	GGCATCTATAGTAGACCGTCC	TTTAAACTTTGAGTTGGTTCACA	57.63	431
exon 17	TGTATTTTCGTAAGTAGTTTAGA	GCTCAGCAGGCTAGAACTG	51.10	435
exon 18	CATAGTAGACATTTCGATAAATTAT TGC	AATTAGTCAGCAAAGCCACA	55.23	363
exon 19	AATTTATTGTTGACCCTACG	GGGTTTAAATGATTGACATT	51.14	423
exon 20	ACCCCTTAGAACTGTGAAGATTA	CAGAGGCAACAGGTACGTAT	56.64	553
exon 21	TATATTCTCTGAAAACCTGTGAA	AGGGTTAATACTCACTTAGTTC	50.58	462
exon 22	ATTGTCTCTAGACAGCAATACAT	GTGTCTGTTATTAAGCTTGTG	55.22	313

## **ANNEXE 2 : Première page de l'article original**

Accepté dans le journal Human Genetics.

### **Human Genetics**

#### **Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player.**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	HUGE-D-20-00445R2	
<b>Full Title:</b>	Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player.	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Funding Information:</b>	Agence Nationale de la Recherche (FLAGEL_OME)	Pr Pierre Ray
<b>Abstract:</b>	<p>Globozoospermia is a rare phenotype of primary male infertility inducing the production of round-headed spermatozoa without acrosome. Anomalies of DPY19L2 account for 50 to 70% of all cases and the entire deletion of the gene is by far the most frequent defect identified. Here, we present a large cohort of 69 patients with 20% to 100% of globozoospermia. Genetic analyses including multiplex ligation-dependent probe amplification, Sanger sequencing and whole exome sequencing identified 25 subjects with a homozygous DPY19L2 deletion (36%) and 14 carrying other DPY19L2 defects (20%). Overall, 11 deleterious single nucleotide variants were identified including 8 novel and 3 already published mutations. Patients with a higher rate of round-headed spermatozoa were more often diagnosed and had a higher proportion of loss of function anomalies, highlighting a good genotype phenotype correlation. No gene defects were identified in patients carrying &lt;50% of globozoospermia while diagnosis efficiency rose to 77% for patients with &gt;50% of globozoospermia. In addition, results from whole exome sequencing were scrutinized for 23 patients with a DPY19L2 negative diagnosis, searching for deleterious variants in the nine other genes described to be associated with globozoospermia in human ( C2CD6, C7orf61, CCDC62, CCIN, DNAH17, GGN, PICK1 , SPATA16 and ZPBP1). Only one homozygous novel truncating variant was identified in the GGN gene in one patient, confirming the association of GGN with globozoospermia. In view of these results, we propose a novel diagnostic strategy focusing on patients with at least 50% of globozoospermia and based on a classical qualitative PCR to detect DPY19L2 homozygous deletions. In the absence of the latter, we recommend to perform whole exome sequencing to search for defects in DPY19L2 as well as in the other previously described candidate genes.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	Pierre Ray Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes Grenoble, FRANCE	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Pierre Ray	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Pierre Ray Tristan Celse Caroline Cazin Flore Mietton Guillaume Martinez Nicolas Thierry-Mieg Selima Fourati Ben Mustapha	

**ANNEXE 3 : Premières pages de la revue « Genetics of teratozoospermia: back to the head »**

Titre, auteurs, abstract et mots-clés.

Acceptée dans la revue Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

**Genetics of teratozoospermia: back to the head**

Julie Beurois<sup>1</sup>, Caroline Cazin<sup>1</sup>, Zine-Eddine Kherraf<sup>1,2</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,2,3</sup>, Tristan Celse<sup>1,2,3</sup>, Aminata Touré<sup>1</sup>, Christophe Arnoult<sup>1</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2</sup> and Charles Coutton<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, 38000 Grenoble, France.

<sup>2</sup> CHU de Grenoble, UM GI-DPI, Grenoble, F-38000, France

<sup>3</sup> CHU Grenoble Alpes, UM de Génétique Chromosomique, Grenoble, France.

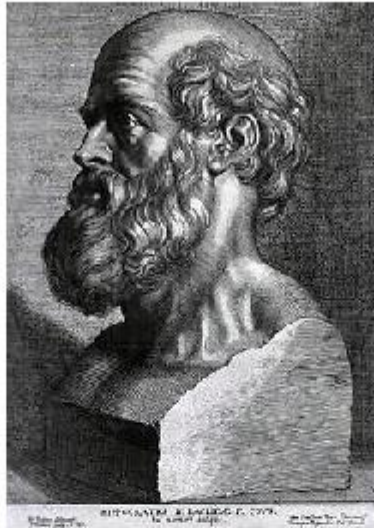
\* Corresponding author: Pr. Charles COUTTON, Laboratoire de Génétique Chromosomique, Hôpital Couple Enfant, CHU Grenoble Alpes, 38043 Grenoble cedex 9, France. Tel: +33-4-76-76-54-82; E-mail: CCoutton@chu-grenoble.fr

## **Abstract**

Spermatozoa are polarized cells with a head and a flagellum joined together by the connecting piece. Head integrity is critical for normal sperm function, and head defects consistently lead to male infertility. Abnormalities of the sperm head are among the most severe and characteristic sperm defects. Patients presenting with a monomorphic head sperm defects such as globozoospermia or macrozoospermia were analyzed permitting to identify several key genes for spermatogenesis such as *AURKC* and *DPY19L2*. The study of patients with other specific sperm head defects such as acephalic spermatozoa has also enable the identification of new infertility genes such as *SUN5*. Here we review the genetic causes leading to morphological defects of sperm head. Advances in genetic of male infertility are necessary to improve the management of infertility and will pave the road towards future strategies of treatments, especially for patients with the most severe phenotype as sperm head defects.

**Key words:** male infertility, teratozoospermia, gene defects, genetic diagnosis, sperm head, spermatogenesis, acrosome, globozoospermia, large headed spermatozoa, acephalic spermatozoa, ICSI

## ANNEXE 4 : Serment d'Hippocrate



### **SERMENT D'HIPPOCRATE**

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

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

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

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

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

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

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

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

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

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

## ***ABSTRACT***

---

Globozoospermia is a rare phenotype of primary male infertility inducing the production of a large proportion of round-headed spermatozoa without acrosome. Anomalies of the *DPY19L2* gene account for 50 to 70% of all cases and the entire deletion of the gene is the main defect identified. We present here a large cohort of 69 patients with 20% to 100% of globozoospermia. Genetic analyses including multiplex ligation-dependent probe amplification, Sanger sequencing and whole exome sequencing identified 25 subjects with a homozygous *DPY19L2* deletion (36%) and 14 carrying other *DPY19L2* defects (20%). Overall, 11 deleterious single nucleotide variants were identified including 8 novel and 3 already published variants. Patients with a higher rate of round-headed spermatozoa were more often diagnosed and had a higher proportion of loss of function anomalies, highlighting a good genotype phenotype correlation. No gene defects were identified in patients carrying <50% of globozoospermia while the diagnosis efficiency rose to 77% for patients with >50% of globozoospermia. Nine other genes (*PICK1*, *ZPBP1*, *SPATA16*, *CCDC62*, *C2CD6*, *CCIN*, *C7orf61*, *DNAH17* and *GGN*) have been previously described to be associated with human globozoospermia but defects in these genes have only been identified in a handful of patients. Interestingly we identified one patient with a homozygous novel truncating variant in *GGN* confirming the association of *GGN* with globozoospermia. In view of these results, we propose a novel diagnostic strategy focusing on patients with at least 50% of globozoospermia and based on a classical qualitative PCR to detect *DPY19L2* homozygous deletions. In the absence of the latter, we recommend to perform whole exome sequencing to search for defects in *DPY19L2* and in other candidate genes.

## ***RESUME***

---

La globozoospermie est un phénotype rare d'infertilité masculine primaire induisant la production d'une proportion importante de spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome. Les anomalies du gène *DPY19L2* représentent 50 à 70 % de tous les cas et la délétion du gène entier est le principal défaut génétique identifié chez les sujets testés. Nous présentons ici une large cohorte de patients atteints de globozoospermie comprenant 69 sujets avec 20 à 100 % de spermatozoïdes à tête ronde. Des analyses génétiques comprenant une technique d'Amplification Multiplex de Sondes Ligation-dépendantes (MLPA), le séquençage Sanger et le séquençage exomique ont permis d'identifier 25 sujets présentant une délétion homozygote de *DPY19L2* (36%) et 14 porteurs d'autres défauts du gène (20%). Au total, 11 variants nucléotidiques délétères ont été identifiés, dont 8 nouveaux variants et 3 déjà publiés. Les patients présentant un taux plus élevé de spermatozoïdes à tête ronde ont plus d'anomalies retrouvées avec une prédominance d'anomalies perte de fonction, ce qui met en évidence une bonne corrélation génotype-phénotype. En revanche, aucune anomalie génétique n'a été identifiée chez les patients porteurs de moins de 50 % de spermatozoïdes ronds, tandis que l'efficacité du diagnostic passe à 77 % pour les patients présentant plus de 50 % de globozoospermie. Neuf autres gènes (*PICK1*, *ZBP1*, *SPATA16*, *CCDC62*, *C2CD6*, *CCIN*, *C7orf61*, *DNAH17* et *GGN*) ont été décrits comme étant associés à la globozoospermie chez l'homme, mais les défauts de ces gènes n'ont été identifiés que chez très peu de patients. Il est intéressant de noter que nous avons identifié un patient présentant une nouvelle variation homozygote tronquante de *GGN*, ce qui confirme l'association de *GGN* à la globozoospermie. Au vu de ces résultats, nous proposons une nouvelle stratégie diagnostique axée sur les patients présentant au moins 50% de globozoospermie et basée sur une PCR qualitative classique pour détecter la délétion homozygote de *DPY19L2*. En l'absence de cette dernière, nous recommandons d'effectuer un séquençage de l'exome entier pour rechercher des défauts dans *DPY19L2* puis dans les autres gènes candidats.