Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme

Anne-Karen Faure

▶ **To cite this version:**

Anne-Karen Faure. Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme. Biologie de la reproduction. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00250307

HAL Id: tel-00250307
https://theses.hal.science/tel-00250307

Submitted on 11 Feb 2008

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

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

Université Joseph Fourier–Grenoble I
Chimie et Sciences du Vivant
(Arrêtés ministériels du 5 Juillet 1984 et du 30 Mars 1992)

THESE

Pour obtenir le Titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Anne-Karen FAURE

Le 28 Février 2007

Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme

Membres du Jury

Président du Jury	Pr Stefan NONCHEV
Directeur de thèse	Pr Sophie PISON-ROUSSEAUX
Rapporteurs	Dr Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI
	Pr Jean-Pierre SIFFROI
Examinateur	Dr Rachel LEVY

Thèse préparée au sein du Laboratoire
Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation
Unité Inserm U309, Institut Albert Bonniot
Université Joseph Fourier, Grenoble I

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS 4

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX 6

AVANT-PROPOS 7

INTRODUCTION 11

1. La spermatogenèse humaine 11

1.1 Fonctions et structure du testicule humain : rappels 11

1.2 Evolution des cellules de la lignée germinale 13

1.2.1 Les spermatogonies 13
1.2.2 Les spermatocytes 15
1.2.3 Les spermatides 16

1.3 Cinétique de la spermatogenèse 19

1.4 Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire 20

1.5 Cellules de Sertoli et régulation endocrine et paracrine de la spermatogenèse 21

1.5.1 Période embryonnaire et foetale 21
1.5.2 Période néonatale et pré-pubertaire 24
1.5.3 Période post-pubertaire 26

2. Anomalies de la spermatogenèse 30

2.1 Les anomalies quantitatives de la spermatogenèse 30

2.2 Les cancers testiculaires 32

2.2.1 Epidémiologie et étiologie 32
2.2.2 Classification des tumeurs testiculaires 32
2.2.3 Mécanisme d'apparition des tumeurs germinales du testicule 34

2.3 Le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) 34

2.3.1 Définition 35
2.3.2 Aspects cliniques 35
2.3.3 Origine du TDS : l'ante-natal comme hypothèse 38
2.3.4 Rôle des perturbateurs endocriniens 38

3. Génome somatique et spermatogenèse : le chromosome Y **42**

3.1 Le chromosome Y humain 42

3.1.1 Structure du chromosome Y humain 42
3.1.2 Gènes du chromosome Y 47

3.2 Les anomalies de structure du chromosome Y 48

3.2.1 Translocations impliquant le chromosome Y 48
3.2.2 Délétions macroscopiques 49
3.2.3 Isochromosomes Y 49
3.2.4 Chromosomes Y en anneau 50
3.2.5 Les polymorphismes du chromosome Y 51

3.3 Les microdélétions du chromosome Y 52

3.3.1 Historique 53
3.3.2 Les différents types de délétions de la région MSY 55
3.3.3 Conséquences cliniques des microdélétions du chromosome Y 59
3.3.4 Méthodes et indications de la recherche des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles 62

4. Génome germinal et spermatogenèse **64**

4.1 Les aneuploïdies dans l'espèce humaine 64

4.1.1 Généralités 64
4.1.2 Genèse des aneuploïdies dans l'espèce humaine 64

4.2 Aneuploïdies spermatiques et infertilité masculine : revue de la littérature 67

5. Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermatogenèse **71**

5.1 Structure de l'épigénome dans la cellule somatique 71

5.2 Rôle de l'épigénome dans la cellule somatique 74

5.3 Acétylation des histones dans la cellule somatique 76

5.4 Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermiogenèse 80

5.4.1 Incorporation des variants d'histones au cours de la spermatogenèse 81
5.4.2 Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines au cours de la spermatogenèse humaine 82
5.4.3 Acétylation des histones au cours de la spermiogenèse 84

OBJECTIFS **86**

RESULTATS **88**

1. Génome et spermatogenèse **88**

1.1 Exploration du génome somatique dans les troubles sévères de la spermatogenèse (Publication n° 1) 89

1.2 Exploration du génome germinal dans les troubles sévères de la spermatogenèse (Publication n°2) 90

2. Exploration de l'épigénome au cours de la spermatogenèse (Publication n°3) **91**

DISCUSSION **93**

1. Génome et spermatogenèse **93**

1.1 Exploration du génome somatique dans les troubles sévères de la spermatogenèse 93

1.2 Exploration du génome germinal dans les troubles sévères de la spermatogenèse 96

2. Exploration de l'épigénome au cours de la spermatogenèse **100**

CONCLUSION GENERALE **104**

BIBLIOGRAPHIE **106**

ANNEXES **127**

Liste des publications **155**

Fiche clinico-biologique : bilan avant microinjection **158**

Consentement pour une étude génétique chez une personne majeure **159**

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMH : hormone anti-müllérienne

AMP : Assistance médicale à la procréation

AZF : Azoospermia factor

BPY1-2 : basic proteins Y1 et Y2

BRDT : Bromodomain testis specific

CDY : chromodomain Y

CIS : carcinome *in situ*

DAZ : deleted in azoospermia

DDX3Y : Dead-box protein 3 Y chromosomal

eIF1AY : eukaryotic translation-initiation factor 1A Y isoform

FISH : hybridation *in situ* fluorescente

FSH : follicle stimulating hormone

GDNF : Glial derived neurotrophic factor

GnRH : gonadotropin releasing hormone

H1 : histone H1

H2A : histone H2A

H2B : histone H2B

H3 : histone H3

H4 : histone H4

HAT : histone acétyl transférase

HDAC : histone déacétylase

HERV15 : Human Endogenous Retroviral 15

ICSI : intra-cytoplasmic sperm injection

Idic(Y) : chromosome Y isodicentrique

Insl3 : insuline-like factor 3

LH : luteinizing hormone

MSY : Male specific region of the Y

OAT : oligoasthénotératozoospermie

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAR 1 et 2 : pseudoautosomal region 1 et 2

PCR : Polymerase chain reaction

PGC : cellules germinales primordiales (gonocytes primordiaux)

PRY : PTP-BL (protein tyrosine phosphatase BAS like) related Y

RBM : RNA binding motif

r(Y) : chromosome Y en anneau

SCF : Stem cell factor

SCO : Sertoli cell only syndrome

SMCY : selected mouse cDNA on the Y

SRY : sex-determining region Y

STS : sequence tagged site

TDF : testis determining factor

TDS : testicular dysgenesis syndrome

TP : protéine de transition

USP9Y : ubiquitin-specific protease 9 Y chromosome

UTY : ubiquitous tetratricopeptide repeat motif Y

XKRY : XK related Y

Yp : bras court du chromosome Y

Yq : bras long du chromosome Y

Yqs : satellite du bras long du chromosome Y

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Page

Figure I.1 : Coupe sagittale du testicule humain. 10

Figure I .2 : Coupes histologiques de testicule humain normal. 10

Figure I.3 : Evolution des cellules de la lignée germinale au cours de la spermatogenèse humaine. 12

Figure I.4 : La méiose mâle. 14

Figure I.5 : Les associations cellulaires identifiées dans les tubes séminifères humains. 18

Figure II.1 : Représentation schématique de l'étiologie et de la pathogénie des différents symptômes du TDS. 37

Figure III.1 : Cartographie du chromosome Y humain. 41

Figure III.2 : Les trois types de séquences codantes de la région MSY. 44

Figure III.3 : Les gènes du chromosome Y supposés ou vérifiés codant des protéines. 46

Figure III.4 : Structure de la région AZFa et mécanisme de recombinaison. 54

Figure III.5 : Structure palindromique, mécanismes de recombinaison et taille des délétions des régions AZFb et AZFc. 57

Figure IV.1 : Les mécanismes de non-disjonctions méiotiques. 65

Figure V.1 : Structure de la chromatine dans la cellule somatique. 72

Figure V.2 : Le processus d'acétylation des histones. 75

Figure V.3 : Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse humaine : variations du contenu en nucléoprotéines. 79

Tableau I.1 : Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines. 19

Tableau II.1 : Classification anatomo-pathologique des tumeurs testiculaires. 33

Tableau III.1 : Les délétions de la région MSY du chromosome Y. 61

Tableau V.1 : Classification des variants d'histones en fonction de leur distribution cellulaire chez les mammifères 82

AVANT-PROPOS

L'infertilité est définie par un échec de procréation après 2 ans de rapports sexuels non protégés selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle concerne environ 15 % des couples dans le monde. Dans un tiers des cas environ, la cause est plutôt féminine, dans un tiers des cas plutôt masculine, et dans un tiers des cas, elle concerne les deux partenaires (Thonneau et al. 1991).
L'infertilité masculine peut être d'origine obstructive, par anomalie de l'acheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales masculines, ou non-obstructive, par défaut de la production testiculaire des spermatozoïdes. Ces deux causes peuvent parfois être associées.

L'examen de base pour explorer les troubles de la fertilité masculine est le spermogramme. Il permet d'étudier le nombre, la mobilité, la vitalité, ainsi que la morphologie des spermatozoïdes dans l'éjaculât. L'azoospermie est définie comme l'absence complète de spermatozoïdes dans l'éjaculât, après examen soigneux du culot de centrifugation, et contrôle deux à trois mois après sur un nouveau recueil. L'oligozoospermie est définie par une numération en spermatozoïdes inférieure à 20 millions par ml d'éjaculât selon l'OMS (WHO 1999). Elle est qualifiée de sévère lorsque la numération en spermatozoïdes n'excède pas 5 millions par ml d'éjaculât.

Les patients porteurs d'une atteinte sévère de la spermatogenèse ont le plus souvent recours à la technique d'ICSI (intra-cytoplasmic sperm injection) pour tenter d'obtenir une grossesse. Cette technique, dans laquelle un spermatozoïde est injecté directement dans le cytoplasme de l'ovocyte, a révolutionné la prise en charge des infertilités masculines. Elle permet d'obtenir une grossesse avec un taux important de succès (25 à 30% par tentative) dès lors que l'on dispose de quelques spermatozoïdes mobiles (Palermo et al. 1992; Van Steirteghem et al. 1993).

Ainsi, des patients présentant une altération très sévère de leurs paramètres spermatiques peuvent actuellement espérer une procréation avec leurs propres gamètes, sans avoir recours à un tiers-donneur. Il est même actuellement possible d'obtenir des embryons et des grossesses chez des hommes azoospermiques, grâce à l'injection de spermatozoïdes testiculaires immatures, voire de spermatides. Cependant, l'efficacité de l'ICSI pose la double question de l'étiologie de ces infertilités et du risque encouru par la descendance de ces patients en assistance médicale à la procréation (AMP). D'où l'importance de savoir si la cellule germinale utilisée pour l'ICSI transmet une information appropriée à l'embryon.

L'information véhiculée par le spermatozoïde est non seulement génétique, c'est-à-dire définie par la séquence nucléotidique de son génome haploïde, mais aussi épigénétique, dont le support est moins bien connu.

L'objectif de mon travail de thèse est :

- d'une part d'approfondir l'exploration génétique somatique et germinale chez des patients dont la spermatogenèse est altérée;

- d'autre part d'étudier des modifications de l'épigénome au cours de la spermatogenèse normale et pathologique.

Les données de ce travail permettront d'ouvrir de nouveaux champs d'investigation pour les hommes pris en charge dans le cadre d'anomalies de la procréation.

Dans l'introduction de ce travail, nous présenterons successivement les données de la littérature concernant la spermatogenèse normale et pathologique chez l'homme, l'implication du génome somatique, notamment du chromosome Y, dans la fertilité, les anomalies du génome germinal associées aux atteintes de la spermatogenèse, et enfin la réorganisation de l'épigénome au cours de la spermatogenèse.

Nos résultats seront présentés sous la forme de trois publications originales (respectivement soumise, sous presse et publiée) concernant, chez des hommes dont l'infertilité est d'origine non-obstructive :

- l'exploration du chromosome Y dans les cellules somatiques ;
- l'étude des aneuploïdies germinales ;
- l'analyse du profil d'acétylation des histones, une marque importante pour la réorganisation de l'épigénome au cours de la spermatogenèse.

Ces données ainsi que les perspectives de ce travail seront ensuite discutées.

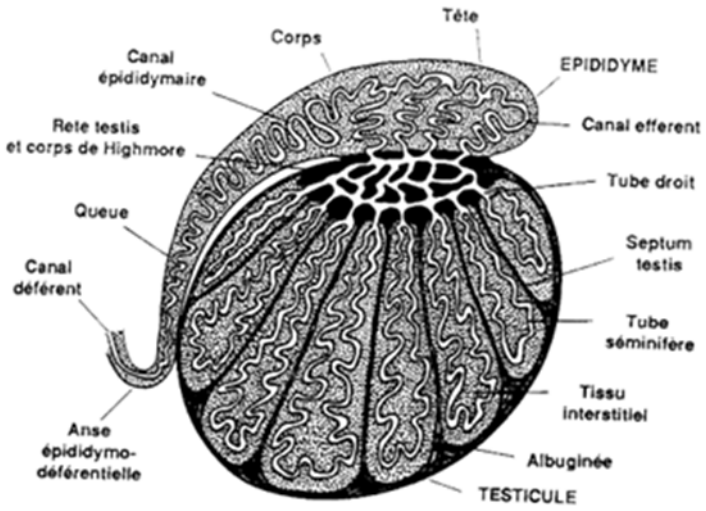

Figure I.1 : coupe sagittale du testicule humain
(d'après Czyba et Montella, 1993).

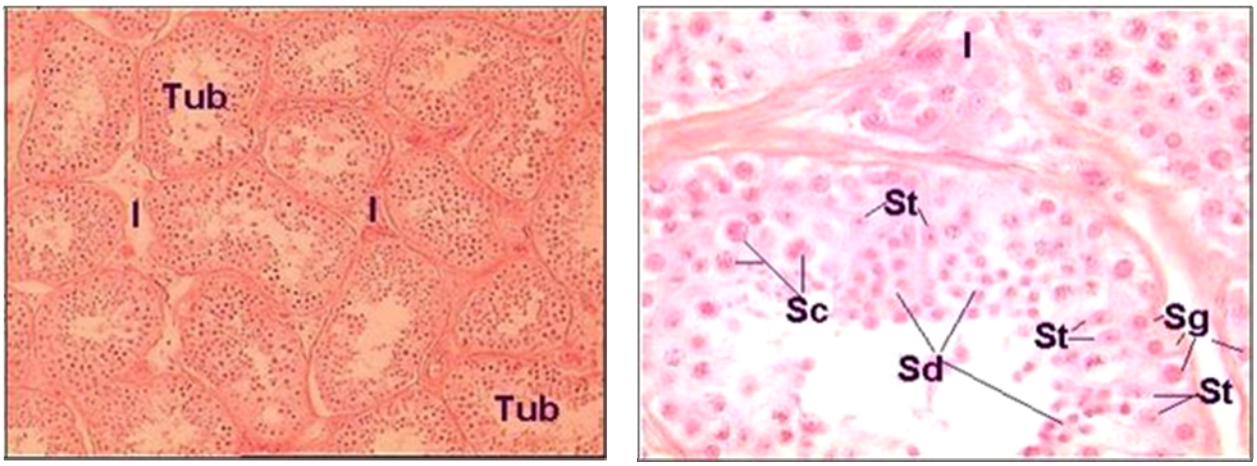

Figure I.2 : coupes histologiques de testicule humain normal
(d'après Wassef Y, Histologie du système reproducteur masculin, http://courseweb.edteched.uottawa.ca/medicine%2Dhistology/)

I : espace interstitiel (avec un ilôt de cellule de Leydig sur l'image de droite), Tub : tube séminifère, Sg : spermatogonie, Sc : spermatocyte, Sd : spermatide, St : noyau de cellule de Sertoli

INTRODUCTION

1. La spermatogenèse humaine

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Clermont 1963; Czyba and Montella 1993; Dadoune and Demoulin 1991; Hartl and Jones 2003).

1.1 Fonctions et structure du testicule humain : rappels

Les testicules sont des organes pairs situés à l'intérieur du scrotum, qui possèdent deux fonctions:

i/ une fonction exocrine, ou gamétogenèse, caractérisée par la production des spermatozoïdes;

ii/ une fonction endocrine, avec synthèse des hormones stéroïdes sexuelles mâles, les androgènes.

Chez l'homme adulte, chaque testicule est une masse ovoïde qui mesure environ 5 cm de long, 3 cm de large et 2,5 cm d'épaisseur, entourée d'une enveloppe conjonctive, l'albuginée. Au pôle supérieur du testicule, il existe un épaississement conjonctif appelé le corps de Highmore. Celui-ci est relié à l'albuginée par des cloisons radiaires, les septa testis, qui délimitent 200 à 300 lobules testiculaires (figure I.1).

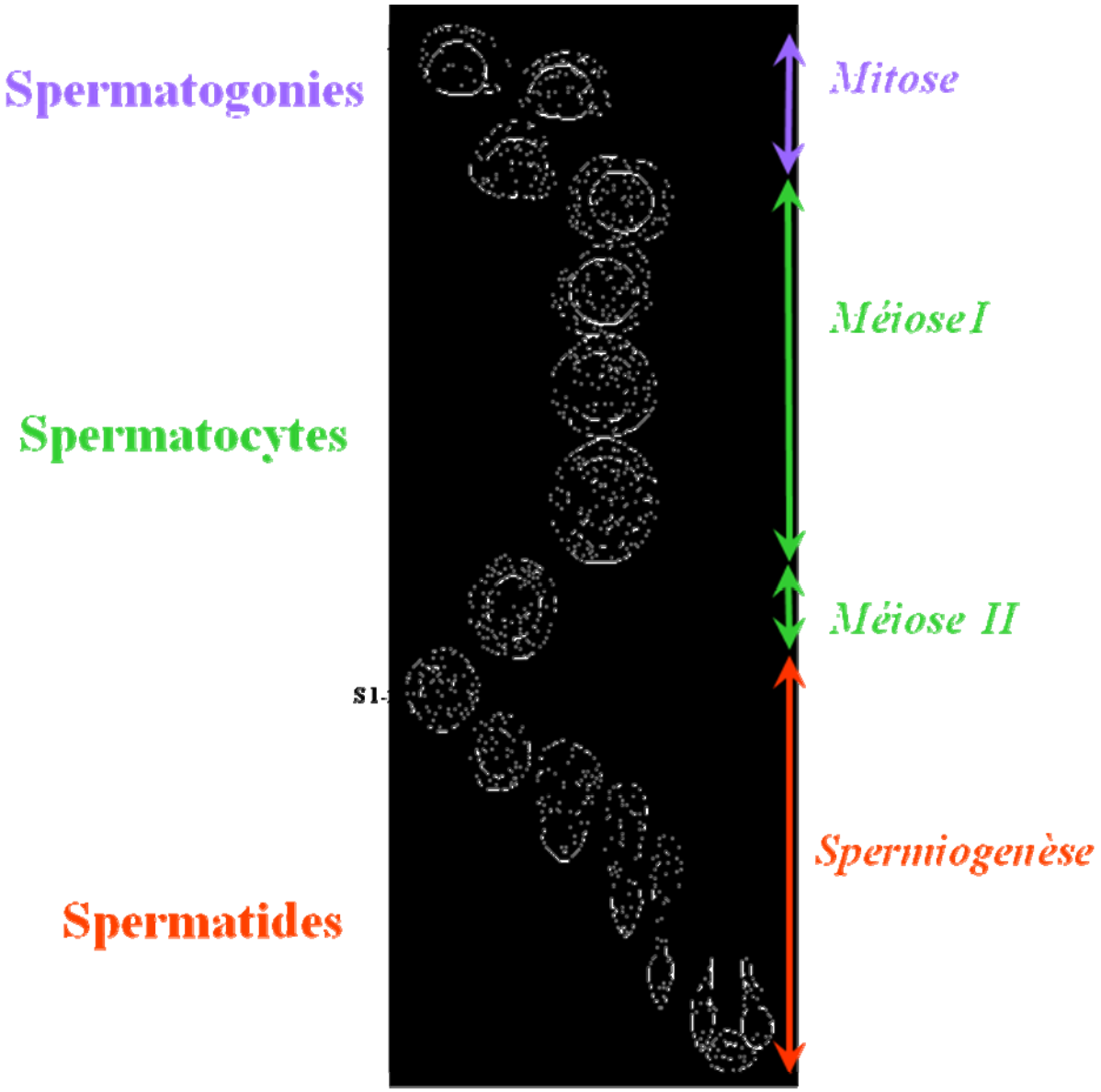

Figure I.3 : Evolution des cellules de la lignée germinale au cours de la spermatogenèse humaine

Chaque lobule contient 2 ou 3 tubes séminifères mesurant 30 à 150 cm de long pour un diamètre de 150 à 300 □m. Les tubes séminifères, sièges de la fonction exocrine du testicule, sont constitués des cellules de la lignée germinale en cours de spermatogenèse, et de cellules somatiques qui ne se divisent pas, les cellules de Sertoli. Entre les tubes séminifères, les espaces interstitiels sont remplis d'un tissu conjonctif lâche, riche en capillaires sanguins et lymphatiques. Au contact des capillaires sont situées les cellules de Leydig, dont l'ensemble constitue la glande interstitielle du testicule, siège de la fonction endocrine (figure I. 2).
Les tubes séminifères déversent leur sécrétion dans les tubes droits, qui débouchent dans le rete testis, puis dans l'épididyme qui coiffe chacun des testicules et qui se poursuit par le canal déférent (figure I. 1).

1.2 Evolution des cellules de la lignée germinale

Trois types de cellules germinales sont impliquées dans la spermatogenèse : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides (figure I.3).

1.2.1 Les spermatogonies

Il s'agit de cellules diploïdes se divisant par mitoses, disposées en périphérie des tubes séminifères. Ce sont des cellules arrondies, d'un diamètre de 10 à 15 μm, avec un cytoplasme clair et un noyau ovoïde. Il en existe trois types selon Clermont (Clermont 1963) :

i/ spermatogonies Ad, à chromatine dense, d'aspect sombre;

ii/ spermatogonies Ap, à chromatine poussiéreuse, claire;

iii/ spermatogonies B, à chromatine mottée et irrégulière.

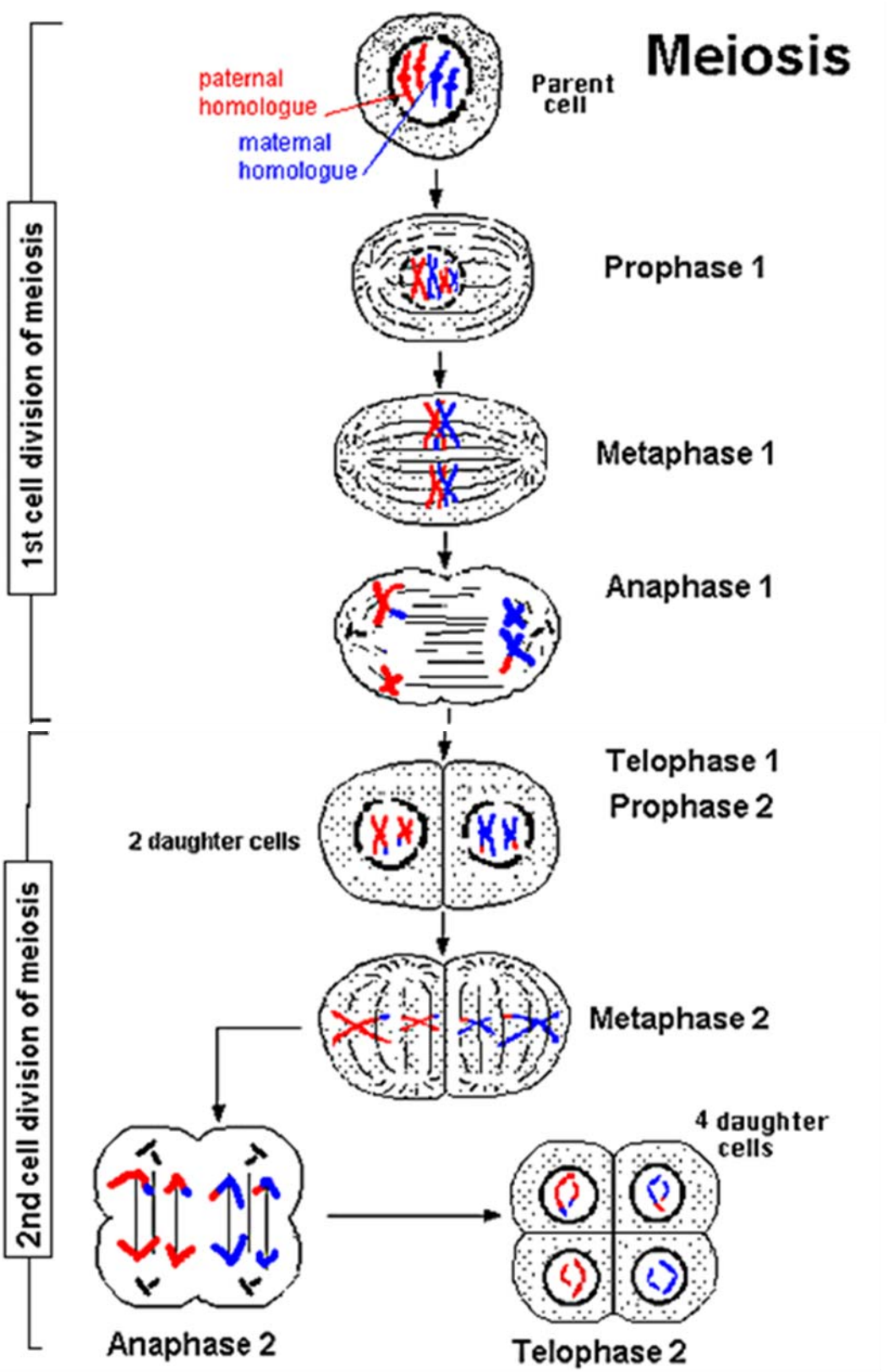

Figure I.4 : la méiose mâle

1.2.2 Les spermatocytes

Il s'agit de cellules disposées à distance de la membrane tubulaire.

Issus de la dernière division des spermatogonies B, les spermatocytes primaires sont de grandes cellules au noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles. Ils traversent une courte interphase (stade pré-leptotène), pendant laquelle s'effectue une réplication d'ADN (les spermatocytes primaires sont des cellules à 2n chromosomes dupliqués ou 4c molécules d'ADN).

Ces cellules entrent ensuite dans un processus de division qui n'affecte que les cellules de la lignée germinale, appelé la méiose. Sa finalité est d'assurer le brassage de l'information génétique et la diminution de moitié du contenu en chromosomes de la cellule. Elle consiste en deux divisions successives (méioses I et II), consécutives à une seule phase de réplication d'ADN (Figure I.4). Chacune des deux divisions peut être décomposée, comme la mitose, en 4 étapes distinctes : prophase, métaphase, anaphase, télophase.

La prophase de méiose I comprend cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Cette prophase est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle, avec échange de matériel génétique entre les chromatides homologues au stade pachytène. Ainsi, les cellules en prophase I possèdent une chromatine sous forme de filaments plus ou moins épais selon le stade méiotique.

En métaphase de première division méiotique, les chromosomes homologues se disposent de part et d'autres de la plaque équatoriale, les chiasmas (au niveau desquels ils sont attachés) sont sur la plaque équatoriale, les centromères de part et d'autres de la plaque équatoriale.

En anaphase de méiose I, les chromosomes homologues se séparent et s'orientent vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire.

Les cellules en cours de méiose I les plus souvent présentes dans les tubes séminifères sont les cellules au stade pachytène car elles ont une durée de vie longue (16 jours).

La première division méiotique aboutit à la séparation des chromosomes homologues et à la formation de spermatocytes secondaires, dans lesquels chaque chromosome est formé de deux chromatides. Les spermatocytes secondaires contiennent donc n chromosomes dupliqués ou 2c molécules d'ADN. Ces cellules sont rarement visualisées en histologie sur les coupes de biopsie testiculaire, car elles ont une durée de vie très brève (1 jour). Elles se présentent comme des cellules au noyau arrondi avec une chromatine homogène.

Après une interphase très courte où les chromosomes ne se décondensent que partiellement, les spermatocytes secondaires entrent en deuxième division de méiose, sans réplication d'ADN préalable. La deuxième division est similaire à une mitose somatique normale, à ceci près qu'elle ne porte que sur 23 chromosomes au lieu de 46.

La prophase de deuxième division méiotique a une durée très courte, contrairement à la prophase I.

En métaphase II, les chromosomes s'alignent au niveau de leurs centromères sur la plaque équatoriale.

En anaphase de méiose II, ce sont les centromères qui se séparent, entraînant la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome qui vont s'orienter vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire.

La deuxième division méiotique aboutit à la ségrégation des chromatides soeurs dans les deux cellules filles, les spermatides, qui sont des cellules haploïdes contenant n chromosomes et c molécules d'ADN.

1.2.3 Les spermatides

La différenciation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes est appelée la spermiogenèse. Chez l'homme, elle dure environ 23 jours, et peut être divisée en 8 étapes (figure I.3).

Les spermatides, localisées près du centre du tube séminifère, sont de petites cellules de 6 à 7 μm de diamètre divisées en trois classes :

i/ les spermatides rondes (étapes 1-2), qui possèdent un noyau rond avec une chromatine pâle et homogène;

ii/ les spermatides en élongation (étapes 3-4-5), dont le noyau s'allonge et dont la chromatine devient plus sombre;

iii/ les spermatides en condensation (étapes 6-7-8), dont le noyau est très allongé, avec une partie caudale globulaire et une partie antérieure saillante, et dont la chromatine est sombre et condensée.

La maturation consiste en :

i/ une réorganisation nucléaire, avec élongation et compaction importante du noyau. Cette étape cruciale modifie globalement la structure du génome. Elle sera détaillée plus loin;

ii/ une élimination de la majeure partie du cytoplasme via les corps résiduels;

iii/ la mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi;

iv/ l'assemblage des structures du flagelle.

La spermiogenèse aboutit à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ceux-ci subiront une dernière maturation dans l'épididyme, puis dans les voies génitales féminines, de manière à acquérir leur pouvoir fécondant.

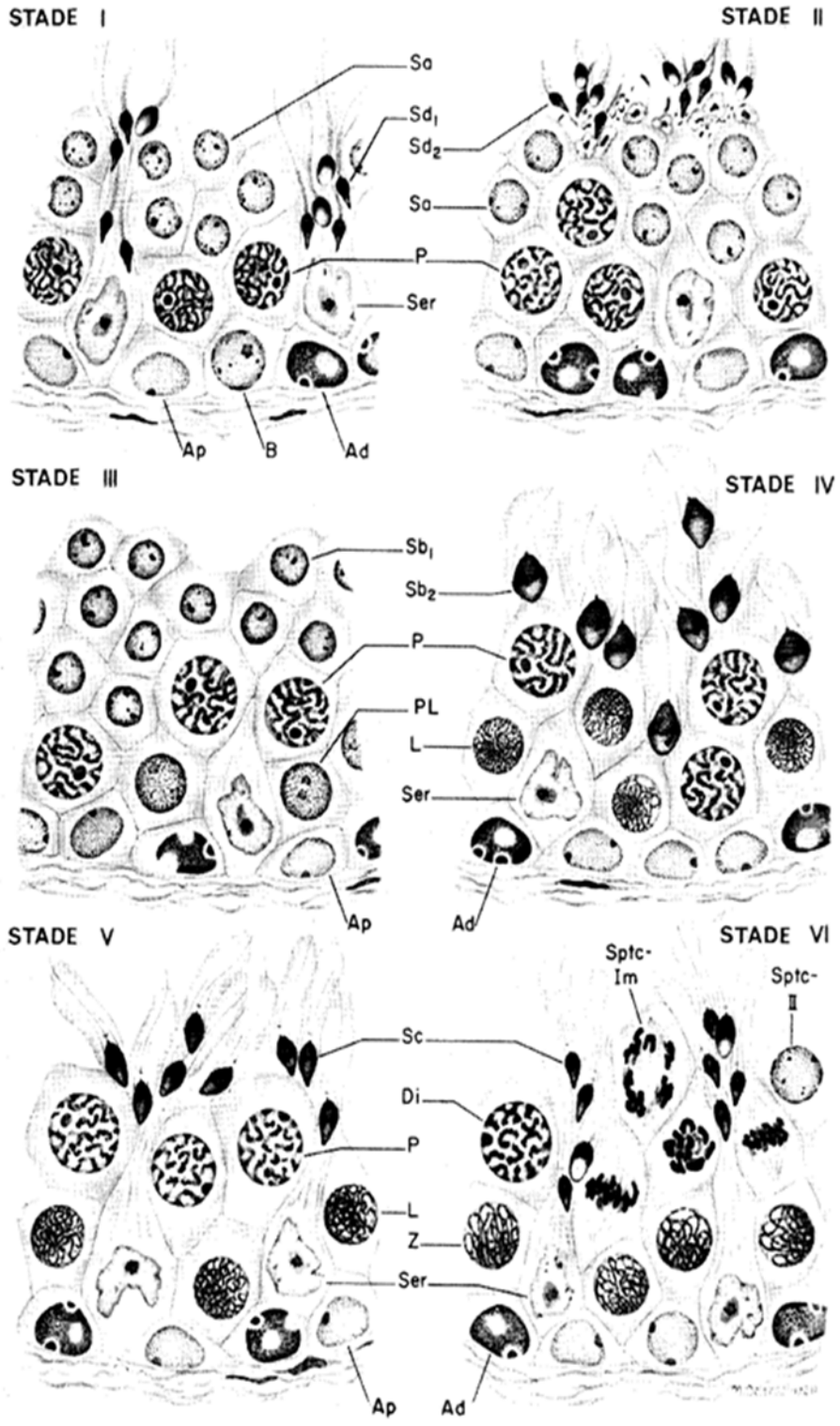

Figure I. 5 : les associations cellulaires identifiées dans les tubes séminifères humains
(d'après Clermont, 1963)

1.3 Cinétique de la spermatogenèse

La production des spermatozoïdes est continue à partir de la puberté grâce au renouvellement des spermatogonies souches Ad et Ap par mitoses. Chez l'homme, les spermatogonies Ap un peu plus différenciées donneraient naissance aux cellules souches de renouvellement ou spermatogonies B, lesquelles entameraient leur différenciation.

La spermatogenèse humaine dure 74 jours. Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de différenciation d'une génération de cellules germinales (depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde) (figure I.3). Chacune des étapes du cycle spermatogénétique a une durée constante (tableau I.1)

Tableau I.1 : durée de vie moyenne des cellules germinales humaines

Cellule germinale	Durée de vie moyenne (jours)
Spermatogonie B	16
Spermatocyte primaire	23
dont pachytène	16
Spermatocyte secondaire	1
Spermatides	23

En réalité, à un niveau donné du tube séminifère, les spermatogonies B entrent dans un cycle de spermatogenèse de manière discontinue. Chez l'homme, le départ d'une nouvelle lignée est déclenché tous les 16 jours : ceci constitue le cycle de l'épithélium séminal et explique l'association préférentielle de certaines cellules entre elles à un stade donné. Ainsi, on distingue 6 associations cellulaires possibles (ou stades) au cours de la spermatogenèse humaine (figure I.5).

Les spermatogonies de même génération sont reliées par des ponts cytoplasmiques qui persistent entre les cellules germinales de même génération jusqu'à la fin de la spermiogenèse. Ces groupes de cellules effectuent donc leur spermatogenèse de manière synchrone. Chez l'homme, la paroi d'un tube séminifère

présente trois ou quatre groupes de cellules de génération différente : une section de tubes correspond donc à plusieurs territoires d'évolution asynchrone.

1.4 Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire

D'une manière générale, les deux fonctions testiculaires, endocrine (production d'androgènes) et exocrine (spermatogenèse), sont sous le contrôle d'hormones synthétisées à l'étage hypothalamique, hypophysaire et testiculaire (Amory and Bremner 2001; Benahmed and Mauduit 1999; Holdcraft and Braun 2004; Huhtaniemi 2003; Huhtaniemi and Bartke 2001; McLachlan et al. 2002; Plant and Marshall 2001; Themmen and Huhtaniemi 2000; Walker and Cheng 2005).

En réponse à la sécrétion pulsatile de GnRH (Gonadotropin releasing hormone) par l'hypothalamus, l'ante-hypophyse sécrète les gonadotrophines hypophysaires, FSH (Follicle stimulating hormone) et LH (Luteinizing hormone).

La LH est l'hormone qui contrôle la fonction endocrine du testicule en agissant sur ses récepteurs, situés à la surface des cellules de Leydig. Elle stimule la production de testostérone par ces cellules.

La FSH et la testostérone sont les deux hormones clés dans le contrôle de la spermatogenèse. Elles agissent via les cellules de Sertoli, qui possèdent les récepteurs de la FSH à leur surface et ceux de la testostérone dans leur noyau. La FSH contrôle la prolifération des cellules de Sertoli pendant la période néonatale et pré-pubertaire. Elle régule la sécrétion de nombreux facteurs synthétisés par les cellules de Sertoli qui jouent un rôle important dans la spermatogenèse (McLean et al. 2002; Sadate-Ngatchou et al. 2004). Le rôle de la FSH sur l'activité régulatrice des cellules de Sertoli est décrit de manière plus détaillée dans le chapitre 1.5 qui suit.

La testostérone, produite par les cellules de Leydig sous l'action de la LH, est indispensable à l'initiation et au déroulement de la spermatogenèse, qu'elle stimule et qu'elle maintient par une action paracrine. Ses récepteurs sont situés sur les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules myoides péri-

tubulaires, dont elle régule les fonctions Elle exerce également un rétro-contrôle négatif sur les sécrétions des gonadotrophines (en particulier la LH), et de la GnRH.

Enfin, les cellules de Sertoli synthétisent l'inhibine, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH.

1.5 Cellules de Sertoli et régulation endocrine et paracrine de la spermatogenèse

Les cellules de Sertoli jouent un rôle clé, non seulement structural et architectural au niveau du testicule, mais aussi nourricier et régulateur pour les cellules germinales en différenciation (Czyba and Montella 1993; Dadoune and Demoulin 1991; Griswold 1998; Mauduit 1999; Mruk and Cheng 2004; Sharpe et al. 2003a).

Elles apparaissent très tôt au cours de la vie embryonnaire où elles se multiplient et jouent un rôle crucial dans l'organisation architecturale du testicule. Lors de la période néonatale et pré-pubertaire, elles prolifèrent et jouent un rôle dans l'initiation de la spermatogenèse. Enfin, leurs caractéristiques changent dans le testicule adulte où elles régulent le cycle spermatogénétique et la production continue des spermatozoïdes.

1.5.1 Période embryonnaire et foetale

Les gonades sont d'origine mésodermique et se différencient selon une chronologie précise qui passe par une phase initiale identique dans les deux sexes (gonade indifférenciée) avant l'établissement du dimorphisme sexuel.

.1.5.1.1 Origine des cellules germinales

Les cellules germinales du testicule sont issues des cellules germinales primordiales (PGC) (ou gonocytes primordiaux). Les PGC naissent à partir d'une sous-population de cellules souches embryonnaires dans l'épiblaste proximal proche de l'ectoderme extra-embryonnaire, à un stade précoce du développement embryonnaire. Elles prolifèrent et migrent ensuite jusqu'au territoire occupé par la future gonade qu'elles atteignent à la sixième semaine de développement chez l'homme (Machev et al. 2004; McLaren 2000).

La distinction sexuelle entre cellules germinales mâles et femelles se manifeste plus tardivement. En effet, l'entrée en méiose des cellules germinales débute à des moments très différents chez les individus mâles et femelles. Chez les individus femelles, les PGC entrent en prophase de première division méiotique au cours de la gestation et se bloquent au stade diplotène de première division méiotique. Dans la gonade mâle en revanche, les PGC répondent à des facteurs diffusés par les cellules somatiques environnantes et conservent leur activité mitotique. Très récemment, il a été montré que l'acide rétinoïque, produit par le mésonéphros dans les embryons des deux sexes, induirait l'expression de Stra8 (Stimulated by Retinoic Acid Gene 8) dans l'ovaire, qui serait responsable de l'entrée en méiose des cellules germinales et de l'initiation de l'ovogenèse. Dans la gonade mâle, l'acide rétinoïque serait dégradé, ce qui retarderait l'expression de Stra8, induisant un retard à l'entrée en méiose (Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006). Dans la gonade mâle foetale, les cellules germinales mâles entrent donc en phase de quiescence, au stade G0/G1 du cycle cellulaire, et prennent l'appellation de prospermatogonies. L'arrêt du processus mitotique est levé à la naissance et les prospermatogonies se différencient en cellules souches spermatogoniales, qui se divisent de façon asymétrique. Ces cellules souches produisent d'une part des cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler, et d'autre part des cellules qui entrent dans le processus méiotique (de Rooij 2001).

.1.5.1.2 Rôle des cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans la mise en place de la gonade et dans la différenciation masculine du fœtus au cours de la vie intra-utérine. Lors de la gestation en effet, les cellules de Sertoli sont les premières cellules à se différencier au sein de la gonade indifférenciée, ce qui permet notamment la mise en place des cordons testiculaires, la prévention de l'entrée en méiose des cellules germinales, ainsi que la différenciation des cellules de Leydig (Brennan and Capel 2004; Koopman 2001, 2005; Sharpe 2006; Swain and Lovell-Badge 1999).

Une première ébauche de la gonade se développe à la surface du mésonéphros de l'embryon, dont la paroi s'épaissit pour former la crête génitale. Chez la plupart des mammifères, cette première ébauche est qualifiée de bi-potentielle, car elle possède la propriété d'évoluer en testicule ou en ovaire selon les signaux génétiques qu'elle reçoit. En présence du facteur TDF (testis determining factor), produit d'expression du gène SRY localisé sur le bras court du chromosome Y, les cellules somatiques de la crête génitale prolifèrent et se différencient en cellules de Sertoli. Il s'agit du premier événement au cours de la différenciation de la gonade en testicule. Les cellules de Sertoli immatures se polarisent, forment des agrégats entre elles et entourent progressivement les PGC pour former les cordons testiculaires, ou cordons séminifères, qui sont les précurseurs des tubes séminifères du testicule adulte, et qui isolent les PGC du compartiment interstitiel.

Les cellules de Sertoli synthétisent des facteurs locaux qui d'une part inhibent l'entrée en méiose des PGC, et d'autre part entraînent la migration de cellules mésenchymateuses qui se différencieront en cellules péritubulaires ou en cellules de Leydig (McLaren 2000). Parmi les facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli, Fgf9 (fibroblast growth factor 9), qui est une molécule de signalisation impliquée dans de nombreux processus du développement, pourrait jouer un rôle clef. En effet, Fgf9 serait impliqué dans la prolifération et la migration des cellules du mésenchyme au sein du testicule en formation, ainsi que dans la différenciation des cellules de Sertoli par un processus de régulation autocrine (Colvin et al. 2001). D'autres facteurs de type IGF, synthétisés par les cellules de Sertoli, joueraient un rôle crucial dans la différenciation Leydigienne.

Les cellules de Leydig fœtales commencent à produire la testostérone, ce qui entraîne le développement des canaux de Wolff en épididymes, canaux déférents et vésicules séminales. Elles sont également impliquées dans le processus de descente testiculaire dans le scrotum, en synthétisant le facteur Insl3 (insuline-like factor 3) (Toppari and Kaleva 1999).

Par ailleurs, les cellules de Sertoli synthétisent l'AMH (hormone anti-Müllérienne) qui entraîne la régression des canaux de Müller (qui sont à l'origine des trompes, de l'utérus et de la partie supérieure du vagin dans l'embryon femelle). L'AMH est également délétère pour l'entrée en méiose des cellules germinales (Josso et al. 1998).

Ainsi, la différenciation des cellules de Sertoli au sein de la gonade en formation semble être l'événement initial responsable de la différenciation des autres types cellulaires et de l'organisation cellulaire ultérieure du testicule.

1.5.2 Période néonatale et pré-pubertaire

La période néonatale est caractérisée par la croissance importante des cordons testiculaires, la prolifération des cellules de Sertoli, et par l'initiation de la spermatogenèse (différenciation des prospermatogonies en spermatogonies et entrée en méiose de certaines d'entre elles).

La prolifération des cellules de Sertoli est une étape cruciale, puisque de leur nombre va dépendre le volume testiculaire, ainsi que le nombre de gamètes synthétisés dans le testicule adulte (Orth et al. 1988; Sharpe 1994). Elle est contrôlée par la FSH ainsi que par les hormones thyroïdiennes, qui agissent via des récepteurs spécifiques localisés sur les cellules de Sertoli (Holsberger and Cooke 2005; McLachlan et al. 2002; Walker and Cheng 2005). La FSH stimule la prolifération Sertolienne, alors que les hormones thyroïdiennes ont un rôle inhibiteur. Les oestrogènes pourraient également stimuler la prolifération des cellules de Sertoli (O'Donnell et al. 2001). La durée de prolifération Sertolienne est variable selon les

espèces, mais lorsque ce processus s'arrête, le stock de cellules de Sertoli adulte est définitivement constitué. Chez l'homme par exemple, les cellules de Sertoli prolifèrent pendant la période néonatale et péri-pubertaire (Sharpe et al. 2003a).

Progressivement, la prolifération des cellules de Sertoli est ralentie, et celles-ci commencent un processus de maturation morphologique et fonctionnel (Sharpe et al. 2003a). Leur noyau s'élargit et le nucléole devient plus visible. Elles s'allongent et émettent des ramifications qui vont former des zones de jonction avec les cellules germinales. Les cellules de Sertoli adjacentes mettent en place des connexions étroites entre elles, pour former un compartiment adluminal à l'intérieur duquel les processus méiotiques et post-méiotiques prendront place. Ce compartiment isole les cellules germinales de la circulation sanguine, en formant la barrière hémato-testiculaire. Celle-ci est essentiellement constituée des jonctions serrées situées entre et à la base des cellules de Sertoli. Elle sépare dans un compartiment basal les cellules germinales pré-méiotiques (spermatogonies et spermatocytes pré-leptotènes) ayant accès aux nutriments sériques, des cellules méiotiques (spermatocytes primaires et secondaires) et post-méiotiques (spermatides) à l'intérieur du compartiment apical. Ces dernières baignent dans les sécrétions des cellules de Sertoli et sont donc strictement dépendantes de ces sécrétions pour leur métabolisme et leur fonctionnement. La cellule de Sertoli acquiert également un certain nombre de caractéristiques qui marque son entrée dans la période adulte, comme l'acquisition des récepteurs aux androgènes, la perte de l'expression du gène de l'AMH ou l'expression de gènes inhibant la prolifération cellulaire. La maturation des cellules de Sertoli serait induite par la FSH, la testostérone et les hormones thyroïdiennes (Sharpe 1994; Sharpe et al. 2003a).

Les interactions entre cellules de Sertoli et cellules germinales pourraient jouer un rôle fondamental dans la survie des cellules germinales et leur entrée en mitose ou en méiose. Par exemple, les cellules de Sertoli synthétisent le facteur SCF (Stem Cell Factor) qui agit sur un récepteur c-kit localisé au niveau des cellules germinales, et qui contrôlerait la prolifération et l'apoptose des cellules germinales (Orth et al. 2000; Rossi et al. 2000; Yan et al. 2000). La FSH joue un rôle clé dans la survie des spermatogonies, car elle stimule la

production de SCF et d'un autre facteur de survie des spermatogonies, le facteur FGF2 (Mullaney and Skinner 1992; Yan et al. 2000). Un autre facteur synthétisé par les cellules de Sertoli, appelé GDNF (Glial derived neurotrophic factor), semble jouer un rôle important dans la régulation de l'évolution des spermatogonies vers la mitose ou la méiose (Meng et al. 2000).

1.5.3 Période post-pubertaire

Au sein de l'épithélium séminifère du testicule adulte, la cellule de Sertoli apparaît comme une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de cet épithélium, depuis la membrane basale jusqu'à la lumière du tube. En microscopie optique, seul le noyau cellulaire est visible, et la membrane cytoplasmique est indiscernable. Le noyau, grossièrement triangulaire et à contours irréguliers, présente un nucléole bien visible. Il occupe toujours une position basale à l'intérieur de l'épithélium, et il est séparé de la membrane basale des tubes séminifères par une couche de spermatogonies. Au sein de cet épithélium, les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans le développement des cellules germinales et dans la régulation de la spermatogenèse. Ce sont elles qui reçoivent les messages hormonaux (FSH et testostérone) et les signaux locaux (paracrines ou autocrines), ce qui leur permet de sécréter d'autres facteurs qui moduleront leurs propres fonctions, mais aussi celles des cellules germinales et des cellules de Leydig (Walker and Cheng 2005).

.1.5.3.1 Rôle des cellules de Sertoli

Il existe une interconnexion structurale et fonctionnelle très étroite entre les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale (Dupaix et al. 1996; Griswold 1998; Mauduit 1999; Mruk and Cheng 2004; Skinner 2005). Les cellules de Sertoli influencent la différenciation, la prolifération, l'apoptose et l'activité physiologique des cellules germinales. Une même cellule de Sertoli communique avec plusieurs cellules

germinales à différents stades de développement et doit donc pouvoir répondre à des besoins cellulaires différents selon l'étape de la spermatogenèse (mitose, méiose, spermiogenèse).

Les cellules de Sertoli ont plusieurs fonctions au sein de l'épithélium séminifère :

i/ le maintien de la structure des tubes séminifères ;

ii/ la compartimentalisation de l'épithélium séminifère par l'intermédiaire de la barrière hémato-testiculaire. Celle-ci permet notamment d'empêcher les cellules immunitaires de l'organisme d'entrer en contact avec les antigènes présents sur les cellules post-méiotiques, et joue donc un rôle de barrière immunologique ;

iii/ la translocation des cellules germinales en cours de spermatogenèse, du compartiment basal au compartiment apical. Les cellules de Sertoli sécrètent notamment des protéases et des facteurs de croissance, qui jouent un rôle clef dans la migration des cellules germinales vers le pôle apical de l'épithélium séminifère (Le Magueresse-Battistoni et al. 1998; Longin et al. 2001; Mruk and Cheng 2004; Xia et al. 2005). Les cellules germinales pourraient contrôler leur propre migration en régulant la synthèse des protéases par les cellules de Sertoli (Longin et al. 2001) ;

iv/ la spermiation, c'est-à-dire la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères;

v/ la phagocytose des cellules germinales dégénérescentes et des corps résiduels ;

vi/ la sécrétion du fluide des tubes séminifères et l'apport de substrats énergétiques nécessaires à la survie des cellules germinales, comme le lactate;

vii/ la production de facteurs régulateurs de la spermatogenèse, parmi lesquels l'inhibine (qui inhibe la sécrétion de FSH), l'activine (qui stimule la production de FSH), l'ABP (Androgen binding protein, qui stimule l'épithélium séminifère et assure le transport des androgènes), ainsi que de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, comme le GDNF, le SCF, l'IL1 et l'IL6 (Interleukines 1 et 6), ou le TGFβ (Transforming growth factor β) . Ces facteurs participent au contrôle de la spermatogenèse, par

l'intermédiaire de récepteurs spécifiques exprimés par les cellules germinales. Cependant, la plupart de ces facteurs ont été étudiés sur des cellules de Sertoli cultivées *in vitro* et leur rôle physiologique reste donc à prouver *in vivo*.

.1.5.3.2 Régulation endocrine et paracrine des sécrétions Sertoliennes

L'activité des cellules de Sertoli est régulée par plusieurs hormones : la FSH, la testostérone, mais également les hormones thyroïdiennes et les oestrogènes (Carreau 2003; Hess 2003; Holsberger and Cooke 2005; Huhtaniemi 2003; O'Donnell et al. 2001).

La FSH régule l'activité des cellules de Sertoli, en stimulant ou en inhibant la synthèse de facteurs locaux, et contribue ainsi indirectement au maintien de la spermatogenèse sur le plan qualitatif et quantitatif. Elle serait impliquée dans les stades précoces de la spermatogenèse, en particulier lors de la prolifération des spermatogonies et lors de la méiose. La FSH, contrairement à la testostérone, ne serait pas indispensable au maintien de la spermatogenèse, puisque les études réalisées chez des souris invalidées pour la FSH ou son récepteur, et chez les patients porteurs d'une mutation inactivant le récepteur de la FSH montrent qu'une spermatogenèse peut être conservée (Huhtaniemi 2003; Themmen and Huhtaniemi 2000).

La testostérone stimule la spermatogenèse via son action sur les cellules de Sertoli, et a également une action trophique sur ces dernières. De nombreux facteurs sont sécrétés par les cellules de Sertoli en réponse à l'action de la testostérone (Denolet et al. 2006; Griswold 1998). Il est maintenant admis que des taux relativement modérés de testostérone intra-testiculaire sont suffisants pour maintenir une spermatogenèse (Zhang et al. 2003). Récemment, il a été montré que les récepteurs aux androgènes situés sur les cellules de Sertoli jouent un rôle clé au cours des étapes méiotiques et post-méiotiques de la spermatogenèse et qu'ils sont indispensables à la stéroïdogenèse mâle (Chang et al. 2004; De Gendt et al. 2004).

Par ailleurs, la testostérone et la FSH pourraient jouer un rôle dans l'assemblage/déassemblage des jonctions entre les cellules de Sertoli, et donc participer au processus de migration des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère et à la spermiation (Denolet et al. 2006; O'Donnell et al. 2000; Sluka et al. 2006).

Les sécrétions des cellules de Sertoli sont également régulées par les cellules de la lignée germinale, qui synthétisent des facteurs paracrines destinés aux cellules de Sertoli. Le TNFα (tumor necrosis factor α) par exemple, sécrété par les spermatocytes au stade pachytène et les spermatides rondes, inhibe la production sertolienne d'inhibine, et stimule celle de lactate et de transferrine (Benahmed 1997).
Les liens entre les facteurs hormonaux et les facteurs locaux impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse sont extrêmement complexes. De nombreux facteurs de croissance sont sous la dépendance d'une régulation hormonale et inversement. Par exemple, la synthèse du FGF2 est stimulée par la FSH (Mullaney and Skinner 1992), alors que le TNFα exerce un effet antagoniste sur la FSH (Benahmed 1997).

Ainsi, les cellules de Sertoli exercent un rôle important sur l'initiation et le maintien de la spermatogenèse, en recevant les signaux locaux et hormonaux. En retour, les cellules germinales contrôlent l'activité des cellules de Sertoli et leur réponse aux hormones et facteurs paracrines. Enfin, il existe une interaction très forte entre les tubes séminifères et le compartiment interstitiel, notamment entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig.

2. Anomalies de la spermatogenèse

La spermatogenèse peut être quantitativement anormale, ce qui aboutit à la production d'un nombre réduit de gamètes, voire à l'absence de production de spermatozoïdes. Les anomalies de la spermatogenèse peuvent être associées à des anomalies plus globales affectant le testicule, telles que les cancers testiculaires et le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS).

2.1 Les anomalies quantitatives de la spermatogenèse

Les facteurs principalement retrouvés dans les causes d'atteinte de la spermatogenèse sont les suivants. Ils peuvent être d'origine génétique ou non (Benahmed and Mauduit 1999; Diemer and Desjardins 1998).

i/ les anomalies de nombre des chromosomes, la plus fréquente étant le syndrome de Klinefelter (caryotype 47, XXY) ;

ii/ les anomalies de structure des chromosomes, affectant les autosomes ou les chromosomes sexuels. Les anomalies le plus fréquemment retrouvées chez les hommes infertiles sont les translocations chromosomiques équilibrées. Parmi elles, les translocations robertsoniennes, qui impliquent les chromosomes acrocentriques, occupent une place prépondérante ;

iii/ les anomalies structurales du chromosome Y. L'implication du chromosome Y dans les infertilités sévères d'origine non-obstructive sera discutée en détail dans le chapitre 3 ;

iv/ les pathologies urologiques. Parmi elles, on peut citer la cryptorchidie qui correspond à l'absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum, par interruption de la migration testiculaire. Le siège de la cryptorchidie peut être abdominal, inguinal, ou pré-scrotal. L'ectopie testiculaire, beaucoup plus rare, est également associée à des atteintes sévères de la spermatogenèse. Elle correspond également à l'absence de l'un ou des deux testicules dans le scrotum, mais celui (ceux)-ci se trouve(n)t dans différentes positions en

dehors du trajet normal de descente. Enfin, une torsion testiculaire, une varicocèle ou une orchite infectieuse peuvent également entraîner une atteinte de la spermatogenèse;

v/ le tabac ;

vi/ les agents médicamenteux, qui peuvent agir directement sur la spermatogenèse ou sur son contrôle neuro-endocrinien (chimiothérapie, radiothérapie, cyclosporine A, ….) ;

vii/ les agents environnementaux, comme l'exposition à la chaleur, aux solvants, aux métaux lourds, aux pesticides… ;

viii/ les pathologies endocriniennes, comme le syndrome de Kallmann (absence de FSH et de testostérone par défaut de migration des neurones à GnRH dans l'hypothalamus au cours du développement cérébral *in utero*).

Les troubles quantitatifs de la spermatogenèse peuvent être classés en plusieurs catégories histologiques selon la sévérité de l'atteinte au sein des tubes séminifères :

i/ l'hypospermatogenèse, qui correspond à une spermatogenèse conservée, mais avec une raréfaction des cellules germinales et des spermatozoïdes produits au sein des tubes séminifères;

ii/ le blocage de la spermatogenèse, qui correspond à un arrêt de la spermatogenèse en cours de spermiogenèse (arrêt au stade de spermatides), en cours de méiose (arrêt au stade de spermatocytes), ou avant la méiose (arrêt au stade de spermatogonies) ;

iii/ le syndrome des cellules de Sertoli isolées (SCO : Sertoli Cell Only Syndrome), qui correspond à une absence totale de cellules germinales au sein des tubes séminifères.

Cependant, l'altération de la spermatogenèse est le plus souvent variable entre les tubes séminifères et plusieurs tableaux histologiques différents peuvent s'observer sur une même coupe histologique de biopsie testiculaire.

2.2 Les cancers testiculaires

Les cancers du testicule constituent un groupe très hétérogène de tumeurs, qui peuvent atteindre les cellules de la lignée germinale ou les cellules somatiques du testicule (Chartier 2000; Daly-Schveitzer 1998; Soria and Spano 1999).

2.2.1 Epidémiologie et étiologie

Les tumeurs du testicule sont des maladies rares qui représentent environ 1% des cancers masculins. Cependant, elles constituent le cancer le plus fréquent de l'homme jeune, entre 20 et 35 ans. Un type particulier de cancer du testicule, le séminome spermatocytaire, touche préférentiellement l'homme de plus de 40 ans. Enfin, certaines formes de cancers du testicule, comme les tumeurs vitellines ou le tératome mature, peuvent apparaître pendant la petite enfance.

Leur étiologie est encore controversée, mais certains facteurs de risque semblent être associés à la survenue d'un cancer du testicule. Le seul facteur de risque parfaitement identifié est le testicule cryptorchide. Douze pour cent des cancers testiculaires surviennent sur un antécédent de cryptorchidie, même corrigée. L'ectopie testiculaire pourrait également être impliquée dans la survenue des cancers testiculaires. Les cancers du testicule semblent également être associés aux dysgénésies gonadiques ou à une atrophie testiculaire après orchite ourlienne, traumatisme, …. Enfin, il semblerait que des facteurs génétiques puissent influencer l'apparition de ces cancers. Le terrain génétique est suggéré par l'existence de cas familiaux de tumeurs testiculaires et par l'augmentation du risque de développer une tumeur controlatérale chez les patients atteints d'un cancer du testicule.

2.2.2 Classification des tumeurs testiculaires

Les cancers du testicule sont divisés en sept types de tumeurs selon l'OMS (Tableau II.1)

Tableau II.1 : classification anatomo-pathologique des tumeurs testiculaires
(selon l'OMS, 1997).

- **Tumeurs germinales (90 %)**
  - séminomateuses (35 %)
    - séminome typique (30 %)
    - séminome spermatocytaire(5 %)
  - non séminomateuses (65 %)
    - carcinome embryonnaire (20 %)
    - choriocarcinome (< 1%)
    - tératomes mature et immature (5 %)
    - tumeur du sac vitellin (< 1 %)
    - tumeur mixte (40 %)
- **Tumeurs non germinales (10 %)**
  Tumeurs des cordons sexuels ou tumeurs du stroma gonadique :
  - tumeur à cellules de Leydig
  - tumeur à cellules de Sertoli
  - tumeur de la granulosa
- **Tumeurs des annexes testiculaires et des tissus de soutien**
- **Tumeurs secondaires, métastases**
- **Tumeurs hématopoïétiques, lymphomes**
- **Tumeurs carcinoïdes**
- **Tumeurs du rete testis**

Les tumeurs développées à partir des cellules germinales (tumeurs germinales) constituent la grande majorité des cancers du testicule et sont classées en deux grands groupes présentant une évolution différente :

i/ les tumeurs séminomateuses, qui sont développées à partir des cellules germinales des tubes séminifères ;

ii/ les tumeurs non séminomateuses, qui dérivent des cellules primordiales totipotentes. Celles-ci peuvent être de nature embryonnaire (carcinome embryonnaire, tératome mature ou immature) ou extra-embryonnaire (tumeur vitelline, choriocarcinome).

Cependant, ces différents types tumoraux sont souvent associés et on parle alors de tumeur combinée, ou de tumeur germinale maligne complexe.

2.2.3 Mécanisme d'apparition des tumeurs germinales du testicule

Chez l'adulte, il est désormais admis que le précurseur commun de la plupart des tumeurs germinales du testicule est le carcinome *in situ* (CIS) (Dieckmann and Skakkebaek 1999; Oosterhuis and Looijenga 2005). Il s'agit de cellules germinales atypiques pré-cancéreuses situées à la base des tubes séminifères, à la place des spermatogonies, mais leur diamètre cellulaire est plus grand. Leur cytoplasme, très clair, entoure un noyau irrégulier de grande taille et hyperchromatique, qui renferme plusieurs nucléoles. Les tubes séminifères porteurs de CIS sont souvent dépourvus de cellules de la spermatogenèse et les cellules de Sertoli sont repoussées vers la lumière des tubes. Les CIS sont souvent retrouvées dans les tissus avoisinant les tumeurs de patients atteints de cancers du testicule, ou dans les populations à risque de tumeurs testiculaires (cryptorchidie, atrophie testiculaire, …). De plus, la moitié des patients porteurs de CIS développerait une tumeur germinale dans les cinq ans, contrairement aux patients dépourvus de CIS (Dieckmann and Skakkebaek 1999).

Les cellules CIS dérivent des cellules germinales primordiales ou de gonocytes ayant échappé au processus de différenciation normal lors de l'embryogenèse, et qui n'ont plus la capacité à se transformer en spermatogonies au cours du développement embryonnaire (Almstrup et al. 2006; Skakkebaek et al. 1987). Après la naissance, les cellules pré-tumorales resteraient à l'intérieur des tubes séminifères dans un état quiescent. A la puberté, l'augmentation du taux des hormones sexuelles entraînerait une reprise de l'activité proliférative de ces cellules, qui remplaceraient peu à peu les cellules de la spermatogenèse à l'intérieur des tubes séminifères. La transition vers une tumeur germinale invasive se ferait dans l'environnement hormonal particulier de la puberté, mais d'autres facteurs encore inconnus sont probablement nécessaires (Dieckmann and Skakkebaek 1999).

2.3 Le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)

2.3.1 Définition

Le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS : testicular dysgenesis syndrome) est une hypothèse publiée en 2001 par l'équipe de Skakkebaeck selon laquelle différentes anomalies du système reproducteur masculin en augmentation constante ces dernières décennies, seraient les manifestations d'un même syndrome qui affecterait la différenciation testiculaire pré-natale (Skakkebaek et al. 2001). Les symptômes du TDS chez l'homme associent la cryptorchidie, l'hypospade (fusion incomplète des canaux urétraux qui forment le pénis, entraînant un abouchement anormal du méat urétral à la surface du pénis), les troubles de la spermatogenèse, et le cancer testiculaire. D'autres signes peuvent être associé, comme des micro-calcifications intra-testiculaires, un syndrome des cellules de Sertoli isolées, ou la présence de tubes séminifères comportant des cellules de Sertoli non différenciées (Skakkebaek et al. 2003; Skakkebaek et al. 2006). Ce syndrome a été évoqué à partir de données épidémiologiques, cliniques et expérimentales, qui suggèrent une interconnexion étroite entre ces différents symptômes. Ainsi, les données épidémiologiques actuelles montrent dans les pays industrialisés, une augmentation croissante au cours des 50 dernières années des cas de cryptorchidie, d'hypospades et des cancers testiculaires, associés à une diminution des paramètres spermatiques (Aitken et al. 2004; Bay et al. 2006; Skakkebaek et al. 2006).

2.3.2 Aspects cliniques

Le TDS peut revêtir différentes formes cliniques (Skakkebaek et al. 2003).

La manifestation la plus fréquente du TDS est une atteinte de la spermatogenèse, qui peut être isolée. Dans les cas plus sévères, l'atteinte de la spermatogenèse peut être associée à une anomalie de la descente testiculaire et à un risque augmenté de cancer testiculaire à l'age adulte.

Dans la forme la plus sévère, moins fréquente, on retrouve ces signes associés à une cryptorchidie et un hypospade, voire une inversion sexuelle.

Ainsi, les patients atteints d'un trouble du développement testiculaire (cryptorchidie, oligozoospermie associée à une hypotrophie ou une atrophie testiculaire, …) sont à risque d'être porteur au niveau testiculaire de CIS, qui peuvent évoluer en cancer testiculaire. Il est donc fondamental de pouvoir dépister ces patients le plus précocement possible afin d'éviter un traitement présentant des effets indésirables importants. A l'heure actuelle, une échographie scrotale doit être proposée (Holm et al. 2003), et une biopsie testiculaire peut être envisagée si des micro-calcifications sont détectées (Hoei-Hansen et al. 2005).

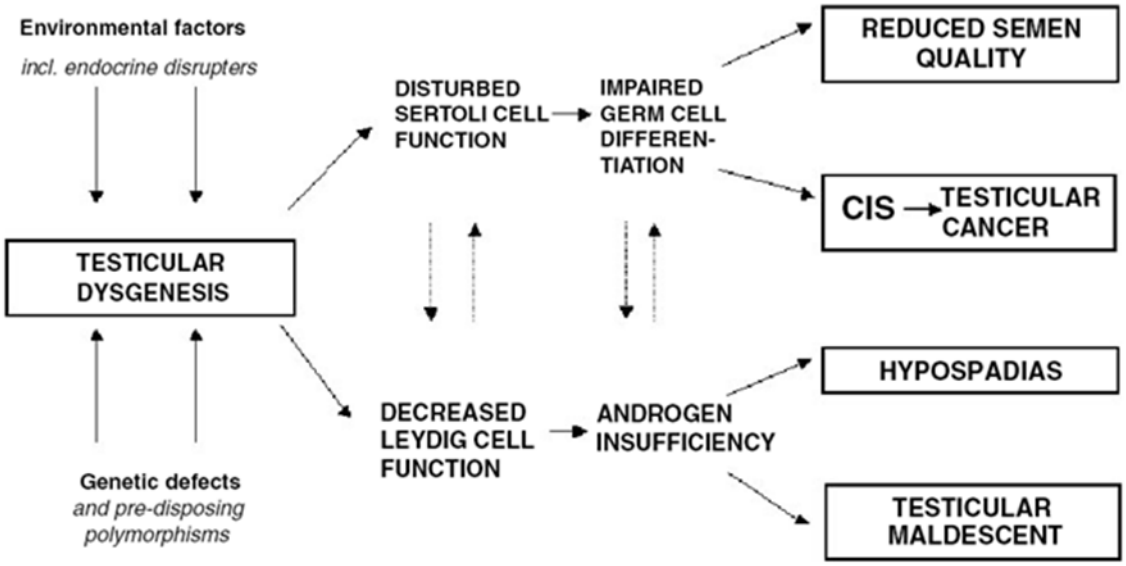

Figure II.1 : représentation schématique de l'étiologie et de la pathogénie des différents symptômes du TDS
(d'après Skakkebaek et al, 2001)

2.3.3 Origine du TDS : l'ante-natal comme hypothèse

Il apparaît probable à l'heure actuelle que le TDS trouve son origine au cours de la gestation (Skakkebaek et al. 2006).

La formation des structures péniennes, urétrales, et gonadiques, s'effectue à différentes étapes du développement embryonnaire ou fœtal. Toute anomalie affectant le mécanisme de mise en place de ces structures aboutira aux différents symptômes du TDS.

Ainsi, tout événement perturbant les stades précoces du développement embryonnaire pourrait affecter la différenciation des cellules de Leydig ou des cellules de Sertoli (figure II.1) (Bay et al. 2006; Skakkebaek et al. 2001). La perturbation de la différenciation des cellules de Sertoli pourrait affecter le développement des cellules germinales, entraînant une atteinte de la spermatogenèse et un risque de développer une tumeur testiculaire à l'age adulte. Les troubles du fonctionnement des cellules de Leydig affecteraient la production de testostérone et d'Insl3, entraînant une malformation génitale (hypospade, cryptorchidie).

Les facteurs à l'origine du TDS pourraient être multiples. L'existence de cas familiaux de cancers testiculaires et de troubles de la reproduction suggère qu'un environnement génétique particulier pourrait jouer un rôle dans l'apparition de ce syndrome (Lutke Holzik et al. 2004; McElreavey and Quintana-Murci 2003). Cependant, dans la majorité des cas, l'étiologie du TDS reste inexpliquée. Actuellement, de plus en plus de données incriminent des facteurs environnementaux, en particulier les perturbateurs endocriniens, dans l'apparition de ce syndrome (Aitken et al. 2006; Skakkebaek et al. 2006).

2.3.4 Rôle des perturbateurs endocriniens

L'augmentation croissante des symptômes du TDS ces 50 dernières années dans les pays industrialisés est concomitante du développement de l'industrie chimique dans ces pays et de la libération dans l'atmosphère de très nombreux agents chimiques, comme les pesticides, les herbicides, les insecticides, les détergents ou

les produits cosmétiques (Aitken et al. 2004). Les perturbateurs endocriniens sont des molécules qui ont un effet œstrogèno-mimétique, anti-œstrogène, ou anti-androgène. De nombreuses données de la littérature orientent vers un rôle délétère de ces différents composants sur la reproduction (Aitken et al. 2006; Anway and Skinner 2006; Skakkebaek et al. 2006).

C'est en 1979 que l'hypothèse d'une action des oestrogènes sur la survenue de tumeurs testiculaires et de cryptorchidies a été évoquée pour la première fois (Henderson et al. 1979). L'action délétère des oestrogéno-mimétiques a été suggérée par l'emploi *in utero* d'un oestrogénique de synthèse, le diethylstilbestrol. Il a en effet été mis en évidence une augmentation des cas de cryptorchidie et d'anomalie du tractus génital chez les fils des femmes ayant consommé ce produit pendant leur grossesse (Giusti et al. 1995; Klip et al. 2002).

Plusieurs hypothèses ont été avancées en ce qui concerne le mécanisme d'action des oestrogéno-mimétiques. Les oestrogènes de synthèse diminueraient l'expression des récepteurs aux oestrogènes, qui jouent un rôle dans le développement testiculaire (Anway and Skinner 2006). Ils pourraient également altérer la spermatogenèse en supprimant la synthèse de FSH par l'hypophyse fœtale pendant la gestation, entraînant la diminution du nombre des cellules de Sertoli dans la gonade en développement. Or ces dernières ne répliquent que très rarement et chacune ne peut permettre la différenciation que d'un nombre limité de cellules germinales. Tout événement entraînant la diminution de leur nombre aura un impact irréversible sur le développement de l'appareil reproducteur masculin. Enfin, ils pourraient également perturber la réponse aux androgènes au niveau fœtal, en agissant sur la fonction Leydigienne, l'expression des récepteurs aux androgènes ou en inhibant l'expression d'Insl3 (Anway and Skinner 2006; Sharpe et al. 2003a).

D'autres données suggèrent que ce soit une anomalie de la balance oestrogène/androgène, qui soit impliquée dans le TDS (Sharpe 2003b). Ainsi, les rats exposés *in utero* à un anti-androgène, le DBP (dibutyl phtalate), reproduisent le TDS observé chez l'homme et développent une cryptorchidie, un hypospade, une infertilité

et des anomalies testiculaires (Fisher et al. 2003). D'autres agents chimiques, comme de nombreux oestrogéno-mimétiques présents dans l'environnement, auraient un effet anti-androgène. C'est le cas de la plupart des pesticides utilisés à l'heure actuelle (Sohoni and Sumpter 1998). Par exemple, l'exploitation des registres de 5 pays européens a permis de montrer une augmentation des cas d'hypospades et de malformations congénitales chez les enfants nés de mères habitant au voisinage de certains sites de stockage de déchets dangereux (Dolk et al. 1998). D'autres études ont mis en évidence un lien entre cryptorchidie, hypospade et l'exposition aux pesticides chez les pères ou les mères des enfants atteints (Garcia-Rodriguez et al. 1996; Pierik et al. 2004; Weidner et al. 1998). Une autre étude a analysé les concentrations sériques de biphényls chez les mères d'hommes jeunes atteints d'un cancer testiculaire et il a été mis en évidence que ces taux étaient plus élevés que chez les témoins (Hardell et al. 2004). Enfin, une diminution de la numération et de la mobilité spermatique a été mise en évidence chez des hommes habitant dans une zone agricole où les pesticides sont largement employés, comparé à une population témoin d'une zone urbaine (Swan et al. 2003a). Les taux de pesticides étaient statistiquement plus élevés chez les patients habitant en zone rurale et dont les paramètres de sperme étaient altérés (Swan et al. 2003b).

Une étude récente suggère un effet trans-générationnel des perturbateurs endocriniens sur le système reproductif, qui serait transmis à travers les cellules germinales mâles par un mécanisme de nature épigénétique (Anway et al. 2005). Anway et collaborateurs ont exposé pendant leur grossesse des rats à un fongicide anti-androgène utilisé par l'industrie viticole, ou à un pesticide. Ils ont mis en évidence un trouble de la spermatogenèse dans la quasi-totalité de la descendance, et ce phénotype a été retrouvé chez les 3 générations suivantes, non exposées *in utero*. En étudiant les fréquences de survenue de ce phénotype et le profil de méthylation de l'ADN au niveau germinal, ils ont conclu que le mécanisme de cet effet trans-générationnel était d'ordre épigénétique, puisqu'il passait par des modifications du profil de méthylation de l'ADN dans les cellules germinales. Ces travaux nécessitent cependant des confirmations expérimentales et une meilleure caractérisation des profils de méthylation de l'ADN.

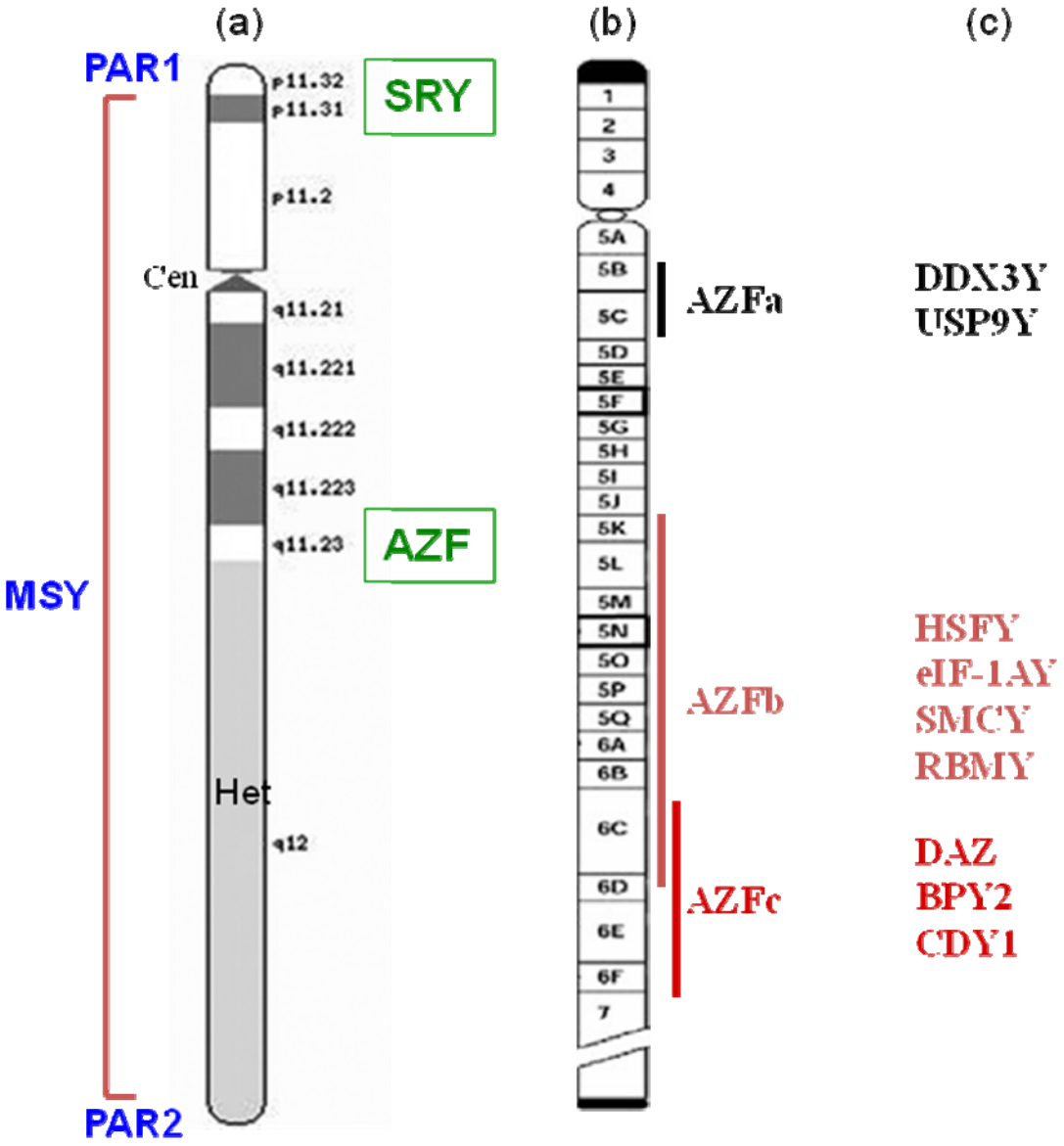

Figure III.1 : cartographie du chromosome Y humain
(adapté du serveur Ensembl (http://www.ensembl.org) (a) et de Bettio et al, 2006 (b)).

(a) Le centromère (Cen) sépare le bras court (p) du bras long (q). La région MSY (Male specific region of the Y) est entourée par les deux régions PAR 1 et 2 (pseudo-autosomal region) qui forment des crossing-over avec les régions équivalentes sur le chromosome X. MSY renferme une portion d'euchromatine qui porte en Yp le gène SRY (sex determining region of the Y), et en Yq la région AZF (Azoospermia factor). Au niveau du bras long, elle comporte une grande portion d'hétérochromatine (Het) de taille variable selon les individus.

(b) Selon la carte génétique de Vollrath et collaborateurs (Vollrath et al, 1992), le chromosome Y est subdivisé en 43 intervalles, numérotés de 1 à 7, suivis d'une lettre de l'alphabet. Les régions AZF sont localisées dans les intervalles 5-6. L'hétérochromatine correspond à l'intervalle 7.

(c) Principaux gènes candidats pour le contrôle de la spermatogenèse dans les régions AZF.

3. Génome somatique et spermatogenèse : le chromosome Y

3.1 Le chromosome Y humain

Le chromosome Y est un petit chromosome d'environ 60 Mb qui ne représente que 2 à 3 % du génome humain. Il est constitué d'une grande portion d'hétérochromatine et ne comporte donc que peu de gènes. Pendant de nombreuses années, il a été considéré comme un désert génétique. Il est maintenant admis qu'il a dégénéré au cours de l'évolution, en même temps qu'il s'est progressivement spécialisé dans la différenciation masculine et le contrôle de la spermatogenèse (Graves et al. 2006).

3.1.1 Structure du chromosome Y humain

Le chromosome Y est constitué de deux régions de tailles très inégales (figure III.1) :

i) les régions pseudo-autosomiques PAR 1 et 2 (pseudoautosomal region), situées aux extrémités respectives des bras court et long du chromosome Y, qui portent une homologie de séquence avec le chromosome X ;

ii) la région MSY (Male specific region of the Y), qui représente 95 % de sa longueur, et dans laquelle il n'existe pas de crossing-over avec le chromosome X. Cette région, initialement appelée NRY (pour « Non recombining region of the Y »), a été renommée MSY après la mise en évidence de l'existence de nombreuses recombinaisons en son sein (Skaletsky et al. 2003). Elle est constituée d'une région euchromatique (transcriptionnellement active), d'environ 23 Mb, et d'une grande région hétérochromatique (transcriptionnellement inactive), de taille variable selon les individus (environ 30 Mb).

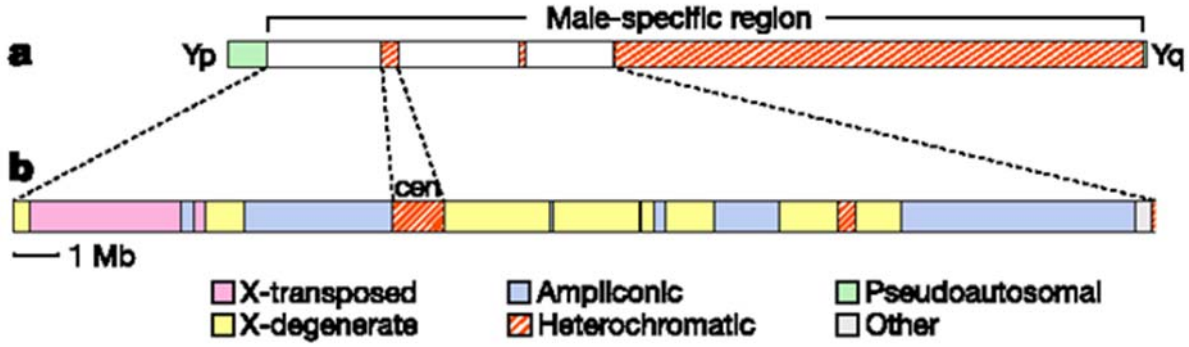

Figure III.2 : les trois types de séquences codantes de la région MSY
(d'après Skaletsky et al, 2003).

La région euchromatique regroupe le bras court du chromosome Y et la partie la plus centromérique du bras long. Elle porte le gène SRY (sex-determining region Y), découvert en 1990, et localisé sur le bras court du chromosome Y, au niveau de la bande p11.3 (Sinclair et al. 1990). Le gène SRY code pour le facteur TDF (testis determining factor) qui est d'expression spécifique du testicule, responsable de la différenciation testiculaire. La région euchromatique renferme également une région impliquée dans la spermatogenèse, nommé AZF (azoospermia factor). Cette région, mise en évidence en 1976, est localisée dans la partie terminale euchromatique du chromosome Y, en Yq11.23 (intervalles 5-6 de la carte de Vollrath) (Tiepolo and Zuffardi 1976).

La région hétérochromatique est située en Yq12, à l'extrémité du bras long du chromosome Y (intervalle 7 de la carte de Vollrath). Elle est essentiellement constituée par deux séquences hautement répétées, DYZ1 et DYZ2.

La cartographie du chromosome Y humain est très difficile du fait de la présence de nombreuses répétitions dans sa séquence. Plus de 97% de la portion euchromatique du chromosome Y a été séquencée en 2003 (Skaletsky et al. 2003). Plus récemment, une séquence supplémentaire euchromatique d'environ 0,45 Mb a été identifiée à partir de la région péri-centromérique du chromosome Y (Kirsch et al. 2005).

Les séquences euchromatiques ont été divisées en trois types de séquences (Figure III.2) (Skaletsky et al. 2003) :

i/ les séquences X-transposées, qui présentent plus de 99 % d'homologie avec le chromosome X;

ii/ les séquences X-dégénérées, riches en gènes présents en copie unique sur le chromosome Y, et en pseudogènes qui possèdent des homologues sur le chromosome X;

iii/ les séquences ampliconiques, qui sont des séquences répétées de grande taille présentant plus de 99,9% d'identité intra-chromosomique.

Class of sequence	Gene	Tissue expression	Gene copy number variability									References
			Reference sequence	*AZFa*	*P5/proximal-P1*	*P5/distal-P1*	*AZFc*	*b1/b3*	*b2/b3*	*gr/gr*	Other	
X-transposed	*TGIF2LY*	Testis	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	PCDH11Y	Fetal brain, brain	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
X-degenerate	*AMELY*	Teeth	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	DDX3Y	Ubiquitous	1	0	–	–	–	–	–	–	2	[4,49]
	PRKY	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	SRY	Testis	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	SMCY	Ubiquitous	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	UTY	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	ZFY	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	TMSB4Y	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	EIF1AY	Ubiquitous	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	RPS4Y1	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	TBL1Y	Ubiquitous	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	RPS4Y2	Testis, prostate	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	NLGN4Y	Fetal brain, brain, prostate, testis	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
	USP9Y	Ubiquitous	1	0	–	–	–	–	–	–	2	[4,24,49]
	CYorf14	Ubiquitous	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	CYorf15A	Ubiquitous	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	CYorf15B	Ubiquitous	1	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
Ampliconic	*DAZ*	Testis	4	–	2	0	0	2	2	2	6,8,12	[3,4,8•,16,46•] and unpublished
	GOLGA2LY	Testis	2	–	–	0	0	–	1	1	3,4,6	[8•,16,46•] and unpublished
	HSFY	Testis	2	–	0	0	–	–	–	–	–	[4]
	PRY	Testis	2	–	0	0	–	0	–	–	–	[16]
	RBMY	Testis	6	–	0	0	–	4	–	–	–	[4,8•]
	TSPY	Testis	35	–	–	–	–	–	–	–	23–64	[46•]
	VCY	Testis	2	–	–	–	–	–	–	–	–	
	XKRY	Testis	2	–	1	1	–	–	–	–	–	[7]
	CDY1	Testis	2	–	1	1	0	–	1	1	3,4,6	[8•,16,46•] and unpublished
	BPY2	Testis	3	–	2	0	0	2	1	2	4–6,9	[8•,16,46•] and unpublished
	CDY2	Testis	2	–	1	1	–	–	–	–	–	[7]
	CSPG4LY	Testis	2	–	–	0	0	–	1	1	3,4,6	[8•,16,46•] and unpublished

Sequence class and tissue specificity are indicated. The copy number of each gene in the reference sequence [10••] as well as known variability in copy numbers (caused by deletions, duplications or a combination of both) with appropriate references are shown. – = no variability described.

Figure III.3: les gènes du chromosome Y supposés ou vérifiés codant des protéines *(d'après Noordam et Repping, 2006)*

La région MSY comporte 156 unités transcriptionnelles, 78 qui sont non codantes et 78 qui codent pour 27 protéines différentes. Parmi les gènes codants, 12 sont d'expression ubiquitaire et 11 sont exprimés spécifiquement ou majoritairement dans le testicule (Skaletsky et al. 2003).

Les premiers sont localisés au sein des séquences X-dégénérés, alors que les derniers sont principalement localisés dans les séquences ampliconiques (Ginalski et al. 2004).

3.1.2 Gènes du chromosome Y

Il existe deux grands groupes de gènes sur le chromosome Y (figure III.3) :

i/ les gènes de " ménage ", présents en copie unique sur le chromosome Y et exprimés dans de nombreux tissus. Ils possèdent des homologues sur le chromosome X, échappant à l'inactivation et codant pour des isoformes similaires, mais non identiques, aux produits des gènes correspondants sur le chromosome Y. Parmi eux, on peut citer USP9Y (ubiquitin-specific protease 9 Y chromosome) (anciennement appelé DFFRY pour Drosophila fat-facets related Y)), DDX3Y (Dead-box protein 3 Y chromosomal) (anciennement appelé DBY (dead box Y)), UTY (ubiquitous tetratricopeptide repeat motif Y), SMCY (selected mouse cDNA on the Y) et eIF1AY (eukaryotic translation-initiation factor 1A Y isoform) (Lahn and Page 1997);

ii/ les gènes exprimés spécifiquement au niveau testiculaire, et qui sont présents en copies multiples le long du chromosome Y. Ils codent pour des protéines avec des fonctions spécialisées. Plus d'une dizaine de familles de gènes a été identifiée. C'est le cas par exemple de la famille RBM (RNA binding motif), DAZ (deleted in azoospermia), PRY (PTP-BL (protein tyrosine phosphatase BAS like) related Y), XKRY (XK related Y) et CDY (chromodomain Y) (Lahn and Page 1997; Ma et al. 1993; Reijo et al. 1995).

A l'heure actuelle, plusieurs gènes candidats localisés en Yq ont été proposés pour le contrôle de la spermatogenèse (figure III.1). L'implication formelle de ces gènes n'a pu être apportée, puisque les délétions du chromosome Y enlèvent plusieurs gènes à la fois, rendant ainsi impossible l'extrapolation du

rôle d'un gène AZF à partir du phénotype d'infertilité. De plus, seuls quelques cas sporadiques de mutations portant sur un seul de ces gènes ont été rapportés comme étant la cause d'une infertilité chez l'homme, ce qui suggère que ces évènements sont extrêmement rares. C'est le cas par exemple d'USP9Y qui a été retrouvé muté chez un homme présentant une azoospermie non obstructive (Sun et al. 1999). D'autres études ont rapporté des délétions *de novo* affectant spécifiquement USP9Y ou DDX3Y chez des patients infertiles (Brown et al. 1998; Foresta et al. 2000; Sargent et al. 1999). Cependant, Krausz et collaborateurs ont rapporté récemment deux cas de délétions partielles d'USP9Y transmises naturellement de père en fils (Krausz et al. 2006a). Ainsi, de nombreuses questions ne sont encore pas résolues en ce qui concerne l'implication de ces gènes dans le contrôle de la spermatogenèse. Les données actuelles orientent de plus en plus vers un contrôle multigénique complexe de la spermatogenèse, avec un certain degré de redondance entre différents gènes et entre copies d'un même gène.

3.2 Les anomalies de structure du chromosome Y

Il existe plusieurs types d'anomalies de structure du chromosome Y. Parmi elles, celles qui entraînent une délétion en Yq11.23 (région AZF) sont associées à des atteintes sévères de la spermatogenèse, le plus souvent à type d'azoospermie (Hsu 1994; Powell 2005; Tharapel 2005).

3.2.1 Translocations impliquant le chromosome Y

Une translocation correspond à un échange de segments chromosomiques entre deux chromosomes. Le chromosome Y peut être impliqué dans des translocations avec le chromosome X, un autosome, ou un autre chromosome Y surnuméraire. Ces translocations affectent le bras court ou le bras long du chromosome Y.

Les translocations (X ; Y) entraînent des phénotypes très variables selon les gènes délétés, allant du phénotype masculin, au phénotype féminin, en passant par différents stades d'ambiguïtés sexuelles et/ou

d'anomalies phénotypiques associées (petite taille, infertilité, dysmorphisme, retard mental, anomalies de la face, …).

La fréquence des translocations (Y ; autosomes) est estimée à 1/2000 dans la population générale (Powell 2005). Tous les autosomes peuvent être impliqués dans une translocation avec le chromosome Y, à l'exception des chromosomes 11 et 20. Les phénotypes rapportés sont masculins ou féminins, et les individus porteurs sont fertiles ou infertiles.

3.2.2 Délétions macroscopiques

Les délétions macroscopiques du chromosome Y sont visibles au caryotype, à l'inverse des microdélétions de la région MSY qui ne sont détectées que par technique de biologie moléculaire (hormis la délétion enlevant les trois régions AZF et l'hétérochromatine en Yq, visible également au caryotype). Elles peuvent affecter le bras court ou le bras long du chromosome Y.

Les individus porteurs d'une délétion Yp affectant le gène SRY ont le plus souvent un phénotype féminin avec des stigmates de syndrome de Turner. Ils ont un risque augmenté de développer un gonadoblastome.

Les délétions affectant la partie hétérochromatique en Yq12 sont compatibles avec une différenciation sexuelle normale. Les délétions plus larges englobant une ou plusieurs régions AZF sont responsables le plus souvent d'un phénotype masculin avec une atteinte sévère de la spermatogenèse.

3.2.3 Isochromosomes Y

L'isochromosome Y (iY) est un chromosome anormal dont l'un des bras (court ou long) est dupliqué et l'autre perdu. Il est donc constitué de deux bras identiques, soit longs, soit courts. Il survient lorsque le chromosome normal ne se divise pas longitudinalement mais transversalement.

L'isochromosome du bras court, i(Yp), correspond à un chromosome Y qui contient le bras court en deux exemplaires. Les phénotypes rapportés dans la littérature vont de l'ambiguïté sexuelle avec des stigmates de syndrome de Turner, à un phénotype masculin.

À l'inverse, l'isochromosome du bras long, i(Yq), comporte deux exemplaires du bras long du chromosome Y. Du fait de l'absence du gène SRY, les phénotypes sont féminins, avec des gonades réduites à de fines bandelettes fibreuses et il existe un impubérisme.

Le chromosome Y isodicentrique (idic(Y)) constitue l'une des anomalies structurales du chromosome Y les plus fréquemment retrouvées (Hsu 1994). Il s'agit d'un isochromosome qui contient deux copies du même centromère, avec un point de cassure situé le plus souvent au niveau du bras opposé, sur la bande adjacente au centromère (Tharapel 2005). Il est appelé pseudo-dicentrique (psudic) quand un des deux centromères est inactif. Lorsque le point de cassure est situé sur le bras long, le chromosome Y anormal contient deux exemplaires du bras court, deux centromères et deux exemplaires de la partie la plus proximale des bras longs. À l'inverse, lorsque le point de cassure est situé sur le bras court, le chromosome Y anormal contient deux exemplaires du bras long, deux centromères et deux exemplaires de la partie la plus proximale des bras courts. Ce chromosome étant instable, il est souvent retrouvé en association avec une lignée cellulaire 45,X.

3.2.4 Chromosomes Y en anneau

Il s'agit d'un chromosome Y anormal qui comporte deux points de cassure, l'un sur le bras long et l'autre sur le bras court. Les deux extrémités coupées s'associent pour former une structure circulaire, « en anneau », r(Y). Il s'agit donc d'un chromosome auquel il manque au moins l'extrémité terminale des bras courts et longs, et potentiellement une portion supplémentaire en Yp et/ou Yq. De même, ce chromosome est souvent retrouvé en association avec une ou plusieurs lignées cellulaires différentes du fait de son instabilité.

3.2.5 Les polymorphismes du chromosome Y

.3.2.5.1 Longueur de l'hétérochromatine

La partie hétérochromatique en Yq12 du chromosome Y humain présente des tailles différentes selon les individus, sans entraîner d'anomalies phénotypiques.

.3.2.5.2 Satellites du chromosome Y

La présence de satellites aux extrémités du bras long du chromosome Y (Yqs) est considérée comme une variation normale sans incidence phénotypique. Ces chromosomes proviennent de translocations impliquant les extrémités Yq et le bras court d'un chromosome acrocentrique (chromosomes 13, 14, 15, 21, et 22), le plus souvent le chromosome 15 (Kuhl et al. 2001; Schmid et al. 1984). La perte de la région PAR2 du chromosome Y a également été décrite chez plusieurs patients porteurs d'un Yqs (Kuhl et al. 2001).
Il a également été rapporté dans la littérature un cas de satellite du bras court du chromosome Y, chez un homme fertile sans anomalie phénotypique (Lin et al. 1995).

.3.2.5.3 Inversions du chromosome Y

Les inversions du chromosome Y sont le plus souvent considérées comme des variants sans conséquence phénotypique.

Les inversions correspondent à un chromosome au sein duquel un segment chromosomique est orienté en sens inverse (changement de direction à 180°), mais conserve sa localisation habituelle (Tharapel 2005). Ces inversions résultent de deux cassures dans deux régions différentes d'un même chromosome, suivies du recollement du segment inversé.

Il existe deux types d'inversion chromosomique, selon que le centromère soit impliqué ou non dans la recombinaison :

i/ les inversions péricentriques, qui impliquent les deux bras court et long du chromosome (le centromère est donc situé dans le segment inversé);

ii/ les inversions paracentriques, qui n'impliquent qu'un bras, court ou long, du chromosome remanié (l'inversion est donc localisée en dehors de la région centromérique).

Les inversions péricentriques du chromosome Y (inv(Y)(p11q11)) sont le plus souvent héritées. On estime qu'elles sont présentes à l'état de variant normal dans 0,06% des cas (Zeuthen and Nielsen 1973) . Elles sont cependant beaucoup plus fréquentes (30,5%) dans une communauté indienne musulmane d'Afrique du Sud (Bernstein et al. 1986). Elles entraînent une infertilité masculine lorsque qu'elles sont associées à une délétion dans les régions AZF.

Les inversions paracentriques du bras long du chromosome Y, quant à elles, n'ont été décrites que très rarement dans la littérature (Liou et al. 1997; Madan 1995; Queipo et al. 2005; Rottger et al. 2000).

3.3 Les microdélétions du chromosome Y

3.3.1 Historique

Le rôle majeur joué par le chromosome Y dans la détermination du sexe est connu depuis longtemps (gène SRY). Ce n'est que plus tardivement que l'on a exploré son implication dans la fertilité masculine. En 1976, Tiepolo et Zuffardi ont mis en évidence pour la première fois le rôle prépondérant du chromosome Y dans le contrôle de la spermatogenèse (Tiepolo and Zuffardi 1976). Réalisant l'analyse cytogénétique de 1170 hommes infertiles, ils ont montré que 6 d'entre eux présentaient une délétion macroscopique de la partie terminale euchromatique du bras long du chromosome Y, dont le point de cassure se situait en Yq11. Ces 6 hommes étant azoospermiques, ils ont dénommé cet intervalle de délétion AZF (azoospermia factor) et suggéré la présence de facteurs de contrôle de la spermatogenèse dans cet intervalle.

L'essor des techniques de biologie moléculaire et le séquençage ont permis de confirmer l'existence de gènes impliqués dans la fertilité masculine dans cet intervalle. L'utilisation de sondes ADN en technique PCR (Polymerase chain reaction) a permis de détecter chez des hommes azoospermiques et oligozoospermiques des délétions interstitielles de petite taille dans la région AZF, non repérables avec les techniques cytogénétiques classiques. L'analyse de ces microdélétions (délétions interstitielles touchant moins de 2.10^6 nucléotides) a abouti à l'identification en Yq11 de 3 loci porteurs de gènes impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse, et donc de 3 régions AZF qu'on pensait non chevauchantes : AZFa dans l'intervalle 5, AZFb qui chevauche les intervalles 5 et 6, et AZFc dans l'intervalle 6 (figure III.1 page 38) (Vogt et al. 1996).

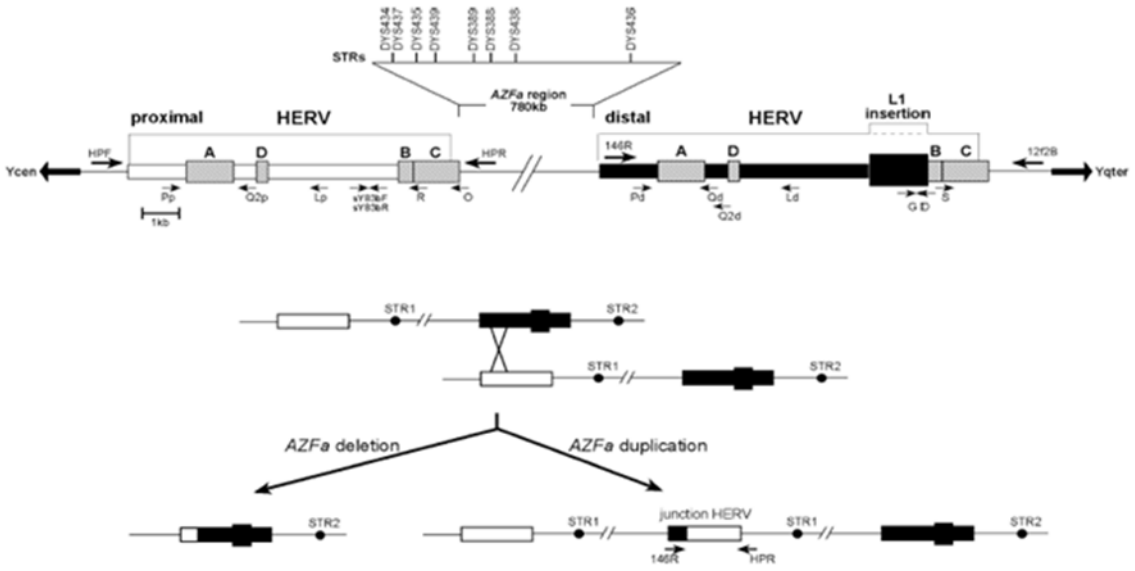

Figure III.4 : structure de la région AZFa et mécanisme de recombinaison
(d'après Bosch et Jobling, 2003)

La cartographie physique du chromosome Y (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001; Tilford et al. 2001) a permis de préciser la structure des régions AZF et de montrer que les régions AZFb et AZFc étaient partiellement chevauchantes (Repping et al. 2002; Skaletsky et al. 2003). Ainsi, Repping et collaborateurs ont proposé une classification plus précise des délétions de la région MSY en 4 types de délétions (Repping et al. 2002). Ces délétions sont des évènements *de novo* qui proviennent de phénomènes de recombinaisons intra-chromosomiques entre des séquences homologues (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001; Skaletsky et al. 2003).

3.3.2 Les différents types de délétions de la région MSY

.3.3.2.1 La région AZFa

La région AZFa est localisée dans la partie proximale de Yq11, dans l'intervalle 5 de la carte génétique de Vollrath et collaborateurs (Figure III.1) (Vollrath et al. 1992). Sa taille est estimée à environ 800 Kb. Elle contient 2 gènes, d'expression ubiquitaire et présents en copie unique sur le chromosome Y : USP9Y et DDX3Y.

Les délétions AZFa résultent de recombinaisons homologues intra-chromosomiques entre deux séquences rétrovirales HERV15 (Human Endogenous Retroviral 15) qui bornent la région AZFa et qui présentent une forte homologie de séquence(Figure III.4) (Blanco et al. 2000; Kamp et al. 2000; Sun et al. 2000). Elles enlèvent les deux gènes USP9Y et DDX3Y.

.3.3.2.2 La région AZFb

La taille de la région AZFb est estimée entre 6,2 et 7,7 Mb (Repping et al. 2002). Elle couvre partiellement la région AZFc (Figure III.5 page suivante).

Les microdélétions de la région AZFb du premier modèle (Vogt et al. 1996) correspondent à des délétions entre le palindrome P5 et le palindrome P1 proximal (P1.2) qui est localisé dans la région AZFc. Repping et collaborateurs ont également identifié une autre délétion affectant la région

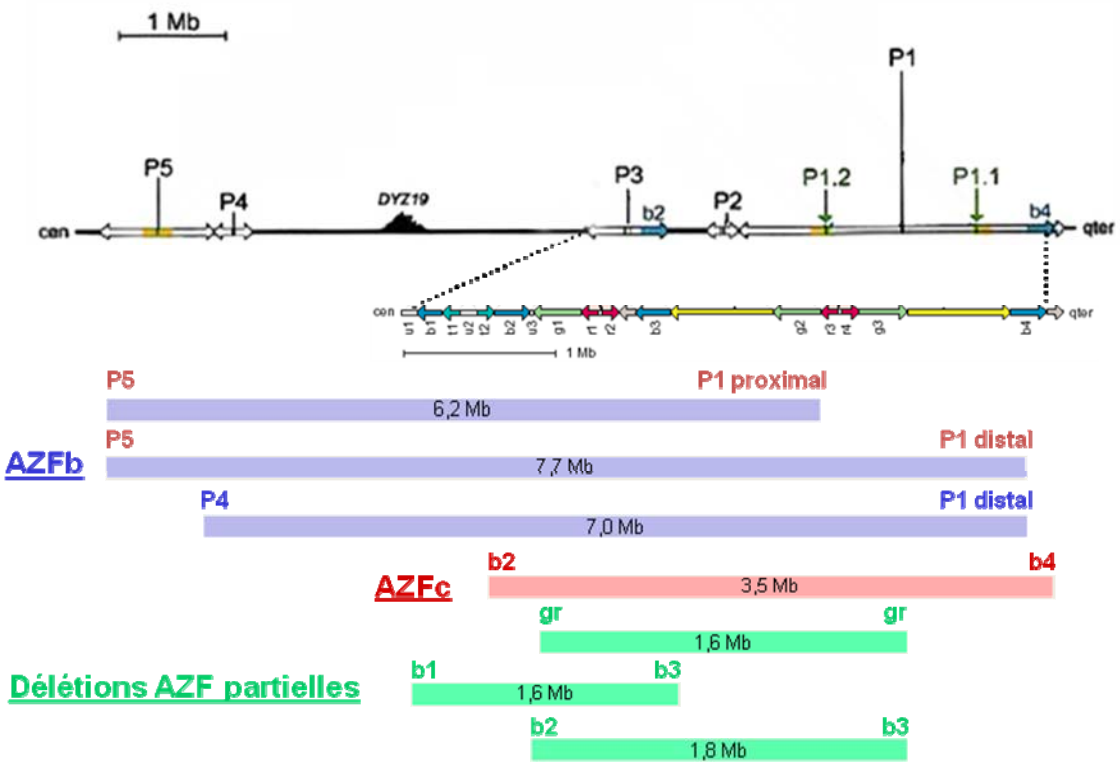

Figure III.5 : structure palindromique, mécanismes de recombinaison et taille des délétions des régions AZFb et AZFc

(d'après Kurode-Kawaguchi et al, 2001; Repping et al, 2002).

On distingue six familles d'amplicons dans la région AZFc identifiés par différentes couleurs : vert : g1/g2/g3 ; rouge : r1/r2/r3/r4 ; bleu : b1/b2/b3/b4 ; turquoise : t1/t2 ; jaune : P1.1/P1.2 ; gris : gr1/gr2.
Les flèches représentent l'organisation des amplicons. Les amplicons de même couleur présentent plus de 99,9% d'homologie de séquence.

AZFb, se situant entre le palindrome P5 et le palindrome P1 distal (P1.1) localisé également dans la région AZFc. Cette délétion correspond aux microdélétions de la région AZFb+c du premier modèle. Une délétion beaucoup plus rare, localisée entre le palindrome P4 et la partie distale du palindrome P1, a également été décrite. Ces délétions résultent d'une recombinaison le plus souvent homologue entre le palindrome P5 ou P4, et la partie proximale ou distale du palindrome P1 (Repping et al. 2002; Vogt 2004).

La région AZFb contient des gènes qui ne sont présents qu'au niveau de la région AZFb (HSFY, eIF-1AY, SMCY), et d'autres qui possèdent une ou plusieurs copies dans la région AZFc (BPY2, CDY, DAZ). Elle renferme également les copies fonctionnelles de deux familles de gènes qui sont présents en copies multiples le long du chromosome Y : RBMY et PRY.

.3.3.2.3 La région AZFc

La région AZFc est localisée dans l'intervalle 6C-6F de la carte de Vollrath, jouxtant l'hétérochromatine. Sa taille est estimée à 3,5 Mb. La région AZFc est constituée de 6 familles différentes d'amplicons (Figure III.5). Le nombre élevé d'amplicons dans cette zone suggère un polymorphisme très important dans la région AZFc (Yen 2001).

Les délétions AZFc résultent d'une recombinaison homologue entre les amplicons b2 (au sein du palindrome P3) et b4 (au sein du palindrome P1) de la région AZFc (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001).

Onze familles de transcrits ont pu être détecté dans AZFc, d'expression testiculaire exclusive ou quasi-exclusive, mais la région porte au total 27 gènes potentiellement fonctionnels. Présent en copies multiples dans la partie euchromatique du chromosome Y, DAZ (appelé aussi SPGY) est un bon candidat de la région AZFc qui porte les copies fonctionnelles du gène. Il code pour une protéine de liaison à l'ARN spécifique du testicule (Reijo et al. 1995). La protéine DAZ contient un motif RRM (RNA recognition motif) et plusieurs copies d'une unité DAZ de 24 acides aminés (Reijo et al. 1995; Saxena et al. 1996). La répétition DAZ serait impliquée dans les interactions protéine-protéine (Tsui et al. 2000). Dans la région AZFc, le

gène DAZ serait présent en 4 copies regroupées en deux groupes distincts au milieu de la région AZFc. Ces deux clusters, distants de 1,47 Mb, seraient constitués d'une paire inversée de gènes DAZ : le doublet DAZ1/DAZ2 au sein du palindrome P2, et le doublet DAZ3/DAZ4 au sein du palindrome P1 (Fernandes et al. 2002; Saxena et al. 2000).

.3.3.2.4 Les délétions partielles en AZFc

Trois délétions supplémentaires affectant la région AZFc, appelées délétions AZFc partielles car elles ne touchent qu'une partie de la région, ont été identifiées récemment (Figure III.5 et tableau III.1) (Fernandes et al. 2002; Fernandes et al. 2004; Repping et al. 2003; Repping et al. 2004):

i/ les délétions gr/gr, qui résultent d'une recombinaison entre les amplicons g1/r1/r2 et g2/r3/r4. Elles enlèvent 1,6 Mb de la région AZFc, soit la moitié des gènes de cette région. Elles n'enlèvent pas la totalité des copies de gènes d'une même famille de la région AZFc, mais entraînent la diminution du nombre de copies de 5 familles de gènes. Elles sont responsables en particulier de la perte de deux copies du gène DAZ sur les quatre ;

ii/ les délétions b1/b3, qui résultent d'une recombinaison entre les amplicons b1 et b3 de la région AZFc. Leur taille est identique à celle des délétions gr/gr mais elles affectent une partie plus proximale de la région AZFc et sont beaucoup moins fréquentes. Elles sont responsables de la suppression du gène PRY et de la diminution du nombre de copies d'un certain nombre d'autres gènes localisés dans cette zone ;

iii/ les délétions b2/b3 (appelées également u3-gr/gr ou g1/g3), qui ne résultent pas d'une recombinaison homologue mais interviennent entre des variants inversés de la région AZFc.

3.3.3 Conséquences cliniques des microdélétions du chromosome Y

Les microdélétions du chromosome Y constituent la cause moléculaire la plus fréquente des azoospermies et des oligozoospermies sévères (moins de 5 millions de spermatozoïdes/ml) d'origine non-obstructive. Krausz et Degl'Innocenti estiment qu'elles sont retrouvées dans 10 à 18% des cas dans ce contexte précis (Krausz and Degl'Innocenti 2006b). Elles sont retrouvées plus fréquemment en cas d'azoospermie que d'oligozoospermie sévère (15% versus 5-7%). Elles sont retrouvées presque exclusivement chez les patients présentant une numération en spermatozoïdes inférieure à 1 million/ml, et beaucoup plus rarement chez des patients avec une numération en spermatozoïdes comprise entre 1 et 5 millions/ml (Simoni et al. 2004). La délétion la plus fréquemment retrouvée est la délétion de la région AZFc (environ 60% des cas), suivie des délétions AZFb et AZFb+c ou AZFa+b+c (environ 35%). Les délétions AZFa sont les moins fréquentes puisqu'elles sont identifiées dans environ 5% des cas (Krausz and Degl'Innocenti 2006b).

Le tableau III.1 résume l'état actuel des connaissances concernant le retentissement clinique des délétions de la région MSY et leur fréquence de survenue (Noordam and Repping 2006).

Tableau III.1 : les délétions de la région MSY du chromosome Y
(d'après Noordam and Repping, 2006)

Type de délétion	Nb de gènes touchés	Phénotype	Fréquence	
			Azoospermie	**Oligozoospermie**
AZFa	2	Azoospermie (SCO)	< 1%	0%
P5/P1 proximal	23	Azoospermie (SCO ou arrêt de maturation)	1%	0%
P5/P1 distal	31	Azoospermie (SCO ou arrêt de maturation)	1%	0%
AZFc (b2/b4)	13	Azoospermie/oligozoospermie sévère	6%	5%
gr/gr	6	Variable (facteur de risque d'un trouble de la spermatogenèse)	3%	3%
b1/b3	7	inconnu	/	/
b2/b3	7	inconnu	/	/

Les délétions AZFa et P5/P1 entraînent une azoospermie avec une histologie testiculaire type SCO ou arrêt de maturation, le plus souvent en cours de méiose. Les délétions b2/b4 (délétions AZFc) entraînent un phénotype très variable, allant de l'azoospermie avec un SCO à l'histologie testiculaire, à l'oligozoospermie sévère. Cette disparité phénotypique pourrait s'expliquer par une altération progressive avec le temps de l'épithélium séminifère, ou par l'influence de facteurs environnementaux ou génétiques (compensation par le chromosome X ou des gènes autosomiques, présence ou non d'une mosaïque 45, X) (Krausz and Degl'Innocenti 2006b). Les délétions gr/gr sont retrouvées dans le cas d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère, mais également dans une proportion moins importante chez des patients avec une numération normale en spermatozoïdes. A l'heure actuelle, l'hypothèse généralement avancée est que les délétions gr/gr constitueraient un facteur de risque d'une atteinte de la spermatogenèse. Là encore, des facteurs génétiques et/ou environnementaux pourraient expliquer les variations phénotypiques constatées chez les patients porteurs de ce type de délétion. Par ailleurs, les délétions gr/gr seraient associées à un risque augmenté de cancer du testicule (Nathanson et al. 2005). En effet, le risque de développer une tumeur testiculaire serait multiplié par deux chez les patients porteurs de la délétion gr/gr, et par trois en cas d'antécédent familial de cancer testiculaire. L'implication des délétions b1/b3 et b2/b3 dans les atteintes de la spermatogenèse

demeure controversée. Elles sont retrouvées presque exclusivement chez des patients porteurs d'un chromosome Y de l'haplogroupe N, et qui présentent des paramètres de sperme normaux ou abaissés (Ferlin et al. 2005; Hucklenbroich et al. 2005; Repping et al. 2004). Ces délétions partielles pourraient être considérées comme des polymorphismes du chromosome Y.

3.3.4 Méthodes et indications de la recherche des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles

L'amélioration des connaissances de la cartographie du chromosome Y a permis le développement de nombreux marqueurs PCR sur ce chromosome. Grâce à ces amorces, appelées marqueurs STS (sequence tagged sites), la recherche des microdélétions du chromosome Y dans les régions AZF est aujourd'hui facilement réalisée par des amplifications PCR en multiplex. En 1999, un programme Européen de détection des microdélétions du chromosome Y a été mis en place par l'EAA (European Academy of Andrology) et l'EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) (Simoni 2001; Simoni et al. 1999). Grâce à ce programme, la technique de recherche des microdélétions du chromosome Y est maintenant fiable et les résultats reproductibles entre les laboratoires qui appliquent les recommandations publiées (Simoni et al. 2004). Il est recommandé en première intention d'utiliser deux marqueurs STS au sein de chaque région AZFa, AZFb et AZFc. Ce screening permet de détecter 95% des délétions du chromosome Y qui entraînent un trouble de la spermatogenèse (Simoni et al. 2004). Lorsqu'une délétion est détectée, l'utilisation de marqueurs STS supplémentaires permet de définir l'étendue de la délétion. Cependant, cette technique ne permet pas de détecter les délétions partielles.

La détection des microdélétions du chromosome Y est recommandée chez les patients porteurs d'une infertilité non-obstructive d'origine idiopathique, et qui présentent soit une azoospermie, soit une oligozoospermie sévère de moins de 5 millions de spermatozoïdes par ml d'éjaculât (Krausz and

Degl'Innocenti 2006b; Simoni et al. 2004). Le dépistage couramment réalisé comporte la recherche des délétions AZFa, P5/P1 proximal, P5/P1 distal et AZFc. Il présente plusieurs intérêts :

i/ diagnostique. La recherche des microdélétions du chromosome Y doit faire partie du bilan génétique chez les hommes présentant une oligozoospermie ou une azoospermie d'origine non-obstructive, et qui sont porteurs d'un caryotype normal;

ii/ pronostique, chez des hommes présentant une azoospermie idiopathique et candidats à l'ICSI avec extraction de spermatozoïdes testiculaires. Le type de délétion AZF serait corrélé aux chances de recueil de spermatozoïdes lors de l'exploration chirurgicale testiculaire ;

iii/ dans le cadre du conseil génétique. La recherche de microdélétions du chromosome Y permet d'apprécier le risque de transmission de l'anomalie à la descendance lors d'une prise en charge en ICSI. De plus, le chromosome Y microdélété pourrait présenter un risque accru d'instabilité mitotique lors des premières divisions embryonnaires, entraînant la formation d'une lignée cellulaire 45, X (Le Bourhis et al. 2000; Patsalis et al. 2005). Cette instabilité pourrait conduire à des enfants porteurs de mosaïques constitutionnelles précoces 45, X / 46, XYdel, avec un phénotype pouvant varier depuis celui d'un garçon porteur de la délétion du Y jusqu'à celui d'une fille porteuse d'un syndrome de Turner (45, X) en passant par tous les stades d'ambiguïté sexuelle (Patsalis et al. 2002);

iv/ préventif. Chez certains patients, il a été montré que la délétion pouvait entraîner une altération progressive de la spermatogenèse, avec évolution de l'oligozoospermie sévère en azoospermie au cours des années (pour revue, voir (Krausz et al. 2003)). Il serait donc très intéressant de dépister ces hommes avant une aggravation de leur infertilité, de manière à réaliser une autoconservation préventive de sperme, et éviter ainsi le recours ultérieur à une extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires (Krausz et al. 2000).

4. Génome germinal et spermatogenèse

4.1 Les aneuploïdies dans l'espèce humaine

L'aneuploïdie est définie comme une anomalie de nombre des chromosomes d'une même paire. Si un chromosome d'une paire manque, on parle de monosomie. Si l'un des chromosomes d'une paire est présent en triple exemplaire, on parle de trisomie. Ces anomalies numériques sont dûes à un défaut de ségrégation (que l'on appelle « non-disjonction méiotique ») au cours de la méiose. Il s'agit d'une anomalie qui survient *de novo* pendant la gamétogenèse, chez l'un des parents du sujet porteur, dont le caryotype est parfaitement normal.

4.1.1 Généralités

Dans l'espèce humaine, les anomalies chromosomiques (de nombre ou de structure) sont très fréquentes puisqu'elles sont retrouvées dans environ 50% des avortements spontanés, 6 % des grossesses évolutives et 1% des enfants nés (Jacobs 1992). Parmi ces anomalies chromosomiques, les anomalies de nombre des chromosomes sont les plus nombreuses, puisqu'on estime leur incidence à 35% des avortements, 4% des mort-nés et 0,3% des enfants nés (Hassold et al. 1996). Au total, elles toucheraient plus de 5% des conceptus (Hassold and Hunt 2001). La plupart des aneuploïdies sont létales, mais certaines peuvent êtres viables, comme la trisomie 13, 18, et 21, et les anomalies de nombre des chromosomes sexuels (monosomie X ou syndrome de Turner 45, X ; syndrome de Klinefelter 47, XXY). Elles constituent la cause la plus fréquente de retard mental dans l'espèce humaine. Les patients porteurs d'une aneuploïdie autosomique viable sont souvent atteints d'un retard mental et/ou physique. Les anomalies des chromosomes sexuels entraînent une infertilité, des troubles du comportement et/ou un retard intellectuel.

4.1.2 Genèse des aneuploïdies dans l'espèce humaine

Les non-disjonctions méiotiques peuvent résulter de différents mécanismes (figure IV.1).

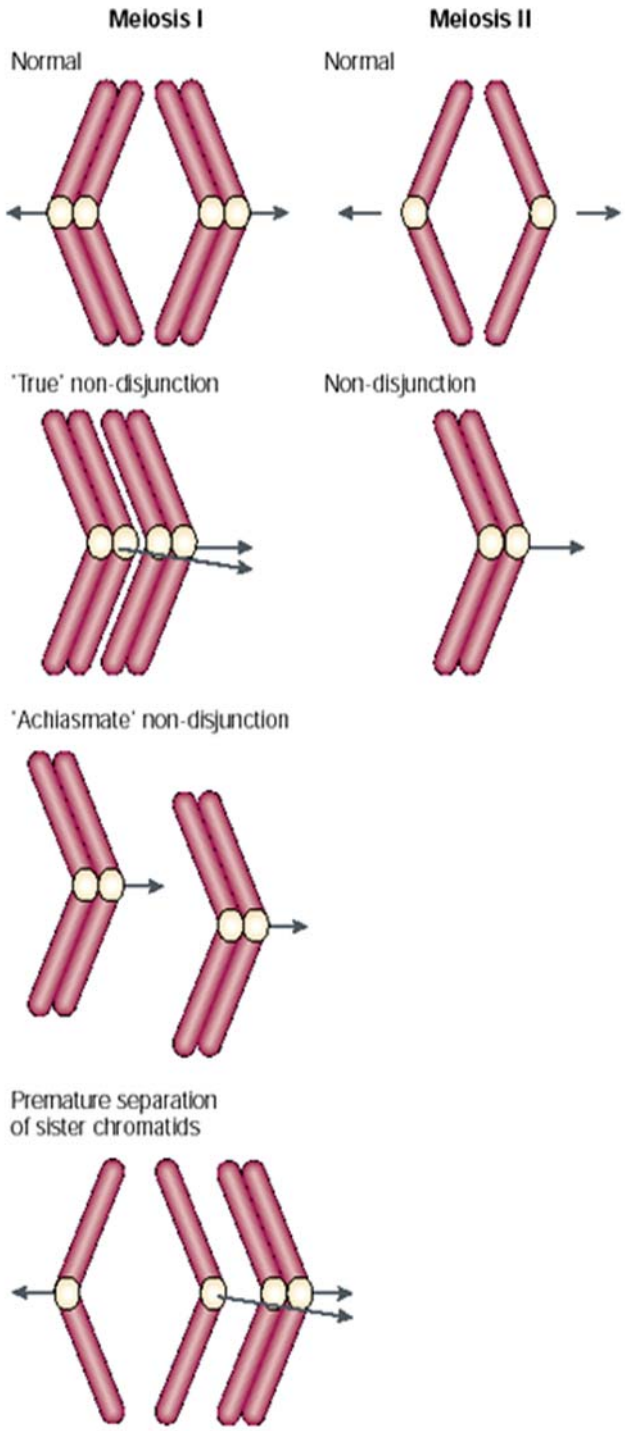

Figure IV.1 : les mécanismes de non-disjonctions méiotiques
(d'après Hassold et Hunt, 2001).

En méiose I, trois profils différents de ségrégation anormale peuvent être observés (Hassold and Hunt 2001):

i/ la non-disjonction vraie, dans laquelle il existe une anomalie de la résolution des chiasmas en anaphase I. Les chromosomes homologues restent donc appariés et migrent ensemble vers le même pôle du fuseau ;

ii/ la non-disjonction achiasmatique, dans laquelle il existe une absence de chiasmas entre une paire de chromosomes homologues ou la résolution des chiasmas a lieu de manière prématurée. Les chromosomes homologues ne se sont donc pas appariés ou n'ont pas subi de recombinaisons, et migrent de manière indépendante vers le même pôle du fuseau ;

iii/ la séparation prématurée des chromatides sœurs au cours de la méiose I, dans laquelle ce sont les chromatides plutôt que les chromosomes homologues qui s'orientent chacune vers un pôle du fuseau.

Au cours de la deuxième division méiotique, les non-disjonctions résulteraient d'une absence de séparation des chromatides sœurs qui migreraient vers le même pôle du fuseau méiotique.

Ces différents mécanismes de non-disjonctions s'observent à des fréquences différentes selon le type de chromosome. Par exemple, les trisomies 21 et le syndrome de Klinefelter d'origine paternelle seraient essentiellement dû à une non-disjonction achiasmatique (Hassold and Hunt 2001).

La contribution paternelle ou maternelle à la genèse des aneuploïdies a été étudiée par des études de polymorphisme de l'ADN sur cellules somatiques, à partir de conceptus atteints de trisomie ou de monosomie. Selon ces études, la plupart de ces aneuploïdies serait d'origine maternelle, mais certaines auraient une contribution paternelle importante. L'origine paternelle dépendrait du type d'anomalie chromosomique observé. Elle est estimée entre 0 et 30% pour les trisomies mettant en jeu un autosome (à l'exception de la trisomie 2 où l'origine paternelle est en cause dans un cas sur deux), 50 et100% pour les

trisomies impliquant un gonosome, et 60% pour les triploïdies (Hassold and Hunt 2001; Zaragoza et al. 2000).

L'analyse chromosomique des spermatozoïdes permet de connaître avec précision le taux d'aneuploïdie pour un patient donné et donc d'approcher de façon plus directe la contribution paternelle de ces anomalies. Les premières études étaient réalisées par fécondation hétéro-spécifique homme-hamster, technique lourde qui ne permettait l'analyse que d'un faible nombre de spermatozoïdes. Depuis les années 1990, la technique de FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) sur noyaux spermatiques s'est considérablement développée. Elle présente de nombreux avantages. Elle permet notamment de réaliser l'analyse de plusieurs milliers de spermatozoïdes à la fois chez le même patient. De plus la technique de FISH est la seule permettant l'analyse cytogénétique des spermatozoïdes chez des patients oligozoospermiques. Cette approche constitue désormais la technique de choix pour étudier la constitution chromosomique des spermatozoïdes chez l'homme.

4.2 Aneuploïdies spermatiques et infertilité masculine : revue de la littérature

De nombreuses études par fécondation hétéro-spécifique homme-hamster, puis par FISH sur noyaux spermatiques, ont été réalisées chez des patients fertiles afin d'étudier les taux d'aneuploïdie dans l'espèce humaine (pour revue, voir (Martin 2006; Shi and Martin 2001a; Templado et al. 2005)). Les anomalies de nombre des chromosomes dans l'espèce humaine seraient comprises entre 1 et 2%, et les anomalies chromosomiques de structure oscilleraient entre 7 et 14%. Au total, un spermatozoïde sur 10 serait donc porteur d'une anomalie chromosomique (Guttenbach et al. 1997a). D'autre part, il existerait des variations interindividuelles importantes dans les taux d'aneuploïdie spermatique chez les hommes fertiles. Ainsi, certains d'entre eux présentent une augmentation importante des taux d'aneuploïdie pour certains des chromosomes analysés (Rubes et al. 2005).

Dans l'espèce humaine, tous les chromosomes peuvent être sujets à un phénomène de non-disjonction méiotique, mais la fréquence moyenne varie selon le chromosome étudié. En effet, certains chromosomes seraient plus sujets à des non-disjonctions au cours de la méiose. C'est le cas du chromosome 21 et des chromosomes sexuels qui présentent les fréquences de disomie les plus élevées (Martin 2005; Templado et al. 2005). Les phénomènes de recombinaison méiotiques pourraient expliquer ces différences de susceptibilité aux non-disjonctions observées entre les chromosomes (Martin 2005). Le chromosome 21 est un petit chromosome dans lequel il n'existe qu'un seul chiasma au cours de la méiose, et les chromosomes sexuels X et Y présentent des phénomènes de recombinaison au niveau des régions PAR1 et PAR2. Si la fréquence de recombinaison est diminuée ou si ce chiasma unique est absent au niveau des chromosomes, ils sont beaucoup plus sensibles à un défaut de ségrégation méiotique. Par exemple, les patients chez lesquels il existe une diminution des phénomènes de recombinaison dans les régions PAR, présentent une augmentation des taux de spermatozoïdes hyperhaploïdes 24, XY (Hassold et al. 1991). A l'heure actuelle, il apparaît probable que les erreurs de recombinaison méiotique (nombre ou position) contribuent à la genèse des aneuploïdies spermatiques (Lamb et al. 2005).

La question d'une éventuelle augmentation des taux d'aneuploïdies spermatiques chez les hommes présentant une anomalie de la spermatogenèse, et donc d'un risque génétique encouru par leur éventuelle descendance, est fondamentale dans le cadre de leur prise en charge en AMP, en particulier en technique d'ICSI. Les patients candidats à l'ICSI sont souvent porteurs d'une atteinte de la spermatogenèse que l'on peut qualifier de globale (ou polymorphe), à l'opposée d'une atteinte spécifique, monomorphe, d'un paramètre spermatique. En effet, l'altération de la spermatogenèse est caractérisée par une diminution sévère de la numération des spermatozoïdes (oligozoospermie), associée à une diminution de leur mobilité (asthénozoospermie) et/ou d'une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes atypiques (tératozoospermie). Lorsque ces trois anomalies sont associées, on parle d'oligoasthénotératozoospermie (OAT). Certaines études ont montré une augmentation des anomalies du caryotype chez les enfants nés par

technique d'ICSI, en particulier des anomalies des chromosomes sexuels (Bonduelle et al. 1998; Bonduelle et al. 2002; In't Veld et al. 1995; Liebaers et al. 1995; Van Steirteghem et al. 2002). Bonduelle et collaborateurs ont réalisé un diagnostic pré-natal chez 1586 conceptus issus d'ICSI (Bonduelle et al. 2002). Ils ont mis en évidence une augmentation des anomalies chromosomiques *de novo*, en particulier des chromosomes sexuels, lorsque les numérations en spermatozoïdes étaient inférieures à 20 millions par ml chez les pères des conceptus. Ces études posent donc la question du risque de transmission d'une anomalie génétique via le spermatozoïde micro-injecté à la descendance des patients infertiles ayant recours à l'ICSI, même s'ils sont porteurs d'un caryotype somatique normal. Ainsi, les altérations quantitatives de la spermatogenèse pourraient être associés à des atteintes qualitatives, pouvant entraîner une non-disjonction au cours de la méiose ou des anomalies de recombinaison méiotique, et donc résulter en la production d'une certaine proportion de spermatozoïdes aneuploïdes (Egozcue et al. 2005).

Depuis l'étude novatrice de Miharu et collaborateurs en 1994 (Miharu et al. 1994), la technique de FISH sur noyaux spermatiques a été largement employée pour l'analyse chromosomique des spermatozoïdes chez les hommes infertiles (pour revue, voir (Miharu 2005; Sarrate et al. 2005; Shi and Martin 2001a; Sun et al. 2006; Tempest and Griffin 2004; Templado et al. 2005)).

La majorité de ces études montrent une augmentation significative de la moyenne des taux d'aneuploïdies spermatiques chez les hommes infertiles comparés à une population témoin, au moins pour certains des chromosomes analysés (Aran et al. 1999; Bernardini et al. 1998; Bernardini et al. 2000; Bernardini et al. 1997; Calogero et al. 2001b; Calogero et al. 2001a; Finkelstein et al. 1998; Lahdetie et al. 1997; Martin et al. 2003; McInnes et al. 1998; Moosani et al. 1995; Nishikawa et al. 2000; Ohashi et al. 2001; Pang et al. 1999; Pfeffer et al. 1999; Rives et al. 1999; Templado et al. 2002; Ushijima et al. 2000; Vegetti et al. 2000). L'analyse des données de la littérature suggère que les patients présentant une atteinte sévère de la spermatogenèse et porteurs d'un caryotype normal présentent une augmentation des taux d'aneuploïdies

spermatiques inversement corrélée à la numération spermatique (Calogero et al. 2001a; Liu et al. 2004; Martin et al. 2003; Ohashi et al. 2001; Rives et al. 1999; Tempest and Griffin 2004; Vegetti et al. 2000).

Cependant, d'autres études ne montrent pas d'augmentation des taux d'aneuploïdies chez les hommes infertiles (Damri et al. 2000; Guttenbach et al. 1997b; Miharu et al. 1994; Schultz et al. 2000).

Ces discordances peuvent être expliquées par l'hétérogénéité des populations de patients étudiés et des techniques de FISH employées, ainsi que par la faible taille des populations. Ces études ont en effet porté sur des populations d'hommes infertiles mal caractérisées d'un point de vue clinique et biologique. Par exemple, l'augmentation des taux d'aneuploïdie spermatique pourrait n'affecter que les infertilités d'origine non-obstructive ou qu'une sous-population au sein des patients étudiés. A l'inverse, la présence d'une anomalie chromosomique au niveau somatique, plus fréquente chez les hommes infertiles, pourrait entraîner une augmentation des taux chez les patients étudiés.

Ainsi, il est indispensable de disposer de populations homogènes de patients parfaitement caractérisés sur le plan clinique et biologique, et de taille suffisante. Cette caractérisation précise pourrait permettre d'identifier des facteurs cliniques et/ou biologiques qui seraient corrélés à un risque d'aneuploïdie augmentée dans les spermatozoïdes.

L'intérêt de l'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes par la technique de FISH dans différentes situations d'infertilité masculine est décrit dans la revue (Faure et al. 2005) présentée en annexe.

5. Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermatogenèse

Lors de la mitose est transmis un ensemble de gènes identiques d'une cellule mère à ses deux cellules filles. Cependant, deux cellules contenant la même séquence d'ADN peuvent présenter des phénotypes différents, qui sont transmis au cours de la division cellulaire. Ainsi, il existe une information stable, héréditaire et réversible qui n'est pas codée par la séquence de l'ADN et qui participe au devenir cellulaire : cette information est qualifiée d'épigénétique. L'épigénome correspond à l'ensemble des marques épigénétiques transmises au cours de la division cellulaire.

Dans la cellule somatique, il est maintenant établi que le support moléculaire de l'information épigénétique implique non seulement des modifications chimiques de la molécule d'ADN (plus précisément une méthylation des résidus cytosines), mais aussi des modifications de la structure d'empaquetage du génome, que l'on appelle la chromatine (Geiman and Robertson 2002; Jaenisch and Bird 2003).

Au cours de la spermatogenèse, la chromatine est globalement ré-organisée dans la cellule post-méiotique. Cette restructuration est très probablement impliquée dans l'information épigénétique qui sera transmise à l'embryon.

5.1 Structure de l'épigénome dans la cellule somatique

Le génome humain est constitué de 6.10^9 paires de bases, ce qui représente environ un mètre à l'état déroulé. Le diamètre du noyau ne dépassant pas quelques microns, l'ADN y est très compacté en une structure appelée chromatine.

La chromatine est constituée de différents éléments :

i/ une double hélice d'ADN;

ii/ les histones, protéines basiques de petites tailles divisées en cinq classes : H1, H2A, H2B, H3 et H4;

iii/ les protéines non histones, comme les HMG (High Mobility Group).

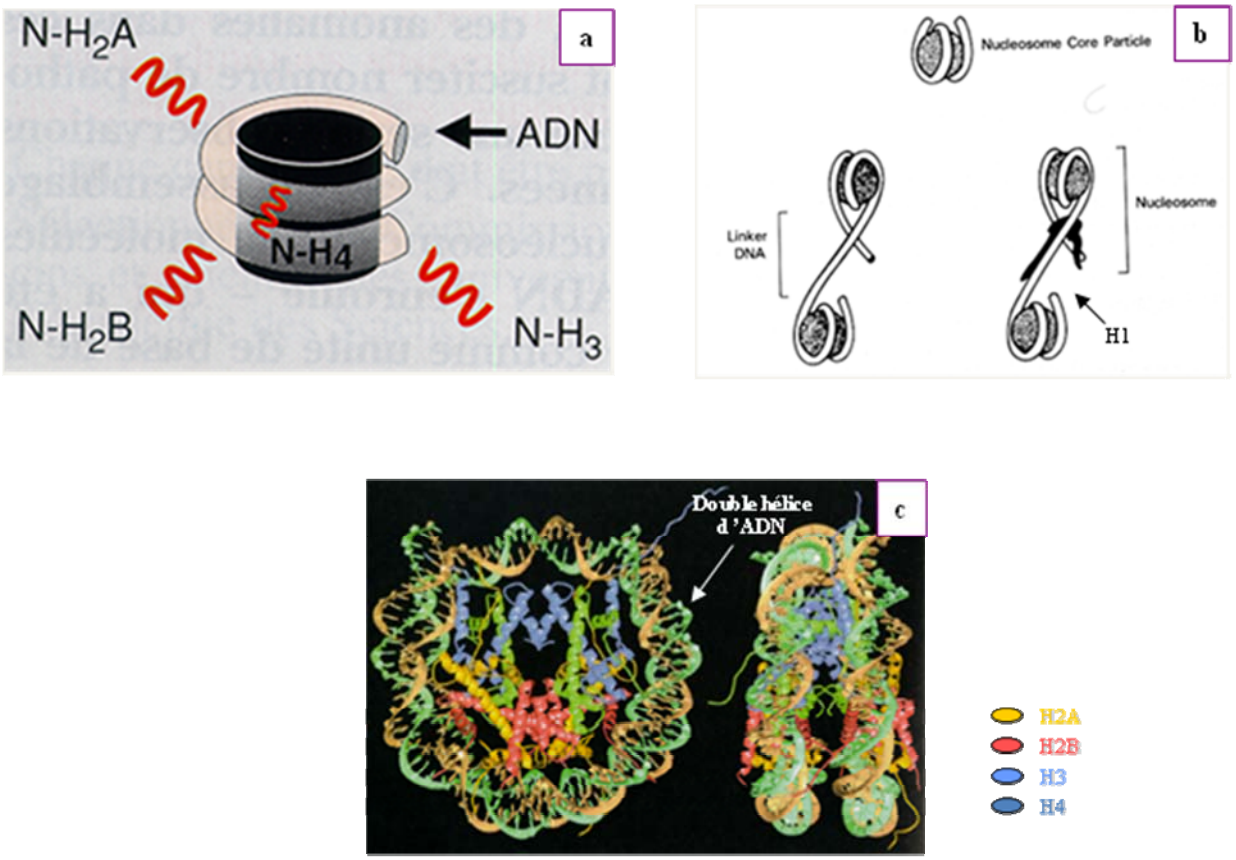

Figure V.1 : structure de la chromatine dans la cellule somatique

a- représentation schématique d 'un nucléosome. L 'ADN est enroulé 1,7 fois autour de la particule cœur d'histones, constituée d 'un tétramère d'histones H3-H4 et de deux dimères d'histones H2A et H2B. Quatre extrémités N-terminales des histones sont représentées *(d 'après Lipinski et al, 2000)*

b- organisation schématique du nucléosome et de sa particule coeur *(d 'après Wolffe, 1995)*

C- vue, de dessus et de profil ,de l 'octamère d'histones entouré de la double hélice d 'ADN *(d 'après Luger et al, 1997)*

Son premier niveau de compaction correspond au nucléosome, structure discoïde de 10 nm de diamètre. Un nucléosome est constitué d'un ADN enroulé 1,7 fois autour d'une particule coeur sur une longueur de 146 paires de bases (figure V.1a). Les nucléosomes sont régulièrement espacés et reliés entre eux par de l'ADN, appelé ADN de liaison. L'ADN de liaison est associé à une histone dite « de liaison », l'histone H1, très riche en lysine, qui lie l'ADN entrant et sortant du nucléosome (figure V.1b). La répétition des nucléosomes constitue une fibre de 30 nm de diamètre, la fibre chromatinienne (Kornberg and Lorch 1999; Luger et al. 1997; Wolffe 1995).

La particule coeur du nucléosome est un octamère d'histones, constitué d'un tétramère H3-H4 riche en arginine et situé au centre de la structure, et de deux dimères H2A-H2B, placés de part et d'autres du tétramère (figure V.1c). Les histones de la particule coeur sont constituées d'un domaine N-terminal basique et d'un domaine C-terminal globulaire. Le domaine C-terminal est impliqué dans l'interaction des histones entre elles et dans l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome. Les extrémités N-terminales des histones de coeur, riches en résidus arginine et lysine, forment des bras flexibles à l'extérieur du nucléosome qui interagissent avec les charges négatives de l'ADN, ainsi qu'avec des facteurs pouvant être impliqué dans différentes fonctions de la chromatine (Hansen et al. 1998; Luger and Richmond 1998).

L'histone H1 est constituée de trois domaines : une partie centrale globulaire, et deux domaines basiques N- et C-terminaux. Les acides aminés des deux domaines basiques peuvent être phosphorylés ou ADP-ribosylés.

Il existe deux types d'histones :

i/ Les histones canoniques, qui sont synthétisées et incorporées au cours de la réplication d'ADN ;

ii/ les variants d'histones, dont certains sont somatiques et d'autres spécifiques du testicule (Govin et al. 2004; Wolffe 1995).

5.2 Rôle de l'épigénome dans la cellule somatique

L'information épigénétique est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, mais également dans de nombreux processus cellulaires, comme la différenciation et la prolifération (Khorasanizadeh 2004; Turner 2002).

Pendant longtemps, le seul support moléculaire connu de l'épigénome était la méthylation de l'ADN. Il s'agit d'une modification chimique covalente qui aboutit à l'addition d'un groupement méthyl sur un résidu cytosine de l'ADN. Cette méthylation se produit essentiellement au niveau d'enchaînements 5'CG3', appelés îlots CpG, et fait intervenir les DNA methyl-transférases (DNMT). Cette méthylation est principalement localisée au niveau des régions génomiques répétées comme l'ADN satellite, et les éléments parasites comme les séquences virales et rétrovirales. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN réprime la transcription des gènes en inhibant directement la liaison de certains facteurs de transcription, ou indirectement via le recrutement de protéines qui se lient aux îlots CpG méthylés. La méthylation de l'ADN est impliqué dans la régulation de nombreux processus fondamentaux, comme le contrôle de la transcription des gènes, le développement embryonnaire, l'empreinte génomique, ou l'inactivation du chromosome X (Bird 2002).

On sait maintenant que la chromatine est également porteuse de nombreuses marques épigénétiques. La présence de variants d'histones et les modifications post-traductionnelles des histones conditionnent la fonctionnalité de la chromatine et interagissent avec de nombreux processus cellulaires. Les histones de cœur notamment peuvent être porteuses de modifications post-traductionnelles au niveau de différents résidus qui sont :

i/ pour les résidus lysine : l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoïlation et la biotinylation ;

ii/ pour les résidus arginine : la méthylation ;

iii/ pour les résidus sérines et thréonines : la phosphorylation ;

iv/ pour les résidus acide glutamique : l'ADP ribosylation (Khorasanizadeh 2004).

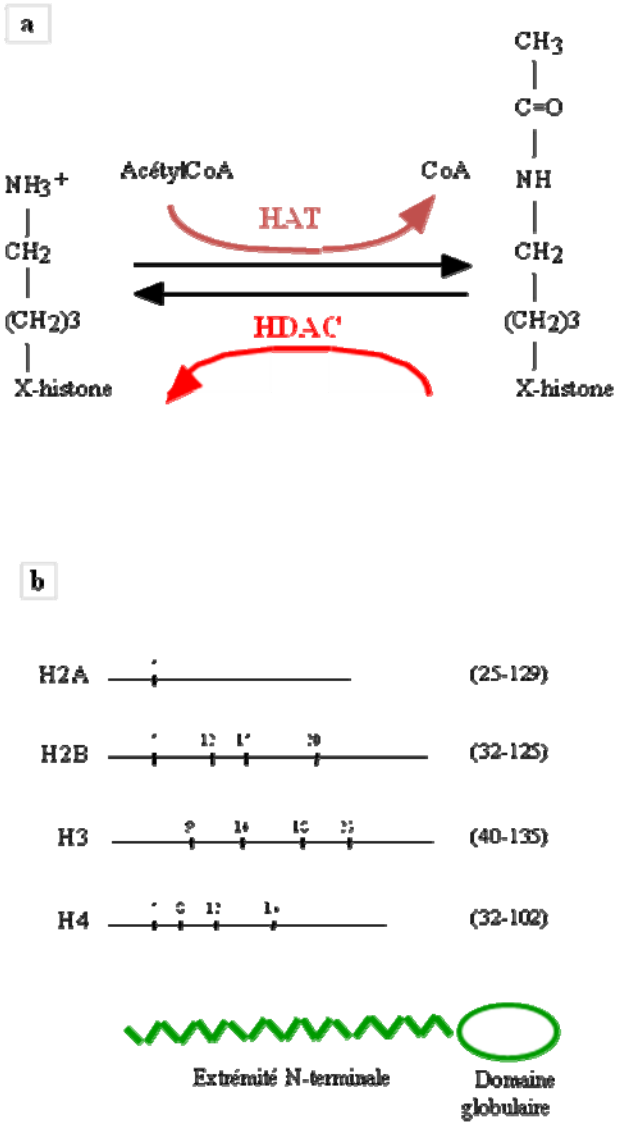

Figure V.2 : le processus d'acétylation des histones

a- Réaction d 'acétylation des résidus lysine des histones cœur du nucléosome.
Les histones acétyl transférases (HAT) catalysent le transfert d 'un résidu acétyl sur le résidu lysine
de l 'histone, les histones déacétylases (HDAC) catalysent la réaction inverse.
b- Les différents sites d 'acétylation (résidus lysine) des extrémités N-terminales des histones.

Il a été proposé que les différentes combinaisons de ces modifications constituent un code épigénétique, le « code histones », lu et interprété par une machinerie spécifique capable d'agir sur ces modifications (Strahl and Allis 2000).

Parmi les modifications post-traductionnelles des histones, l'acétylation des résidus lysine a été très étudiée.

5.3 Acétylation des histones dans la cellule somatique

L'acétylation est un processus réversible s'effectuant spécifiquement au niveau des résidus lysine des extrémités N-terminales des histones. L'histone H1 existe exclusivement sous forme non acétylée. L'histone H2A ne présente qu'une forme monoacétylée au niveau de la lysine 5. Les histones H2B, H3 et H4 peuvent être mono-, di-, tri- ou tétra-acétylées au niveau des résidus lysine suivants (figure V.2b) :

i/ 5, 12, 15, et 20 pour H2B;

ii/ 9, 14, 18 et 23 pour H3;

iii/ 5, 8, 12, et 16 pour H4 (Thorne et al. 1990).

L'état d'acétylation des histones dépend de deux types d'enzymes à activité antagoniste : les histones acétyl-transférases (HATs), qui transfèrent un groupement acétyl de l'acétyl coenzyme A sur les résidus lysine des histones de coeur, et les histones déacétylases (HDACs) qui catalysent la déacétylation de ces structures (figure V.2a). Les histones sont présentes sur toute la longueur du génome, mais l'acétylation et la déacétylation sont ciblées par le recrutement de complexes enzymatiques à activité HAT ou HDAC au niveau de promoteurs particuliers associés aux nucléosomes cibles (Strahl and Allis 2000; Taddei and Almouzni 1997).

Dans la cellule somatique, les modifications du degré d'acétylation des histones sont impliquées dans différents événements cellulaires, comme le remodelage et l'assemblage de la chromatine, et la régulation de l'expression de gènes. D'une manière générale, l'acétylation des histones semble être associée à une

chromatine active et décompactée, et la déacétylation à une chromatine compactée et inactive (Khorasanizadeh 2004; Strahl and Allis 2000; Turner 2002). Chez les mammifères par exemple, la chromatine du chromosome X inactif féminin est hypoacétylée (Jeppesen and Turner 1993; Keohane et al. 1996). Chez la drosophile, l'hétérochromatine est constituée de l'histone H4 sous forme monoacétylée au niveau de la lysine 12 (Turner et al. 1992).

Il est désormais connu que de nombreux co-activateurs transcriptionnels possèdent une activité HAT intrinsèque ou associée, comme par exemple le complexe p300/CBP (CREB binding protein) et P/CAF (p300/CBP associated factor) (Grunstein 1997). Inversement, de nombreux co-répresseurs de transcription ont une activité HDAC. Les complexes régulateurs de transcription fonctionnent donc en modifiant le degré d'acétylation des histones associées aux gènes cibles. Les changements structuraux entraînés par ces modifications d'acétylation pourraient moduler la transcription des gènes selon plusieurs mécanismes, qui restent encore à élucider (Hansen et al. 1998; Kornberg and Lorch 1999; Kuo and Allis 1998; Luger and Richmond 1998; Taddei and Almouzni 1997).

En neutralisant les charges positives des résidus lysine des histones, l'acétylation pourrait diminuer leur interaction avec l'ADN par déplacement des extrémités N-terminales, et/ou modifier les contacts histones-histones et histones-protéines non histones de la chromatine. Ainsi, le processus d'acétylation pourrait modifier la conformation des nucléosomes ou agir à un niveau supérieur en entraînant une décondensation de la fibre chromatinienne, ce qui faciliterait l'accessibilité des gènes cibles à la machinerie de transcription (Hansen et al. 1998; Kornberg and Lorch 1999; Luger and Richmond 1998).

Par ailleurs, les extrémités N-terminales plus ou moins acétylées pourraient servir de signal pour recruter sur les nucléosomes cibles des complexes régulateurs de transcription (Strahl and Allis 2000). Par exemple, les protéines contenant un motif particulier, le bromodomaine, ont la capacité de lier la chromatine acétylée, et pourraient alors participer au recrutement de la machinerie transcriptionnelle, induisant l'activation de la transcription (Dhalluin et al. 1999; Jacobson et al. 2000).

Ainsi, l'acétylation ciblée des histones nucléosomales par recrutement d'un co-activateur à activité HAT permettrait la transcription du gène en modifiant localement la conformation de la chromatine, et/ou en servant

de signal pour d'autres complexes. Le recrutement d'un co-répresseur à activité HDAC permettrait le retour à la configuration initiale de la chromatine, ou le relargage des complexes recrutés, entraînant une inhibition de la synthèse d'ARNm (Wade et al. 1997). Par ailleurs, les HAT et HDAC pourraient avoir comme cible d'autres protéines que les histones, comme des facteurs de transcription ou des protéines non histones de la chromatine (Grunstein 1997; Luger and Richmond 1998; Taddei and Almouzni 1997).

L'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle aux régions cibles est également modulée par des facteurs de remodelage de la chromatine. Ces facteurs, qui présentent une activité ATPasique, peuvent déplacer les nucléosomes dans les régions des gènes cibles, rendant ainsi l'ADN plus accessible. Ceux-ci agiraient en collaboration avec le processus d'acétylation/déacétylation des histones (Kornberg and Lorch 1999; Luger and Richmond 1998; Taddei et al. 2000).

Dans la cellule somatique, les processus d'acétylation/déacétylation des histones sont également impliqués dans l'assemblage de la chromatine. Au cours de la phase S du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et l'assemblage *de novo* des nucléosomes sur l'ADN naissant sont concomittants. Les histones nouvellement synthétisées dans le cytoplasme cellulaire pénètrent dans le noyau et sont incorporées dans les brins d'ADN filles en plusieurs étapes, à l'aide de facteurs d'assemblage. Ainsi, l'histone H4 naissant est acétylée par une HAT de type B dans le cytoplasme cellulaire au niveau des lysines 5 et 12. Le tétramère d'histones H3-H4 s'associe à l'ADN naissant dans un état acétylé, par l'intermédiaire d'un complexe multi-protéique appelé CAF-1 (chromatin assembly factor 1). Deux dimères H2A-H2B sont ensuite ajoutés pour former la particule coeur du nucléosome, avant une déacétylation rapide de la chromatine naissante (Adams and Kamakaka 1999; Sobel et al. 1995; Taddei et al. 2000).

L'acétylation des histones est aussi un évènement caractérisant les étapes initiales de la restructuration post-méiotique du génome haploïde.

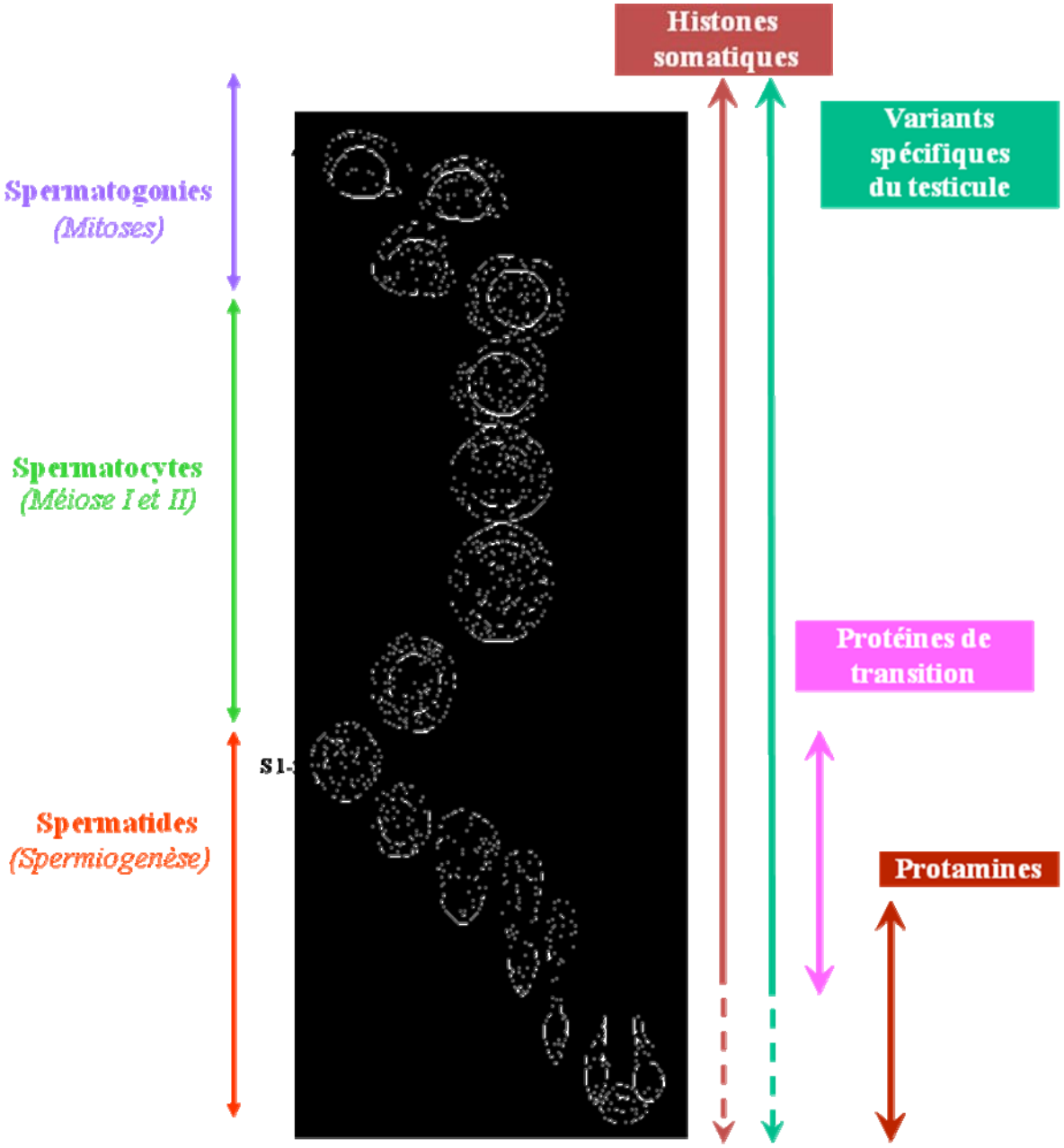

Figure V.3 : remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse humaine : variations du contenu en nucléoprotéines.

5.4 Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermiogenèse

La spermatogenèse est caractérisée par des modifications très importantes de l'épigénome des cellules germinales, en particulier au cours de la maturation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes. En effet, au cours de l'élongation et de la condensation du noyau des spermatides, la majorité des histones est enlevée et remplacée par d'autres protéines basiques spécifiques du testicule, les protéines de transition (TP) puis les protamines (figure V.3). Les protamines sont responsables de la compaction à l'extrême du génome dans une structure très spécifique au noyau spermatique. Ainsi, dans le noyau spermatique humain, 85% des histones sont remplacées par les protamines (Tanphaichitr et al. 1978). Un remodelage chromatinien différent peut être observé chez d'autres espèces. C'est le cas de la souris dont le noyau spermatique est dépourvu d'histones car celles-ci sont complètement remplacées par les protamines, ou de la carpe dont les histones ne sont pas remplacées et persistent dans le noyau du spermatozoïde.

Parallèlement à cette condensation chromatinienne se produit un arrêt des processus de transcription cellulaire au début de l'élongation des spermatides (Kierszenbaum and Tres 1975, 1978). Le noyau du spermatozoïde est un noyau au repos, transcriptionnellement inactif (Ward 1994). Cette mise au repos du génome est réversible. En effet, lors de la fécondation d'un ovocyte, le pro-noyau mâle subit une décondensation chromatinienne, en même temps qu'une reprise des activités transcriptionnelle et de réplication.

Les mécanismes impliqués dans cette réorganisation majeure et globale de la chromatine sont encore très mal connus à l'heure actuelle. Parmi les facteurs pouvant intervenir dans ce processus, deux éléments pourraient jouer un rôle fondamental : l'incorporation massive de variants d'histones, incluant les variants spécifiques du testicule (Govin et al. 2004), et l'hyperacétylation des histones dans les spermatides en élongation (Rousseaux et al. 2005). Ces deux modifications majeures de l'épigénome germinal au cours de

la spermiogenèse pourraient permettre le recrutement secondaire de facteurs et/ou de complexes responsables de l'enlèvement des histones et de leur remplacement.

Les modifications de l'épigénome germinal au cours de la spermatogenèse, ainsi que la place de l'acétylation des histones au cours de ces évènements, sont décrites dans la revue (Rousseaux et al. 2005) et l'article original (Hazzouri et al. 2000) présentés en annexe.

5.4.1 Incorporation des variants d'histones au cours de la spermatogenèse

Des modifications importantes des histones somatiques ont lieu au cours de la spermatogenèse. Celles-ci sont partiellement remplacées par des variants somatiques et/ou des variants spécifiques du testicule, ou coexistent avec elles dès le stade spermatogonie (figure V.3) (Govin et al. 2004; Rousseaux et al. 2005). Plusieurs variants ont été décrits pour les histones de cœur H2A, H2B, et H3, et pour l'histone de liaison H1 . En revanche, aucun variant de l'histone H4 n'a été identifié jusqu'à présent. Ces variants ont été classés en trois catégories selon leur distribution cellulaire (Tableau V.1) :

i/ les variants qui sont présents en quantité équivalente dans les cellules somatiques et germinales;

ii/ les variants présents dans les cellules somatiques, mais en quantité beaucoup plus importante dans les cellules germinales;

iii/ les variants présents uniquement dans les cellules germinales (Meistrich 1989).

Tableau V.1 : classification des variants d'histones en fonction de leur distribution cellulaire chez les mammifères *(adapté de Meistrich, 1989)*

Histones	Variants somatiques	Variants somatiques abondants dans le testicule	Variants spécifiques du testicule
H1	H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1°	H1.1	H1t, HILS1, H1t2, Hils1
H2A	H2A.1, H2A.2, H2A.Z	H2A.X, macroH2A	TH2A
H2B	H2B.1, H2B.2, H2B.3	pas de variant	TH2B
H3	H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A	H3.3, CENP-A	TH3
H4	pas de variant	pas de variant	pas de variant

La plupart des variants d'histones sont incorporés au cours de la méiose, et ont probablement un rôle au cours de cette étape de la spermatogenèse.

Parmi les variants de l'histone de liaison H1, le variant prédominant incorporé au cours de la spermatogenèse est le variant spécifique du testicule H1t, qui apparaît tardivement au cours de la méiose, et qui a donc probablement une fonction post-méiotique.

5.4.2 Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines au cours de la spermatogenèse humaine

C'est pendant la spermiogenèse que se déroule le remplacement des histones par les TP, puis par les protamines (figure V.3).

Chez les mammifères, les gènes codant pour les TP et les protamines sont transcrits dans les spermatides rondes et les spermatides en début d'élongation : les ARNm sont maintenus dans un état de traduction réprimé et ne seront traduits que dans les stades plus avancés (Kleene 1989; Steger et al. 2000).

Chez l'homme, les TP sont des molécules basiques, riches en résidus arginine et lysine, divisées en quatre classes : HPI1(appelée aussi TP1), HPI2 (ou TP2), HPS1 et HPS2. Elles possèdent un domaine C-terminal

identique à celui des protamines P2. TP1, protéine intermédiaire de masse moléculaire la plus importante puisqu'elle contient 101 résidus, serait le précurseur structural des trois autres protéines de transition, ainsi que des protamines de la famille P2 (Alimi et al. 1993; Martinage et al. 1990; Sautiere et al. 1988).

La chronologie du remplacement des protéines de transition au cours de la spermatogenèse humaine reste controversée. D'après Steger, la protéine TP1 apparaîtrait dans les spermatides en cours d'élongation (étapes 3-4) et disparaîtrait dans les spermatides 5, alors que la protéine TP2 serait présente dès les spermatides 1 et disparaîtrait dans les spermatides 6 (Steger et al. 1998). Prigent montre la présence de TP1 et TP2 dès les spermatides 4-5, avec un signal très fort dans les spermatides en condensation (étape 6) qui décroît ensuite pour atteindre des valeurs faibles dans le noyau spermatique (Prigent et al. 1998). Cependant, ces deux études ont utilisé des techniques de détection des nucléoprotéines différentes.

Les protamines sont de petites molécules basiques riches en arginine et cystéine qui apparaissent à la fin de l'élongation des spermatides chez l'homme (étapes 4-5 de la spermiogenèse) (Le Lannic et al. 1993; Lescoat et al. 1993; Prigent et al. 1996).

Chez l'homme, elles sont divisées en deux familles de protamines, P1 et P2, qui diffèrent par leur masse moléculaire, leur composition en acides aminés et leurs séquences (Ammer et al. 1986; Gusse et al. 1986). De plus, les protamines P1 sont synthétisées sous forme mature alors que les P2 dériveraient d'un produit précurseur, la pro-protamine pHP2, qui serait en fait TP1 (Alimi et al. 1993; Martinage et al. 1990). Chez l'homme, la famille P1 est représentée par HP1, protéine de 50 acides aminés qui possède une partie centrale riche en arginine supposée être responsable de la liaison à l'ADN (Ammer et al. 1986; Balhorn 1982). Les protamines HP2, HP3, et HP4, constituent la famille P2 et possèdent respectivement 57, 54 et 58, résidus d'acides aminés. Une association de 3-4 résidus arginine est régulièrement distribuée le long de ces molécules, et la taille et la composition en acides aminés des parties N-terminales varient d'une protéine à l'autre (Arkhis et al. 1991; McKay et al. 1986).

5.4.3 Acétylation des histones au cours de la spermiogenèse

L'acétylation des histones pourrait jouer un rôle clé dans le remodelage de l'épigénome germinal au cours de la spermatogenèse, en facilitant l'enlèvement des histones et leur remplacement.

En effet, dans de nombreuses espèces animales, les histones sont globalement hyperacétylées juste avant leur remplacement par les TP et les protamines. C'est le cas chez le rat (Grimes and Henderson 1984a, 1984b; Meistrich et al. 1992; Meistrich et al. 1994), la truite (Christensen and Dixon 1982; Christensen et al. 1984), ou le coq (Oliva and Mezquita 1982). Notre équipe a montré cette hyperacétylation chez la souris et nos travaux de recherche sur cette thématique ont donné lieu à une publication originale (Hazzouri et al. 2000) et à plusieurs revues (Rousseaux et al. 2005; Rousseaux et al. 2003; Rousseaux et al. 2004; Rousseaux et al. 2006; Rousseaux et al. 2002), auxquels j'ai participé. Au cours de la spermatogenèse murine, nous avons montré que les histones de cœur présentaient des vagues successives d'acétylation. Ainsi, elles sont hyperacétylées dans les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotène, dé-acétylées au cours de la méiose et dans les spermatides rondes, pour être ensuite ré-acétylées dans les spermatides en élongation et en condensation, juste avant leur enlèvement et leur remplacement par les TP et les protamines. De manière plus détaillée, nous avons pu montrer par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre l'histone H4 acétylée que le niveau global d'H4 acétylée, faible dans les spermatides rondes, augmente très fortement au début de l'élongation. Cette modification intéresse initialement l'ensemble du noyau, puis H4 acétylée se retrouve re-localisée dans un sous compartiment plus central lors de la condensation des spermatides, avant de disparaître dans les spermatides condensées (Govin et al. 2007).

Le rôle de l'acétylation des histones dans les spermatides en élongation reste mal connu. L'acétylation des histones pourrait servir de signal pour le recrutement de facteurs et/ou de complexes permettant la réorganisation de la chromatine, l'enlèvement des histones et leur remplacement. De bons candidats sont les facteurs possédant un motif bromodomaine. L'étude fonctionnelle de BRDT (Bromodomain testis specific),

une protéine à double bromodomaine, abondante dans le testicule, a montré que celle-ci a la capacité de remodeler et compacter spécifiquement la chromatine acétylée (Pivot-Pajot et al. 2003),

Mon travail a consisté à explorer les variations d'acétylation des histones au cours de la spermatogenèse humaine normale et pathologique, ainsi que chez des patients porteurs de différents types de tumeurs testiculaires.

OBJECTIFS

L'objectif de mon travail de thèse était d'explorer le génome et l'épigénome somatique et germinal chez des hommes présentant des anomalies sévères de la spermatogenèse.

L'exploration génétique a concerné d'une part le génome somatique, et d'autre part le génome germinal.

Concernant le génome somatique, nous avons approfondi l'étude des microdélétions du chromosome Y et leur place dans les troubles de la spermatogenèse. Afin de détecter la présence éventuelle de mosaïques somatiques pour le chromosome Y microdélété chez des hommes infertiles, une technique de FISH sur métaphases lymphocytaires a été mise au point avec des sondes détectant les trois régions AZFa, b et c du chromosome Y. Nous avons étudié 44 sujets atteints d'une oligozoospermie sévère ou d'une azoospermie, et dont la recherche de microdélétion du Y était négative par technique de biologie moléculaire. Nous avons également caractérisé le remaniement du chromosome Y chez 3 patients porteurs d'un ré-arrangement complexe du chromosome Y associé à une population cellulaire 45, X, en ciblant particulièrement notre analyse sur les régions AZF. Cette étude nous a permis non seulement de préciser les points de cassure impliqués et d'affiner le caryotype de ces patients infertiles, mais aussi de mieux définir l'implication de l'anomalie du Y dans le phénotype d'infertilité.

Le génome germinal a été étudié chez des patients présentant une oligozoospermie sévère d'origine non-obstructive sans anomalie du caryotype somatique. Cette étude a été réalisée par une technique de FISH multi-couleurs permettant de détecter les aneuploïdies spermatiques. Elle a révélé l'existence de facteurs de risque cliniques et biologiques contribuant à augmenter les anomalies chromosomiques spermatiques chez ces hommes.

Concernant l'exploration de l'épigénome germinal, les données initiales manquaient sur le profil d'acétylation des histones au cours de la spermatogenèse physiologique chez l'homme et nous avons donc caractérisé ce profil par une technique d'immunohistochimie sur coupes de biopsies testiculaires humaines. L'étude du profil d'acétylation des histones chez des hommes dont la spermatogenèse est profondément altérée, comme dans les SCO par exemple, a révélé que l'acétylation des histones était probablement impliquée dans le dialogue entre cellules germinales et cellules de Sertoli, et que sa dérégulation pourrait être associée non seulement aux SCO, mais aussi a la genèse des cancers testiculaires.

RESULTATS

1. Génome et spermatogenèse

Une première partie de mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la collaboration de notre équipe à un PHRC (protocole hospitalier de recherche clinique) national multicentrique qui s'intitule : « Infertilité et microdélétion du chromosome Y : Incidence, risque de transmission et impact sur le conseil génétique, le suivi des patients et la pratique de l'ICSI ». Le but de ce PHRC était d'étudier l'impact en AMP de la recherche d'une microdélétion du chromosome Y chez des hommes présentant une infertilité sévère non-obstructive d'origine idiopathique (numération en spermatozoïdes inférieure à 5 millions par ml d'éjaculât). L'investigateur principal de ce PHRC est le Dr Rachel Levy et le promoteur le CHU de Saint-Etienne. Plusieurs centres hospitaliers universitaires d'Assistance Médicale à la Procréation ont collaboré à ce projet : Dijon (Pr C. Jimenez), Lyon (Prs JF. Guérin et H. Lejeune), Hôpital Cochin (Dr C. Patrat), Clermont-Ferrand (Dr L. Janny), et Grenoble (Drs S. Rousseaux, S. Hennebicq et AK. Faure). Trois cents patients ont été inclus dans le PHRC de 2001 à 2005 et le suivi des patients est prévu jusqu'en 2008. J'ai activement participé à l'inclusion des patients infertiles recrutés sur Grenoble et je suis responsable au niveau local de la coordination du PHRC avec les autres centres investigateurs. Nous disposons pour chacun des patients inclus d'une caractérisation clinico-biologique la plus complète possible (cf fiche clinico-biologique en annexes). Mon implication personnelle dans ce PHRC m'a permis de figurer parmi les co-auteurs d'une publication parue en 2005 dans *Fertility Sterility* (Aknin-Seifer et al. 2005) (voir annexes), ainsi que dans deux publications en cours de rédaction.

Dans le cadre de ma thèse, mon travail a consisté à approfondir l'exploration du génome somatique et germinal chez ces patients infertiles.

1.1 Exploration du génome somatique dans les troubles sévères de la spermatogenèse (Publication n° 1)

Afin d'explorer la possibilité de l'existence de mosaïque somatique pour la délétion du chromosome Y, nous avons développé des sondes permettant de détecter les trois régions AZF par une technique de FISH sur métaphases lymphocytaires. Nous avons réalisé l'analyse par FISH des régions AZF chez 44 patients azoospermiques ou oligozoospermiques, dont le caryotype était normal, et nous n'avons pas mis en évidence de mosaïque somatique pour la délétion du Y.

En revanche, cette analyse a permis d'affiner l'exploration du chromosome Y chez trois patients infertiles porteurs d'un caryotype en mosaïque 45, X/46, XY avec un chromosome Y remanié. Nous avons réalisé par PCR et par FISH sur métaphases lymphocytaires une caractérisation précise du chromosome Y remanié de ces hommes, en s'intéressant plus spécifiquement aux régions AZFa, b et c. Notre travail a non seulement permis de préciser la nature de ces ré-arrangements complexes et les points de cassure mis en jeu, mais a également contribué à mettre en lumière l'impact de ces ré-arrangements sur la fertilité des hommes porteurs d'un chromosome Y remanié.

Ce travail a été soumis en Novembre 2006 à *European Journal of Human Genetics* (Faure et al. 2006a). Il est présenté en annexe.

1.2 Exploration du génome germinal dans les troubles sévères de la spermatogenèse (Publication n°2)

Le génome des spermatozoïdes a été exploré dans une sous-population de patients recrutés dans le cadre du PHRC, qui présentent une oligozoospermie sévère. Cette étude a permis d'identifier des facteurs de risque d'une augmentation des taux d'aneuploïdie spermatique chez les patients atteints d'un trouble sévère de la spermatogenèse.

Trente et un patients présentant une atteinte sévère de la spermatogenèse (numération des spermatozoïdes inférieure à 5 millions par ml d'éjaculât) ont été inclus dans l'étude. Nous avons analysé le contenu chromosomique des noyaux spermatiques de ces patients infertiles par une technique de FISH, avec des sondes détectant les chromosomes X, Y, 18, 13 et 21. Les taux d'aneuploïdies obtenus ont été comparés à ceux de 13 témoins fertiles. La fréquence des taux d'aneuploïdie a ensuite été comparée entre plusieurs sous-groupes de patients.

Nous avons observé que près de la moitié des patients infertiles (15/31) présentent une augmentation significative des taux d'aneuploïdie spermatique pour au moins un des chromosomes analysés par rapport aux témoins fertiles (moyenne + 1,96 SD). Dans près d'un tiers des cas (9/31), il s'agit d'une augmentation des taux de disomie 21, dans près d'un tiers des cas (9/31), une augmentation des taux d'hyperhaploïdie XY, et dans 19% des cas (6/31), une augmentation des taux de disomie 13. Il existe donc chez une proportion importante de ces patients un risque augmenté de trisomie 21, de syndrome de Klinefelter ou de trisomie 13 dans la descendance éventuelle obtenue par ICSI. De plus, nous avons identifié plusieurs facteurs de risque associés à des taux d'aneuploïdie augmentés : l'intoxication tabagique, une FSH élevée, une numération en spermatozoïdes inférieure à 1 million/ml, ainsi qu'une tératozoospermie supérieure à 95%.

Ce travail, présenté en annexe, est actuellement sous presse dans *International Journal of Andrology* (Faure et al. 2006b).

2. Exploration de l'épigénome au cours de la spermatogenèse (Publication n°3)

Dans de nombreuses espèces animales, le remodelage de la chromatine observé au cours de la spermiogenèse est précédé par une hyperacétylation des histones dans les spermatides en cours d'élongation. La première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier le profil d'acétylation des histones au cours de la spermatogenèse humaine normale, et dans un deuxième temps au cours de la spermatogenèse pathologique, lorsque les tubes séminifères sont dépourvus de cellules germinales (SCO) ou lorsqu'il existe un cancer testiculaire.

Ce travail a été réalisé par immunohistochimie sur coupes paraffine de biopsies testiculaires, avec un anticorps dirigé contre l'histone H4 acétylée. Quatre patients présentant une spermatogenèse normale ont été étudiés, ainsi que 27 patients porteurs d'une atteinte sévère de la spermatogenèse de différentes étiologies, et 6 patients atteints d'une tumeur testiculaire.

Lors de la spermatogenèse normale, nous avons observé un profil d'acétylation similaire à celui d'autres espèces animales. En effet, l'histone H4 a été détectée sous sa forme acétylée dans le noyau des spermatides en élongation, juste avant leur remplacement par les TP puis les protamines.

Dans le cas des SCO ou lorsque les tubes séminifères étaient dépourvus de spermatocytes et/ou de spermatides, les cellules de Sertoli présentaient une hyperacétylation massive et globale de leur noyau. Nous avons observé le même profil d'acétylation dans le noyau des cellules de Sertoli lorsque les tubes séminifères étaient dépourvus de cellules germinales mais porteurs de CIS.

Ces résultats suggèrent que l'hyperacétylation observée dans les spermatides en élongation au cours de la spermiogenèse pourrait faire partie d'une voie de signalisation entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Nos données suggèrent que cette voie pourrait être dérégulée lors d'une anomalie sévère de la spermatogenèse. Cette dérégulation pourrait participer à la cancérogenèse des tumeurs germinales du testicule.

Ce travail a été publié en 2003 dans *Molecular Human Reproduction* (Faure et al. 2003). Il est présenté en annexe.

DISCUSSION

Mes travaux ont permis d'approfondir l'exploration du génome et de l'épigénome germinal des hommes présentant un trouble sévère de la spermatogenèse. Quel est l'apport de ce travail et quelles en sont les implications en recherche et dans le domaine médical ?

1. Génome et spermatogenèse

1.1 Exploration du génome somatique dans les troubles sévères de la spermatogenèse

Concernant l'exploration des ré-arrangements somatiques du chromosome Y chez les hommes infertiles, ma première hypothèse était que certains patients, dont le caryotype somatique est normal, pouvaient présenter un Y microdélété à l'état de mosaïque somatique (et germinale), non détectable par les techniques d'analyse moléculaire. Nous avons donc utilisé une approche par FISH sur métaphases lymphocytaires chez 44 patients infertiles afin de détecter la présence des trois régions AZFa, b et c avec des sondes spécifiques de ces trois régions. Cette étude n'a révélé aucune mosaïque somatique pour la délétion du chromosome Y chez aucun des patients infertiles étudiés. Ces résultats sont en accord avec ceux de Le Bourhis et collaborateurs (Le Bourhis et al. 2000) qui ont étudié par FISH 47 patients infertiles, et qui n'ont mis en évidence aucune mosaïque somatique pour le locus DAZ. Ce résultat suggère que, si une mosaïque somatique pour la délétion du Y existe, sa fréquence n'est pas très élevée chez les hommes infertiles, ou le nombre de cellules porteuses d'un Y délété est faible.

Nous avons utilisé la même approche pour affiner l'analyse du chromosome Y remanié chez trois patients présentant une anomalie structurale du chromosome Y détectée au niveau du caryotype (Faure et al. 2006a).

Notre approche, associant les données du caryotype somatique à une étude moléculaire et une analyse par FISH sur métaphases du chromosome Y, a permis la caractérisation précise du remaniement du chromosome Y chez ces trois patients présentant une azoospermie ou une cryptozoospermie d'origine non-obstructive. Dans tous les cas, nous avons montré que ces ré-arrangements étaient associés à une mosaïque somatique avec une deuxième population cellulaire 45, X, et une microdélétion d'une ou plusieurs régions AZF. De plus, l'identification précise des points de cassure impliqués dans le remaniement nous a permis de discuter l'implication des régions AZF dans l'apparition de ces remaniements et dans la fertilité des hommes atteints.

Les données actuelles de la littérature montrent que la plupart des ré-arrangements du chromosome Y, notamment idic(Y) et r(Y), sont associés à une mosaïque 45, X (Alvarez-Nava and Puerta 2006; Hsu 1994; Jaruzelska et al. 2001; Patsalis et al. 2005; Siffroi et al. 2000). Les phénotypes des patients vont du phénotype masculin, au phénotype féminin, en passant par différents stades d'ambiguïtés sexuelles (Abdelmoula and Amouri 2005; Hsu 1994; Tuck-Muller et al. 1995). La corrélation entre le génotype et le phénotype est rendue difficile du fait de la variabilité dans le degré de la mosaïque, mais également de la diversité des points de cassure impliqués dans les remaniements du chromosome Y. La plupart des patients porteurs d'un idic(Y) sont de petite taille (Abdelmoula and Amouri 2005; Tuck-Muller et al. 1995). Chez les individus de phénotype féminin, il peut exister des stigmates de syndrome de Turner. Des cas de gonadoblastome ont également été rapportés. Les individus masculins sont souvent porteurs d'un hypospade, et le plus souvent azoospermiques. Dans de rares cas, il a été décrit un

retard mental et deux patients sont atteints de schizophrénie (Nanko et al. 1993; Yoshitsugu et al. 2003). Parmi les patients de phénotype masculin porteurs d'un r(Y), différentes anomalies phénotypiques peuvent être observées : petite taille, hypotrophie testiculaire, micro pénis, hypospade, azoospermie.

La structure du chromosome Y remanié pourrait influencer de manière indirecte la proportion de cellules 45, X. Par exemple, dans le cas des idic(Y), la position du point de cassure au niveau du bras long du chromosome Y pourrait influencer la stabilité mitotique du chromosome Y. Stuppia et collaborateurs (Stuppia et al. 1996) suggèrent que plus le point de cassure est situé dans la partie proximale, plus le chromosome Y serait instable, entraînant une perte du chromosome Y remanié au cours des divisions cellulaires, et donc une proportion plus importante de cellules 45, X. Les microdélétions du chromosome Y entraîneraient également une instabilité mitotique accrue du chromosome Y, ce qui conduirait à la formation d'une population cellulaire 45, X (Alvarez-Nava and Puerta 2006; Jaruzelska et al. 2001; Patsalis et al. 2005; Siffroi et al. 2000). Ainsi, le chromosome Y isodicentrique pourrait être issu d'un chromosome Y rendu instable par une délétion complète de la région AZFc (Vogt 2004). Les microdélétions du chromosome Y pourraient donc être considéré comme des « pré-mutations » responsables d'une perte ultérieure du chromosome Y. Ces données sont confortées par les travaux de Patsalis et collaborateurs qui ont recherché une microdélétion du chromosome Y chez 12 patients porteurs d'un caryotype somatique en mosaïque 45, X/46, XY et présentant des stigmates de syndrome de Turner et/ou une ambiguïté sexuelle. Ils ont montré que, dans un tiers des cas, il existait une microdélétion de la région AZFc du chromosome Y (Patsalis et al. 2002). Nos résultats sont en accord avec ces données, puisque les trois patients sont tous porteurs d'une microdélétion du chromosome Y en association avec un caryotype en mosaïque 45, X/46, XY.

Concernant le chromosome Y en anneau, Lin et collaborateurs ont étudié deux patients présentant une azoospermie non obstructive dont le caryotype avait mis en évidence un r(Y)

avec une délétion en Yq (Lin et al. 2004). Le premier patient présentait une mosaïque somatique avec 45% des cellules 45, X, et une délétion englobant la majeure partie du bras long du chromosome Y, incluant les trois régions AZF. Le second patient présentait un caryotype homogène et une délétion des régions AZFb et c. Plus récemment, Bertini et collaborateurs (Bertini et al. 2005) ont décrit deux patients présentant une azoospermie et un caryotype en mosaïque, avec un r(Y) similaire au patient que nous avons étudié. Le premier présentait une délétion englobant la partie terminale de la région AZFb et la totalité de la région AZFc, le deuxième présentait une délétion des trois régions AZF.

Mon travail confirme non seulement les données de la littérature concernant l'instabilité du chromosome Y lors des ré-arrangement structuraux, mais explore également l'intérêt d'une analyse précise de la structure du chromosome Y remanié, en particulier concernant la présence ou l'absence des régions AZF. Dans ce cadre, l'analyse moléculaire des régions AZF par technique PCR constitue une technique sensible qui permet la localisation précise des points de cassure. Cependant, elle ne permet pas de visualiser une éventuelle mosaïque pour la délétion du Y. L'analyse par FISH sur métaphases lymphocytaires avec des sondes spécifiques des trois régions AZF est une technique originale qui permet la visualisation des régions AZF dans les métaphases des patients. Cette approche constitue un outil très intéressant d'analyse des régions AZF, puisqu'il permet de détecter une éventuelle mosaïque pour la délétion du Y. Ainsi, la mise en évidence d'une mosaïque pour la délétion en AZFb chez l'un des patients infertiles porteur d'un r(Y) suggère que la taille de la région délétée pourrait s'aggraver lors des divisions cellulaires, et entraîner la transmission d'une délétion plus importante à la descendance.

1.2 Exploration du génome germinal dans les troubles sévères de la spermatogenèse

Une autre hypothèse de mon travail de thèse est qu'une perturbation quantitative sévère de la spermatogenèse pourrait être associée à une plus grande fréquence de non-disjonctions méiotiques, et donc à la production d'une plus grande proportion de spermatozoïdes porteurs d'anomalies chromosomiques.

Nous avons en effet montré que les taux d'aneuploïdies spermatiques sont augmentés dans près de la moitié des cas chez des hommes porteurs d'une oligozoospermie sévère d'origine non-obstructive. Ainsi, ces patients risquent de transmettre une trisomie 21, un syndrome de Klinefelter ou une trisomie 13 à l'éventuelle descendance obtenu en ICSI. Ces résultats confirment des données déjà publiées (Egozcue et al. 2005; Miharu 2005; Sarrate et al. 2005), et sont concordants avec l'augmentation des anomalies chromosomiques *de novo* observée chez les enfants nés par ICSI (Bonduelle et al. 2002; In't Veld et al. 1995; Liebaers et al. 1995).

De plus, nos résultats montrent que seule une partie des patients oligozoospermiques est affectée par une augmentation des taux d'aneuploïdies spermatiques, et que cette augmentation n'implique que certains des chromosomes analysés. Nous avons donc tenté d'identifier des facteurs cliniques et/ou biologiques qui seraient associés à une augmentation des taux d'aneuploïdies spermatiques au sein de cette population d'hommes infertiles. Nous avons identifié plusieurs facteurs associés de manière significative à une augmentation des taux de disomies spermatiques de certains chromosomes : l'intoxication tabagique, une FSH élevée, une oligozoospermie sévère de moins de 1 million de spermatozoïdes par ml d'éjaculât, et une tératozoospermie supérieure à 95%. Bien que cette notion ait déjà été mise en évidence dans la littérature, cette analyse conjointe de l'association des taux d'aneuploidies avec plusieurs facteurs clinico-biologiques dans le contexte d'une oligozoospermie sévère non-obstructive est originale.

Dans la littérature, il a été montré une augmentation des taux d'aneuploïdie spermatique chez les patients présentant une numération basse en spermatozoïdes (Martin et al. 2003; Shi and

Martin 2001a). Par exemple, Vendrell et collaborateurs ont montré qu'une numération en spermatozoïdes inférieure à 1 M/ml dans l'éjaculât, et/ou une FSH supérieure à 10 UI/l, étaient prédictives d'anomalies méiotiques (Vendrell et al. 1999). De plus, l'analyse des taux d'aneuploïdies spermatiques, réalisée chez des hommes ayant eu une exploration chirurgicale, a mis en évidence des taux d'aneuploïdies spermatiques plus élevés dans les spermatozoïdes épididymaires et testiculaires comparés aux spermatozoïdes éjaculés (Burrello et al. 2005). Ainsi, il apparaît probable que plus l'atteinte de la spermatogenèse est sévère, plus le risque de mal-ségrégation méiotique est élevé. En revanche, d'autres études n'ont pas retrouvé de corrélation entre les taux d'aneuploïdie et les numérations spermatiques (Damri et al. 2000; Miharu et al. 1994; Schultz et al. 2000).

En ce qui concerne le lien entre taux d'aneuploïdie et morphologie spermatique, les données de la littérature sont contradictoires (pour revue, voir (Shi and Martin 2001a; Sun et al. 2006). Certaines anomalies morphologiques, affectant la tête et/ou l'acrosome des spermatozoïdes, pourraient être associé à une augmentation des taux de disomie (Machev et al. 2005; Sun et al. 2006). La seule situation où il existe un lien direct entre tératozoospermie et aneuploïdies spermatiques concerne les patients porteurs de spermatozoïdes macrocéphales poly-flagelles, puisqu'il a été mis en évidence que ces spermatozoïdes anormaux étaient tous polyploïdes ou aneuploïdes (Devillard et al. 2002).

Plusieurs autres facteurs de risque d'une augmentation des taux d'aneuploïdies spermatiques ont été identifiés, comme l'âge avancé (Sloter et al. 2004), ou certains modes de vie, comme le tabac ou l'alcool (Robbins et al. 2005). Ainsi, Rubes et collaborateurs (Rubes et al. 1998) ont montré une augmentation des taux de disomie X, Y et 8 chez des fumeurs dont le statut de fertilité n'était pas connu. De même, Shi et collaborateurs ont montré une augmentation des taux de disomie 13 chez les fumeurs comparés à une population de non-fumeurs. Aucune

différence significative n'a en revanche été constatée pour les taux de disomie 21 et les hyperhaploidies XY (Shi et al. 2001b).

Peu d'études se sont intéressées à l'impact des pesticides sur les taux d'aneuploïdie spermatique, et leurs résultats sont contradictoires (pour revue voir (Harkonen 2005; Martin 2006)). Certaines études n'ont pas rapporté d'augmentation des taux d'aneuploïdie pour les chromosomes analysés. D'autres ont mis en évidence au contraire une augmentation significative. Il semblerait qu'un effet dose puisse expliquer ces discordances.

Ainsi, nos résultats, combinés aux données de la littérature, montrent qu'une analyse chromosomique par FISH des spermatozoïdes est pertinente chez les patients porteurs d'une oligozoospermie sévère d'origine non-obstructive avant prise en charge en technique d'ICSI. Cependant, il paraît difficile en pratique de réaliser une analyse par FISH des spermatozoïdes chez tous ces patients dans le cadre du bilan pré-ICSI. L'identification de facteurs de risque permet de cibler les patients pour lesquels il serait souhaitable de réaliser cette analyse. Elle pourrait également permettre dans certaines situations de conseiller les patients concernés, afin de diminuer les taux de disomie spermatique avant une prise en charge en ICSI, comme l'arrêt d'une exposition au tabac ou à un toxique. D'autres facteurs favorisant la diminution des taux d'aneuploïdie spermatique pourraient également être identifiés dans un futur proche. Par exemple, une étude a rapporté une diminution des taux d'aneuploïdie spermatique chez des patients ayant bénéficié de médecine Chinoise (Tempest et al. 2005).

2. Exploration de l'épigénome au cours de la spermatogenèse

En ce qui concerne l'étude de l'épigénome germinal, mes travaux ont montré que chez l'homme, comme dans d'autres espèces, une acétylation globale des histones précède leur enlèvement et leur remplacement au cours de la spermiogenèse. Une hyperacétylation massive de l 'histone H4 a en effet lieu dans les spermatides depuis le début de leur élongation jusqu'à leur condensation, moment où les histones sont enlevées. De manière surprenante, lorsque la spermatogenèse est absente (SCO) ou très sévèrement altérée, nous observons une perturbation importante du profil d'acétylation des histones dans les cellules de Sertoli. En effet, le noyau des cellules de Sertoli est peu ou pas acétylé au cours de la spermatogenèse physiologique. En revanche, nous observons que le noyau des cellules de Sertoli présente une hyperacétylation globale et massive en l'absence de cellules méiotiques et post-méiotiques. Cette observation est faite chez tous les patients analysés, et donc dans des contextes pathologiques différents. Ceci suggère que l'hyperacétylation globale des histones pourrait faire partie d'une voie de signalisation importante dans le dialogue entre cellules de Sertoli et cellules germinales, qui serait dérégulée lorsque la spermatogenèse est très sévèrement altérée. De plus, la même hyperacétylation globale du noyau affecte les cellules de Sertoli présentes au sein de tubes séminifères dépourvus de cellules germinales, mais porteurs de cellules CIS, précurseurs supposés des cancers testiculaires. Une hypothèse serait que l'hyperacétylation anormale des cellules de Sertoli ait un effet dérégulateur global des signaux envoyés aux cellules germinales, favorisant ainsi la tumorigenèse. Nos travaux nous conduisent à émettre l'hypothèse d'un lien moléculaire entre les anomalies de la spermatogenèse (et plus particulièrement les SCO), et les

cancers du testicule, qui impliquerait le processus d'acétylation des histones. Or ces deux entités ne sont associées actuellement que d'un point de vue clinique et épidémiologique, dans le cadre du TDS.

Afin d'explorer le lien entre l'absence de cellules germinales au sein des tubes séminifères et l'hyperacétylation massive et globale observée dans le noyau des cellules de Sertoli, nous avons étudié chez la souris différentes situations associant une déplétion en cellules germinales : des souris pré-pubères, des souris traitées par un agent alkylant, le busulfan, et enfin des souris génétiquement modifiées qui ne produisent pas de cellules germinales mâles (souris X, O Sry +, en collaboration avec Paul Burgoyne, Mill Hill, UK). L'acétylation de l'histone H4 a été analysée en immunohistochimie sur des coupes testiculaires de souris prépubères au 6ème, 9ème, et 16ème jour après la naissance. A aucun de ces stades les cellules de Sertoli ne montraient une hyperacétylation. Des souris adultes traitées au Busulfan, dont les cellules germinales avaient totalement disparu des tubes séminifères, n'ont pas montré d'augmentation du niveau d'acétylation d'H4 dans les cellules de Sertoli. Enfin, chez des souris mâles génétiquement incapables de produire des cellules germinales et présentant des testicules de type SCO, nous n'avons pas non plus observé d'hyperacétylation d'H4 dans les cellules de Sertoli. Ainsi, la seule absence des cellules germinales n'est pas suffisante pour induire l'hyperacétylation globale des cellules de Sertoli. Celle-ci n'est pas observée non plus au sein des cellules de Sertoli en divisions mitotiques actives, comme par exemple lors de la période pré-pubertaire. Il est cependant probable qu'aucun des trois « modèles » murins étudiés ne correspond à la situation des SCO observée chez les patients.

Ces résultats amènent plusieurs informations fondamentales concernant l'hyperacétylation que nous avons observée au cours de la spermatogenèse pathologique chez l'homme. Premièrement, cette hyperacétylation n'est pas une voie de signalisation impliquée dans le développement

testiculaire normal chez la souris. Deuxièmement, la seule absence des cellules méiotiques et post-méiotiques au sein des tubes séminifères n'est pas suffisante pour induire le phénotype d'hyperacétylation. Troisièmement, ce phénotype est probablement corrélé à une déplétion secondaire et à long terme des cellules germinales au sein des tubes séminifères.

Notre hypothèse est que cette voie pourrait être spécifiquement reliée à une anomalie de la différenciation testiculaire aux stades précoces du développement embryonnaire, au moment de la mise en place du dialogue entre cellules germinales et cellules de Sertoli au sein du testicule en formation. Nos résultats, associés à la mise en évidence du rôle de certains produits toxiques, comme les perturbateurs endocriniens, confortent l'hypothèse de Skakkebaeck et collaborateurs sur la mise en place du TDS. L'organisation cellulaire au sein des tubes séminifères en formation dans le testicule fœtal paraît essentielle dans la genèse du TDS (Sharpe 2006; Sharpe et al. 2003a). Ainsi, ce syndrome pourrait être la résultante d'une dérégulation *in utero* d'une seule et même voie de signalisation moléculaire. C'est cette dérégulation qui serait impliquée dans les troubles de la différenciation testiculaire, les atteintes de la spermatogenèse et la carcinogenèse.

Dans la cellule somatique, l'acétylation des histones est connue pour être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, et d'autres processus importants de régulation cellulaire (Khorasanizadeh 2004; Turner 2002). Une augmentation globale de l'acétylation des histones, telle que celle observée dans les cellules de Sertoli dans le contexte d'une perturbation sévère de la spermatogenèse, pourrait donc perturber la signalisation locale et entraîner, dès les étapes de différenciation *in utero* dans la gonade en formation, soit l'apoptose des PGC, entraînant la formation de tubes SCO, soit une anomalie de la différenciation des PGC, lesquelles évolueraient plus tard en cellules CIS, précurseurs présumés des cancers testiculaires. Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

Afin de mieux comprendre les causes et conséquences de l'hyperacétylation des histones observée dans les cellules de Sertoli des patients présentant un SCO, plusieurs approches sont envisagées.

L'une d'elle consiste à étudier un modèle murin de SCO plus proche de la physiopathologie des SCO observés chez les patients. Par exemple, des souris cryptorchides ou traitées *in utero* avec des perturbateurs endocriniens pourraient être un bon modèle d'étude.

L'autre consiste à explorer les autres éléments connus de la voie de signalisation par l'acétylation des histones, comme par exemple les HDACs et les HATs dont l'équilibre définit le niveau d'acétylation global dans les cellules. Nous avons montré chez la souris que le niveau d'expression de plusieurs HADCs diminuait de manière très significative dans les spermatides en cours d'élongation, au moment même où nous observons l'hyperacétylation des histones dans ces cellules (Hazzouri et al. 2000; Rousseaux et al. 2003; Rousseaux et al. 2002). De plus, alors que les histones sont normalement hypoacétylées dans les spermatides rondes, un traitement par un inhibiteur des HDACs entraîne une augmentation globale de leur acétylation, suggérant que les HDACs sont importantes pour le maintien d'un faible niveau d'acétylation dans ces cellules. Ainsi, une hypothèse est qu'une dérégulation de la balance HATs/HDACs pourrait intervenir dans l'hyperacétylation des cellules de Sertoli observée chez les patients présentant un SCO.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse avait pour but d'approfondir l'exploration du génome et de l'épigénome somatique et germinal chez les patients atteints d'un trouble sévère de la spermatogenèse. Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour la prise en charge des patients infertiles, notamment dans le cadre de l'ICSI.

Concernant l'exploration du génome somatique, nos travaux montrent que, si elles existent, les mosaïques somatiques pour la délétion du chromosome Y constituent un événement rare. Elles ne peuvent par conséquent pas expliquer des infertilités masculines chez des patients dont la recherche d'une microdélétion s'est révélée négative par technique de biologie moléculaire. Par ailleurs, la caractérisation précise des ré-arrangements du chromosome Y chez les hommes infertiles porteur d'un Y remanié a montré tout son intérêt pour affiner le caryotype de ces patients, qui peut être initialement erroné ou incomplet. De plus, la recherche des régions AZF apporte des arguments pouvant orienter la décision lorsqu'une indication de biopsie testiculaire est discutée.

Concernant le génome germinal, nos travaux montrent que les taux d'aneuploïdies spermatiques sont fréquemment élevés chez les hommes présentant une atteinte sévère de la spermatogenèse, en particulier dans certaines circonstances cliniques et/ou biologiques que nous avons identifiées. Ces données nous amènent à recommander la réalisation d'une analyse chromosomique des spermatozoïdes par FISH avant toute prise en charge en ICSI de ces patients, lorsqu'un ou des facteurs de risque sont identifiés. Cette analyse contribuera à

améliorer le conseil génétique que doivent recevoir ces couples en attente d'ICSI, afin de mieux apprécier le risque d'aneuploïdie encouru par leur éventuelle descendance.

Concernant l'exploration de l'épigénome germinal au cours de la spermiogenèse, nos résultats ouvrent de nombreuses perspectives de travail. Parmi elles, la recherche d'anomalies génétiques dans les gènes codant pour des facteurs de réorganisation post-méiotique de la chromatine pourrait permettre d'expliquer certains cas d'infertilité masculine.

Parmi eux, BRDT est un bon candidat puisqu'il a la capacité de compacter la chromatine acétylée, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle clef dans l'enlèvement et le remplacement des histones au cours de la spermiogenèse (Pivot-Pajot et al. 2003). Nous avons entrepris de détecter d'éventuelles mutations dans le gène BRDT chez des patients porteurs d'une atteinte sévère de la spermatogenèse. Cette approche pourra être étendue à l'étude d'autres gènes candidats jouant un rôle dans le remodelage de l'épigénome germinal.

BIBLIOGRAPHIE

Abdelmoula NB, Amouri A (2005) [Dicentric Y chromosome]. Ann Biol Clin (Paris). 63: 363-75.

Adams CR, Kamakaka RT (1999) Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy. Curr Opin Genet Dev 9: 185-90

Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE (2004) Seeds of concern. Nature. 432: 48-52.

Aitken RJ, Skakkebaek NE, Roman SD (2006) Male reproductive health and the environment. Med J Aust. 185: 414-5.

Aknin-Seifer IE, Touraine RL, Faure AK, Fellmann F, Chouteau J, Levy R (2005) Two fast methods for detection of Y-microdeletions. Fertil Steril. 84: 740-2.

Alimi E, Martinage A, Arkhis A, Belaiche D, Sautiere P, Chevaillier P (1993) Amino acid sequence of the human intermediate basic protein 2 (HPI2) from sperm nuclei. Structural relationship with protamine P2. Eur J Biochem 214: 445-50

Almstrup K, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Ottesen AM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E (2006) From embryonic stem cells to testicular germ cell cancer--should we be concerned? Int J Androl. 29: 211-8.

Alvarez-Nava F, Puerta H (2006) Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients. Am J Med Genet A. 140: 1128-30.

Ammer H, Henschen A, Lee CH (1986) Isolation and amino-acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2. Biol Chem Hoppe Seyler 367: 515-22

Amory JK, Bremner W (2001) Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. Mol Cell Endocrinol. 182: 175-9.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science. 308: 1466-9.

Anway MD, Skinner MK (2006) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. Endocrinology. 147: S43-9.

Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1999) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. Fert Steril 72: 696-701

Arkhis A, Martinage A, Sautiere P, Chevaillier P (1991) Molecular structure of human protamine P4 (HP4), a minor basic protein of human sperm nuclei. Eur J Biochem 200: 387-92

Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol 93: 298-305

Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson AM (2006) Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 20: 77-90.

Benahmed M (1997) [Role of tumor necrosis factor in the male gonad]. Contracept Fertil Sex. 25: 569-71.

Benahmed M, Mauduit C (1999) La spermatogenèse. Médecine et biologie de la reproduction. Masson, Paris, pp 86-111

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL (1998) Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. Hum Reprod 13: 3406-3413

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL (2000) Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. Hum Reprod 15: 2165-2172

Bernardini L, Martini E, Geraedts JPM, Hopman AHN, Lanteri S, Capitanio GL (1997) Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. Mol Hum Reprod 3: 431-438

Bernstein R, Wadee A, Rosendorff J, Wessels A, Jenkins T (1986) Inverted Y chromosome polymorphism in the Gujerati Muslim Indian population of South Africa. Hum Genet. 74: 223-9.

Bertini V, Canale D, Bicocchi MP, Simi P, Valetto A (2005) Mosaic ring Y chromosome in two normal healthy men with azoospermia. Fertil Steril. 84: 1744.

Bettio D, Venci A, Rizzi N, Negri L, Setti PL (2006) Clinical and molecular cytogenetic studies in three infertile patients with mosaic rearranged Y chromosomes. Hum Reprod. 21: 972-5.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.

Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles ME (2000) Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. J Med Genet. 37: 752-8.

Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (1998) Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 13: 781-2

Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. Hum Reprod 17: 2600-14.

Bosch E, Jobling MA (2003) Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. Hum Mol Genet. 12: 341-7.

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science. 312: 596-600. Epub 2006 Mar 30.

Brennan J, Capel B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet. 5: 509-21.

Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA (1998) Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. Hum Mol Genet. 7: 97-107.

Burrello N, Vicari E, Calogero AE (2005) Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. Cytogenet Genome Res. 111: 363-5.

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R (2001b) High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. Hum Reprod 16: 1433-9.

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R (2001a) Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod 16: 1172-1179.

Carreau S (2003) Estrogens--male hormones? Folia Histochem Cytobiol. 41: 107-11.

Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S (2004) Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 6876-81. Epub 2004 Apr 23.

Chartier E (2000) Cancer du testicule. Urologie. ESTEM, Paris, pp 185-98

Christensen ME, Dixon GH (1982) Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. Dev Biol 93: 404-15

Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH (1984) Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. Nucleic Acids Res 12: 4575-92

Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat 112: 35-51

Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM (2001) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. Cell. 104: 875-89.

Czyba J-C, Montella A (1993) Testicules et épididymes. Biologie de la reproduction humaine. Sauramps médical, Montpellier, pp 49-83

Dadoune JP, Demoulin A (1991) Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses, Paris, pp 221-50

Daly-Schveitzer N (1998) Cancers urologiques. Cancérologie clinique. Masson, Paris, pp 336-61

Damri LE, Vutyavanich T, Fishel S (2000) Comparison of sex chromosome aneuploidy in spermatozoa of fertile men and those requiring ICSI treatment detected by fluorescence in situ hybridization. J Obstet Gynaecol Res 26: 181-8.

De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 1327-32. Epub 2004 Jan 26.

de Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction. 121: 347-54.

Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, Engelen K, Marchal K, Van Hummelen P, Tan KA, Sharpe RM, Saunders PT, Swinnen JV, Verhoeven G (2006) The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. Mol Endocrinol. 20: 321-34.

Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, Guichaoua M, Sele B, Rousseaux S (2002) Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. Hum Reprod 17: 1292-1298.

Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. Nature 399: 491-6

Dieckmann KP, Skakkebaek NE (1999) Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. Int J Cancer 83: 815-22

Diemer T, Desjardins C (1998) Spermatogenesis, disorders of. Encyclopedia of Reproduction, vol 4. Academic Press, San Diego, pp 546-56

Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, Nelen V, Robert E, Scott JE, Stone D, Tenconi R (1998) Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. Lancet. 352: 423-7.

Dupaix A, Pineau C, Piquet-Pellorce C, Jégou B (1996) Paracrine and autocrine regulations of spermatogenesis. Research in Male gametes : production and quality. INSERM, pp 47-63

Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F (2005) Meiotic abnormalities in infertile males. Cytogenet Genome Res 111: 337-42.

Faure AK, Aknin-Seifer I, Frérot G, Pelletier R, De Robertis C, Cans C, Levy R, Jimenez C, Lejeune H, Terrier N, Bergues U, Hennebicq S, Rousseaux S (2006b) Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligo-astheno-teratozoospermic males. Int J Androl In Press.

Faure AK, Aknin-Seifer I, Satre V, Amblard F, Devillard F, Hennebicq S, Chouteau J, Bergues U, Pelletier R, De Robertis C, Levy R, Rousseaux S (2006a) Fine mapping of re-arranged Y chromosome in three infertile patients with non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia. Eur J Human Genet. Submitted.

Faure AK, Devillard F, Sele B, Hennebicq S (2005) [The interest of the chromosomic study of spermatozoids]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 34: 1S39-43.

Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2003) Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. Mol Hum Reprod 9: 757-63

Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C (2005) Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. J Med Genet. 42: 209-13.

Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002) High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. Mol Hum Reprod 8: 286-98.

Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Floridia G, Tyler-Smith C, Vogt PH (2004) A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. Am J Hum Genet. 74: 180-7.

Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L (1998) Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. Hum Genet 102: 129-37

Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003) Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. Hum Reprod. 18: 1383-94.

Foresta C, Ferlin A, Moro E (2000) Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. Hum Mol Genet 9: 1161-9.

Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Nogueras-Ocana M, de Dios Luna-del-Castillo J, Espigares Garcia M, Olea N, Lardelli-Claret P (1996) Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. Environ Health Perspect. 104: 1090-5.

Geiman TM, Robertson KD (2002) Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? J Cell Biochem 87: 117-25.

Ginalski K, Rychlewski L, Baker D, Grishin NV (2004) Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 2305-10.

Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE (1995) Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. Ann Intern Med. 122: 778-88.

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. Eur J Biochem. 271: 3459-69.

Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. J Cell Biol In press

Graves JA, Koina E, Sankovic N (2006) How the gene content of human sex chromosomes evolved. Curr Opin Genet Dev. 16: 219-24.

Grimes SR, Jr., Henderson N (1984a) Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. Exp Cell Res 152: 91-7

Grimes SR, Jr., Henderson N (1984b) Acetylation of rat testis histones H2B and TH2B. Dev Biol 101: 516-21

Griswold MD (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Seminars in Cell and Developmental Biology 9: 411-16

Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature 389: 349-52

Gusse M, Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevaillier P (1986) Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. Biochim Biophys Acta 884: 124-34

Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997a) Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. Hum Genet. 100: 1-21.

Guttenbach M, Martinez-Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M (1997b) Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. Hum Reprod 12: 468-73

Hansen JC, Tse C, Wolffe AP (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. Biochemistry 37: 17637-41

Hardell L, Van Bavel B, Lindstrom G, Carlberg M, Eriksson M, Dreifaldt AC, Wijkstrom H, Starkhammar H, Hallquist A, Kolmert T (2004) Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood and the risk for testicular cancer. Int J Androl. 27: 282-90.

Harkonen K (2005) Pesticides and the induction of aneuploidy in human sperm. Cytogenet Genome Res. 111: 378-83.

Hartl DL, Jones EW (2003) Les bases chromosomiques de l'hérédité. Génétique : les grands principes. Troisième édition. Dunod, Paris, pp 73-119

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. Environ Mol Mutagen. 28: 167-75.

Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet. 2: 280-91.

Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. Am J Hum Genet. 49: 253-60.

Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. Eur J Cell Biol 79: 950-60.

Henderson BE, Benton B, Jing J, Yu MC, Pike MC (1979) Risk factors for cancer of the testis in young men. Int J Cancer. 23: 598-602.

Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reprod Biol Endocrinol. 1: 52.

Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE (2005) Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. Ann Oncol. 16: 863-8.

Holdcraft RW, Braun RE (2004) Hormonal regulation of spermatogenesis. Int J Androl. 27: 335-42.

Holm M, Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE (2003) Increased risk of carcinoma in situ in patients with testicular germ cell cancer with ultrasonic microlithiasis in the contralateral testicle. J Urol. 170: 1163-7.

Holsberger DR, Cooke PS (2005) Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. Cell Tissue Res. 322: 133-40.

Hsu LY (1994) Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. Am J Med Genet. 53: 108-40.

Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M (2005) Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. Hum Reprod. 20: 191-7.

Huhtaniemi I (2003) Gonadotrophin actions on the testis--genotypes and phenotypes of gonadotrophin and gonadotrophin receptor mutations. Endocr Dev. 5: 81-103.

Huhtaniemi I, Bartke A (2001) Perspective: male reproduction. Endocrinology. 142: 2178-83.

In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F (1995) Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. Lancet 346: 773.

Jacobs PA (1992) The chromosome complement of human gametes. Oxf Rev Reprod Biol. 14: 47-72.

Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. Science 288: 1422-5.

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet 33: 245-54.

Jaruzelska J, Korcz A, Wojda A, Jedrzejczak P, Bierla J, Surmacz T, Pawelczyk L, Page DC, Kotecki M (2001) Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. J Med Genet. 38: 798-802.

Jeppesen P, Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. Cell 74: 281-9

Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F (1998) The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. Mol Cell Endocrinol. 145: 3-7.

Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH (2000) Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. Hum Mol Genet 9: 2563-2572

Keohane AM, ONeill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM (1996) X-inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. Dev Biol 180: 618-630

Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. Cell. 116: 259-72.

Kierszenbaum AL, Tres LL (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. J Cell Biol 65: 258-70

Kierszenbaum AL, Tres LL (1978) RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. Fed Proc 37: 2512-6

Kirsch S, Weiss B, Miner TL, Waterston RH, Clark RA, Eichler EE, Munch C, Schempp W, Rappold G (2005) Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. Genome Res. 15: 195-204.

Kleene KC (1989) Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. Development 106: 367-73

Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster ME, Burger CW, van Leeuwen FE (2002) Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. Lancet. 359: 1102-7.

Koopman P (2001) Gonad development: Signals for sex. Curr Biol 11: R481-3.

Koopman P (2005) Sex determination: a tale of two Sox genes. Trends Genet. 21: 367-70.

Kornberg RD, Lorch YL (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98: 285-294

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 2474-9. Epub 2006 Feb 6.

Krausz C, Degl'Innocenti S (2006b) Y chromosome and male infertility: update, 2006. Front Biosci. 11: 3049-61.

Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, Varriale G, Forti G (2006a) Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. Hum Mol Genet. 15: 2673-81.

Krausz C, Forti G, McElreavey K (2003) The Y chromosome and male fertility and infertility. Int J Androl 26: 70-5.

Krausz C, QuintanaMurci L, McElreavey K (2000) Prognostic value of Y deletion analysis - What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? Hum Reprod 15: 1431-1434

Kuhl H, Rottger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). Chromosome Res. 9: 215-22.

Kuo MH, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays 20: 615-26

Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. Nat Genet 29: 279-86.

Lahdetie J, Saari N, AjosenpaaSaari M, Mykkanen J (1997) Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. Am J Med Genet 71: 115-121

Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. Science 278: 675-80

Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ (2005) Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. Cytogenet Genome Res. 111: 250-5.

Le Bourhis C, Siffroi JP, McElreavey K, Dadoune JP (2000) Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. Mol Hum Reprod 6: 688-693

Le Lannic G, Arkhis A, Vendrely E, Chevaillier P, Dadoune JP (1993) Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. Mol Reprod Dev 36: 106-12

Le Magueresse-Battistoni B, Pernod G, Sigillo F, Kolodie L, Benahmed M (1998) Plasminogen activator inhibitor-1 is expressed in cultured rat Sertoli cells. Biol Reprod. 59: 591-8.

Lescoat D, Blanchard Y, Lavault MT, Quernee D, Le Lannou D (1993) Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis. Andrologia 25: 93-9

Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. Lancet 346: 1095.

Lin CL, Gibson L, Pober B, Yang-Feng TL (1995) A de novo satellited short arm of the Y chromosome possibly resulting from an unstable translocation. Hum Genet. 96: 585-8.

Lin YH, Lin YM, Chuang L, Wu SY, Kuo PL (2004) Ring (Y) in two azoospermic men. Am J Med Genet A. 128: 209-13.

Liou JD, Ma YY, Gibson LH, Su H, Charest N, Lau YF, Yang-Feng TL (1997) Cytogenetic and molecular studies of a familial paracentric inversion of Y chromosome present in a patient with ambiguous genitalia. Am J Med Genet. 70: 134-7.

Lipinski M, Lorain S, De Lucia F (2000) Plasticité Chromatinienne, contrôle de l'expression génique et pathologie humaine. Med/Sci 16: 69-76

Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin DP, Lee MS (2004) DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. J Assist Reprod Genet. 21: 119-26.

Longin J, Guillaumot P, Chauvin MA, Morera AM, Le Magueresse-Battistoni B (2001) MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. J Cell Sci. 114: 2125-34.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389: 251-60

Luger K, Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. Curr Opin Genet Dev 8: 140-6

Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH (2004) Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. Lancet Oncol. 5: 363-71.

Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, et al. (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. Cell 75: 1287-95

Machev N, Fuhrmann G, Viville S (2004) [Ontogenesis of primordial germ cells]. Med Sci (Paris). 20: 1091-5.

Machev N, Gosset P, Viville S (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. Cytogenet Genome Res 111: 352-7.

Madan K (1995) Paracentric inversions: a review. Hum Genet. 96: 503-15.

Martin RH (2005) Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. Cytogenet Genome Res. 111: 245-9.

Martin RH (2006) Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. Reprod Toxicol. 22: 142-7.

Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, Chernos J (2003) A Comparison of the Frequency of Sperm Chromosome Abnormalities in Men with Mild, Moderate, and Severe Oligozoospermia. Biol Reprod 69: 535-9

Martinage A, Arkhis A, Alimi E, Sautiere P, Chevaillier P (1990) Molecular characterization of nuclear basic protein HPI1, a putative precursor of human sperm protamines HP2 and HP3. Eur J Biochem 191: 449-51

Mauduit C (1999) Molécules de signalisation et communications cellulaires dans la gonade mâle. Médecine et biologie de la reproduction. Masson, Paris, pp 112-37

McElreavey K, Quintana-Murci L (2003) Y chromosome haplogroups: a correlation with testicular dysgenesis syndrome? Apmis. 111: 106-13; discussion 114.

McInnes B, Rademaker A, Greene CA, Ko E, Barclay L, Martin RH (1998) Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod 13: 2787-2790

McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH (1986) Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. Eur J Biochem 156: 5-8

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM (2002) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent Prog Horm Res. 57: 149-79.

McLaren A (2000) Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol. 163: 3-9.

McLean DJ, Friel PJ, Pouchnik D, Griswold MD (2002) Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells. Mol Endocrinol. 16: 2780-92.

Meistrich ML (1989) Histones and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In: Hnilica LS SJ (ed) Histones and other basic nuclear proteins. CRC Press, pp 165-82

Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. Mol Reprod Dev 31: 170-81

Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Van Beek ME (1994) Separation of specific stages of spermatids from vitamin A-synchronized rat testes for assessment of nucleoprotein changes during spermiogenesis. Biol Reprod 51: 334-44

Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science. 287: 1489-93.

Miharu N (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. Cytogenet Genome Res 111: 347-51.

Miharu N, Best RG, Young SR (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence *in situ* hybridization. Hum Genet 93: 502-506

Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. Fertil Steril 64: 811-7

Mruk DD, Cheng CY (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev. 25: 747-806.

Mullaney BP, Skinner MK (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. Endocrinology. 131: 2928-34.

Nanko S, Konishi T, Satoh S, Ikeda H (1993) A case of schizophrenia with a dicentric Y chromosome. Jpn J Hum Genet. 38: 229-32.

Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaiti-Pellie C, Heidenreich A, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA,

Oosterhuis JW, Gillis AJ, Looijenga LH, Guilford P, Fossa SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Rudd M, Huddart R, Crockford GP, Forman D, Oliver DT, Einhorn L, Weber BL, Kramer J, McMaster M, Greene MH, Pike M, Cortessis V, Chen C, Schwartz SM, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rapley EA (2005) The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. Am J Hum Genet. 77: 1034-43.

Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K (2000) Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. J Assist Reprod Genet 17: 97-102.

Noordam MJ, Repping S (2006) The human Y chromosome: a masculine chromosome. Curr Opin Genet Dev. 16: 225-32.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev. 22: 289-318.

O'Donnell L, Stanton PG, Bartles JR, Robertson DM (2000) Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. Biol Reprod. 63: 99-108.

Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K (2001) High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. Hum Reprod 16: 703-8.

Oliva R, Mezquita C (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. Nucleic Acids Res 10: 8049-59

Oosterhuis JW, Looijenga LH (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat Rev Cancer. 5: 210-22.

Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology. 122: 787-94.

Orth JM, Jester WF, Li LH, Laslett AL (2000) Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. Curr Top Dev Biol. 50: 103-24.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340: 17-8

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 14: 1266-1273

Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K (2002) Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. Lancet. 360: 1222-4.

Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, Stavrides G, Ioulianos A, Kitsiou-Tzeli S, Galla-Voumvouraki A, Kosmaidou Z, Hadjiathanasiou CG, McElreavey K (2005) Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. Am J Med Genet A. 135: 145-9.

Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG (1999) Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fert Steril 72: 472-478

Pierik FH, Burdorf A, Deddens JA, Juttmann RE, Weber RF (2004) Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. Environ Health Perspect. 112: 1570-6.

Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. Mol Cell Biol 23: 5354-65

Plant TM, Marshall GR (2001) The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. Endocr Rev. 22: 764-86.

Powell CM (2005) Sex Chromosomes and Sex Chromosome Abnormalities. The Principles of Clinical Cytogenetics, second edition. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 207-246.

Prigent Y, Muller S, Dadoune JP (1996) Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod 2: 929-35

Prigent Y, Troalen F, Dadoune JP (1998) Immunoelectron microscopic visualization of intermediate basic proteins HPI1 and HPI2 in human spermatids and spermatozoa. Reprod Nutr Dev 38: 417-27

Queipo G, Nieto K, Grether P, Frias S, Alvarez R, Palma I, Erana L, Pena YR, Kofman-Alfaro S (2005) Unusual mixed gonadal dysgenesis associated with Mullerian duct persistence, polygonadia, and a 45,X/46,X,idic(Y)(p) karyotype. Am J Med Genet A. 136: 386-9.

Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, et al. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 10: 383-93

Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2003) Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. Nat Genet. 35: 247-51.

Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S (2002) Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. Am J Hum Genet 71: 906-22.

Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2004) A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. Genomics. 83: 1046-52.

Rives N, SaintClair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, Mace B (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. Hum Genet 105: 266-272

Robbins WA, Elashoff DA, Xun L, Jia J, Li N, Wu G, Wei F (2005) Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. Cytogenet Genome Res. 111: 371-7.

Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R (2000) Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. J Endocrinol Invest. 23: 609-15.

Rottger S, Pasantes J, Baldermann C, Reichl E, Yen P, Hansmann I, Schempp W (2000) Familial mosaicism of del(Y) and inv del(Y). Cytogenet Cell Genet. 91: 208-11.

Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. Gene 345: 139-153

Rousseaux S, Caron C, Pivot-Pajot C, Faure AK, Hazzouri M, Sele B, Khochbin S (2003) Facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse. Andrologie 13: 139-147

Rousseaux S, Faure AK, Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sele B, Khochbin S (2004) [Organizing the sperm nucleus]. Gynecol Obstet Fertil 32: 785-91

Rousseaux S, Faure AK, Thevenon J, Escoffier E, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sele B, Caron C, Khochbin S (2006) [Epigenetics of the sperm cell]. Gynecol Obstet Fertil. 34: 831-5.

Rousseaux S, Pivot-Pajot C, Caron C, Faure AK, Hazzouri M, Sele B, Khochbin S (2002) Remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse : l'hyperacétylation des histones est un événement initiateur. Reproduction Humaine et Hormones 15: 455-462

Rubes J, Lowe X, Moore D, 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek AJ (1998) Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. Fertil Steril. 70: 715-23.

Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD (2005) Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. Cytogenet Genome Res. 111: 229-36.

Sadate-Ngatchou PI, Pouchnik DJ, Griswold MD (2004) Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. Mol Endocrinol. 18: 2805-16. Epub 2004 Aug 5.

Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut N, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold GA, Affara NA (1999) The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. J Med Genet 36: 670-677

Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F (2005) FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. Asian J Androl. 7: 227-36.

Sautiere P, Martinage A, Belaiche D, Arkhis A, Chevaillier P (1988) Comparison of the amino acid sequences of human protamines HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2. Structural evidence that HPS1 and HPS2 are pro-protamines. J Biol Chem 263: 11059-62

Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. Nat Genet 14: 292-9

Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JM, Page DC (2000) Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. Genomics 67: 256-67.

Schmid M, Haaf T, Solleder E, Schempp W, Leipoldt M, Heilbronner H (1984) Satellited Y chromosomes: structure, origin, and clinical significance. Hum Genet. 67: 72-85.

Schultz H, Mennicke K, Schlieker H, AlHasani S, BalsPratsch M, Diedrich K, Schwinger E (2000) Comparative study of disomy and diploidy rates in spermatozoa of fertile and infertile men: a donor-adapted protocol for multi-colour fluorescence in situ hybridization (FISH). Int J Androl 23: 300-308

Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. The Physiology of Reproduction, New York, pp 1363-1434

Sharpe RM (2003b) The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? Int J Androl. 26: 2-15.

Sharpe RM (2006) Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 20: 91-110.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003a) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction. 125: 769-84.

Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R (2001b) Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. Mol Reprod Dev. 59: 417-21.

Shi Q, Martin RH (2001a) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. Reproduction 121: 655-66.

Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, McElreavey K, Dadoune JP (2000) Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. Hum Reprod. 15: 2559-62.

Simoni M (2001) Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. Hum Reprod 16: 402-9.

Simoni M, Bakker E, Eurlings MCM, Matthijs G, Moro E, Muller CR, Vogt PH (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl 22: 292-299

Simoni M, Bakker E, Krausz C (2004) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. Int J Androl. 27: 240-9.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 346: 240-4.

Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J (1987) Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. Int J Androl. 10: 19-28.

Skakkebaek NE, Holm M, Hoei-Hansen C, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E (2003) Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. Apmis. 111: 1-9; discussion 9-11.

Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J (2006) Is human fecundity declining? Int J Androl. 29: 2-11.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod. 16: 972-8.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature. 423: 825-37.

Skinner MK (2005) Sertoli cell secreted regulatory factors. In: Griswold MSaM (ed) Sertoli Cell Biology. Elsevier Science, San Diego, pp 107–20

Sloter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ (2004) Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. Fertil Steril. 81: 925-43.

Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG (2006) FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. J Endocrinol. 189: 381-95.

Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 1237-41

Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol. 158: 327-39.

Soria J, Spano J (1999) Tumeurs germinales testiculaires. Cancérologie. ESTEM, Paris, pp 80-3

Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod 4: 939-945

Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M (2000) Expression of protamine-1 and-2 mRNA during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod 6: 219-225

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403: 41-45

Stuppia L, Calabrese G, Franchi PG, Mingarelli R, Morizio E, Sabatino G, Palka G (1996) Molecular studies in three patients with isodicentric Y chromosome. Hum Genet. 98: 691-5.

Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC (1999) An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. Nat Genet 23: 429-32.

Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC (2000) Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. Hum Mol Genet 9: 2291-6.

Sun F, Ko E, Martin RH (2006) Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? Reprod Biol Endocrinol. 4: 1.

Swain A, Lovell-Badge R (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. Genes Dev 13: 755-67

Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C, Overstreet JW (2003a) Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. Environ Health Perspect. 111: 414-20.

Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW (2003b) Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. Environ Health Perspect. 111: 1478-84.

Taddei A, Almouzni G (1997) Les acétyl-transférases et déacétylases des histones: des co-régulateurs de la transcription. Med/Sci 13: 1205-1209

Taddei A, Ray-Gallet D, Almouzni G (2000) Assemblage et remodelage : le nucléosome sous influence. Med/Sci 16: 603-10

Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. Exp Cell Res 117: 347-56

Tempest HG, Griffin DK (2004) The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. Cytogenet Genome Res. 107: 83-94.

Tempest HG, Homa ST, Zhai XP, Griffin DK (2005) Significant reduction of sperm disomy in six men: effect of traditional Chinese medicine? Asian J Androl. 7: 419-25.

Templado C, Bosch M, Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. Cytogenet Genome Res. 111: 199-205.

Templado C, Hoang T, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R (2002) Aneuploid spermatozoa in infertile men: Teratozoospermia. Mol Reprod Dev 61: 200-4.

Tharapel A (2005) Human Chromosome Nomenclature. The Principles of Clinical Cytogenetics, second edition. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 27-57.

Themmen APN, Huhtaniemi IT (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev. 21: 551-83.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod. 6: 811-6.

Thorne AW, Kmiciek D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C (1990) Patterns of histone acetylation. Eur J Biochem 193: 701-13

Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 34: 119-24

Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, McPherson JD, Wylie K, Sekhon M, Kucaba TA, Waterston RH, Page DC (2001) A physical map of the human Y chromosome. Nature 409: 943-5.

Toppari J, Kaleva M (1999) Maldescendus testis. Horm Res. 51: 261-9.

Tsui SL, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH (2000) Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. Genomics 65: 266-273

Tuck-Muller CM, Chen H, Martinez JE, Shen CC, Li S, Kusyk C, Batista DA, Bhatnagar YM, Dowling E, Wertelecki W (1995) Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. Hum Genet. 96: 119-29.

Turner BM (2002) Cellular memory and the histone code. Cell. 111: 285-91.

Turner BM, Birley AJ, Lavender J (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei. Cell 69: 375-84

Ushijima C, Kumasako Y, Kihaile PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T (2000) Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. Hum Reprod 15: 1107-1111

Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I (2002) Follow-up of children born after ICSI. Hum Reprod Update 8: 111-6

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 8: 1061-6

Vegetti W, VanAssche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, VanSteirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. Hum Reprod 15: 351-365

Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. Hum Reprod 14: 375-378

Vogt PH (2004) Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. Mol Cell Endocrinol. 224: 1-9.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 5: 933-43

Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. Science 258: 52-9.

Wade PA, Pruss D, Wolffe AP (1997) Histone acetylation: chromatin in action. Trends Biochem Sci 22: 128-32

Walker WH, Cheng J (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction. 130: 15-28.

Ward WS (1994) The structure of the sleeping genome : implications of sperm DNA organization for somatic cells. J Cell Biol 55: 77-82

Weidner IS, Moller H, Jensen TK, Skakkebaek NE (1998) Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. Environ Health Perspect. 106: 793-6.

WHO (1999) Laboratory Manual for the Examination of the Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Wolffe A (1995) Chromatin structure. Chromatin : structure and function. Academic press, London, pp 6-101

Xia W, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY (2005) Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis--a lesson to learn from the testis. Cytokine Growth Factor Rev. 16: 469-93.

Yan W, Suominen J, Toppari J (2000) Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. J Cell Sci. 113: 161-8.

Yen P (2001) The fragility of fertility. Nat Genet 29: 243-4.

Yoshitsugu K, Meerabux JM, Asai K, Yoshikawa T (2003) Fine mapping of an isodicentric Y chromosomal breakpoint from a schizophrenic patient. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 116: 27-31.

Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ (2000) Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. Am J Hum Genet. 66: 1807-20.

Zeuthen E, Nielsen J (1973) Pericentric Y inversion in the general population. Humangenetik. 19: 265-70.

Zhang FP, Pakarainen T, Poutanen M, Toppari J, Huhtaniemi I (2003) The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 13692-7. Epub 2003 Oct 29.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS ORIGINALES

1. **Faure AK,** Aknin-Seifer I, Frerot G, Pelletier R, De Robertis C, Cans C, Levy R, Jimenez C, Lejeune H, Terrier N, Bergues U, Hennebicq S, Rousseaux S (2007). "Predictive factors for an increased risk os sperm aneuploidies oligo-astheno-teratozoospermic males.". Int J Androl in press.

2. Aknin-Seifer I, Touraine R, **Faure AK**, Fellmann F, Chouteau J, Levy, R. (2005). "Two fast methods for detection of Y-microdeletions." Fertil Steril 84(3): 740-42

3. Verdel A, Seigneurin-Berny D, **Faure AK**, Eddahbi M, Khochbin S, Nonchev S. (2003) HDAC6-induced premature chromatin compaction in mouse oocytes and fertilised eggs. Zygote 11(4): 323-8.

4. **Faure AK**, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Péoc'h M, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S (2003) Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and in testicular cancer. Mol Hum Reprod 9(12):757-63.

5. Hazzouri M, Pivot-Pajot C, **Faure AK**, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis : involvement of histone deacetylases. Eur J Cell Biol 79(12): 950-60

6. Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, **Faure AK**, Vourc'h C, Sèle B (2000) Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. Mol Reprod Dev 55(3) : 307-15

7. **Faure AK**, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P (1999) Lack of value of specific IgA detection in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Lab Anal. 13(1):27-30

Publication soumise :

Faure AK, Aknin-Seifer I, Satre V, Amblard F, Devillard F, Hennebicq S, Chouteau J, Bergues U, Levy R, Rousseaux S. Molecular and cytogenetic analysis of Y chromosome re-arrangements in three infertile patients". Eur J Human Genet submitted.

REVUES

8. Rousseaux S, **Faure AK**, Thevenon J, Escoffier E, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sele B, Caron C, Khochbin S (2006). " [Epigenetics of the sperm cell]". Gynecol Obstet Fertil. Aug 31.

9. **Faure AK**, Devillard F, Sèle B, Hennebicq S. (2005). "[The interest of the chromosomic study of spermatozoids]." J Gynecol Obstet Biol Reprod 34: 1S39-1S43.

10. Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, **Faure AK**, Khochbin S. (2005). "Establishment of male-specific epigenetic information." Gene 345(2): 139-53.

11. Rousseaux S, **Faure AK,** Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sèle B, Khochbin S. (2004). "[Organizing the sperm nucleus]." Gynecol Obstet Fertil 32(9): 785-91.

12. Rousseaux S, Caron C, Pivot-Pajot C, **Faure AK**, Hazzouri M, Sèle B, Khochbin S (2003) Factors involved in chromatin remodelling during spermatogenesis. Androl. 13 (2): 139-47

13. Rousseaux S, Pivot-Pajot C, Caron C, **Faure AK**, Hazzouri M, Sèle B, Khochbin S (2002) Remodelage de la chromatine au cours de la spermiogénèse. Reprod. Hum. et Horm. 15 (6): 455-62

FICHE CLINICO-BIOLOGIQUE - BILAN AVANT MICRO-INJECTION

NOM – Prénom du patient : **Date de naissance :**
Taille (cm) :
Origine (pays) du père et Grand-père paternel :
Nom du médecin urologue/andrologue :
Nom du médecin gynécologue :
Nom du biologiste :

- Antécédents urologiques ? OUI □ NON □

Infectieux: Chirurgicaux :

- Traitements médicaux pouvant altérer la spermatogenèse (cf liste) : _____
- Exposition accidentelle ou régulière (professionnelle par exemple) à des substances toxiques (cf liste) (indiquer la durée de l'exposition et la date de fin d'exposition) : _____
- Pathologies familiales (notamment ORL, digestives, pulmonaires…)_____
- Consommation de tabac _____cig. /j pendant_____
- Spermogrammes et spermocytogrammes (au moins 2 spermogrammes à 10 semaines d'intervalle)

DATES (délai d'abstinence en jours)		
Volume (ml)		
pH		
Numération (Millions/ml)		
Mobilité progressive (% a et b)		
Vitalité (% spermatozoïdes vivants)		
Anomalies morphologiques (% anormaux+ IAM)		

- Spermoculture (date et résultat, incluant recherche de Chlamydiae et Mycoplasmes) _____
- Sérologie Chlamydiae et Mycoplasmes (dates) _____
- Anticorps anti-spermatozoïdes : MAR test ou ACAS (dans le plasma séminal) _____

- Examen clinique UROLOGIQUE (date :) :
  - Volume testiculaire - à D : <5ml □ / 5-10ml □ / 10-15ml □ / >15ml □ Technique utilisée_____
    - à G : <5ml □ / 5-10ml □ / 10-15ml □ / >15ml □
  - Cryptorchidie à l'age adulte ou testicule rétractile _____
  - Varicocèle OUI □ NON □ ; si oui, grade à D____, à G____
    Opéré: OUI □ (date :) NON □
  - Palpation des déférents et des épididymes (présence, anomalies) :_____
  - Echographie scrotale :___ _____
  - Echographie endorectale :_____ _____

- Bilan hormonal plasmatique :

Dates (lieu, dosage et normes)		
FSH (UI/l)		
LH (UI/l)		
Testostérone (biodisponible ou totale)		
Inhibine B (pg/ml)		
Autre :		

- Marqueurs dans le liquide séminal :

Dates		
α -Glucosidase *par éjaculat*		
Fructose		
Autre:		

- Caryotype lymphocytaire (date et lieu) _____

Si cet examen n'a pas encore été réalisé, il est alors préférable que la prescription soit faite lors de la première consultation en Biologie de la Reproduction par le médecin biologiste.

- Exploration scrotale – ponction - biopsie testiculaire (date) :

Présence de spermatozoïdes épididymaires : NON □ OUI □ congélation □ NON □ OUI □
Anapath : SCOS □ Blocage de la spermatogenèse homogène dans tous les tubes □
Hypospermatogenèse en foyer □ Hypospermatogenèse homogène □
Dilacération des BT : Présence de spermatozoïdes : NON □ OUI □ congélation □ NON □ OUI □

CONSENTEMENT POUR UNE ETUDE GENETIQUE
CHEZ UNE PERSONNE MAJEURE

Consentement établi en deux exemplaires dont un a été remis à l'intéressé (e)

Je soussigné(e)_____

demeurant à _____

demande au Docteur _____

que soit effectué chez moi un prélèvement de sang afin de faire réaliser par analyse moléculaire, une étude génétique qui peut aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie dont je souffre _____ ou que présente(nt) un (ou plusieurs) membre(s) de ma famille.

Je déclare avoir été pleinement informé(e) de la nature des études qui seront effectuées sur mon sang et des conséquences éventuelles des résultats qui peuvent m'être donnés. J'ai bien noté que les résultats de cette étude ne seraient transmis qu'à moi seul(e) et ne pourront être communiqués sans mon autorisation expresse.

Il m'a été précisé que

- cette étude peut s'étendre sur plusieurs années ; le prélèvement de sang peut donc être conservé le temps nécéssaire dans une banque d'ADN ; à tout moment, je peux demander que le sang prélevé ou les produits de celui-ci (notamment l'ADN extrait) me soit restitués.
- Seul le Docteur_____ ou les personnes mandatées par lui pourront faire procéder aux examens dont il m'a parlé dans le seul objectif auquel j'ai souscrit
- A tout moment, je peux demander que l'étude entreprise soit interrompue chez moi ou que les résultats ne me soient pas communiqués.

Fait à Grenoble, le _____

Signature du Docteur _____ Signature de l'intéressé(e)