

BIO MED

LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA



2023

BIOLOGIE MÉDICALE

9 & 10 MARS 2023 • Palais des Congrès de Paris Porte Maillot



L'exploration génétique de l'infertilité masculine

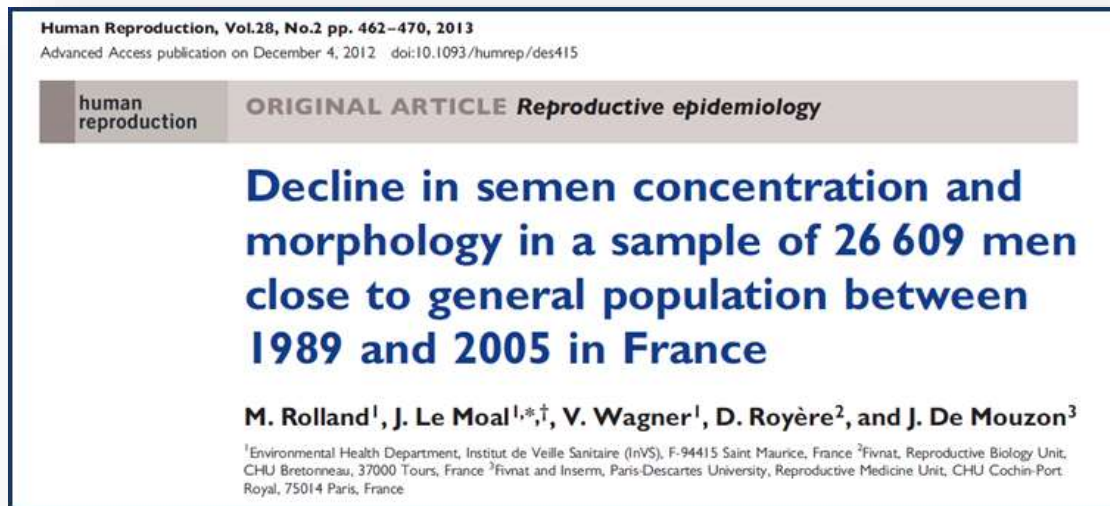


Pr Charles COUTTON



Infertilité masculine

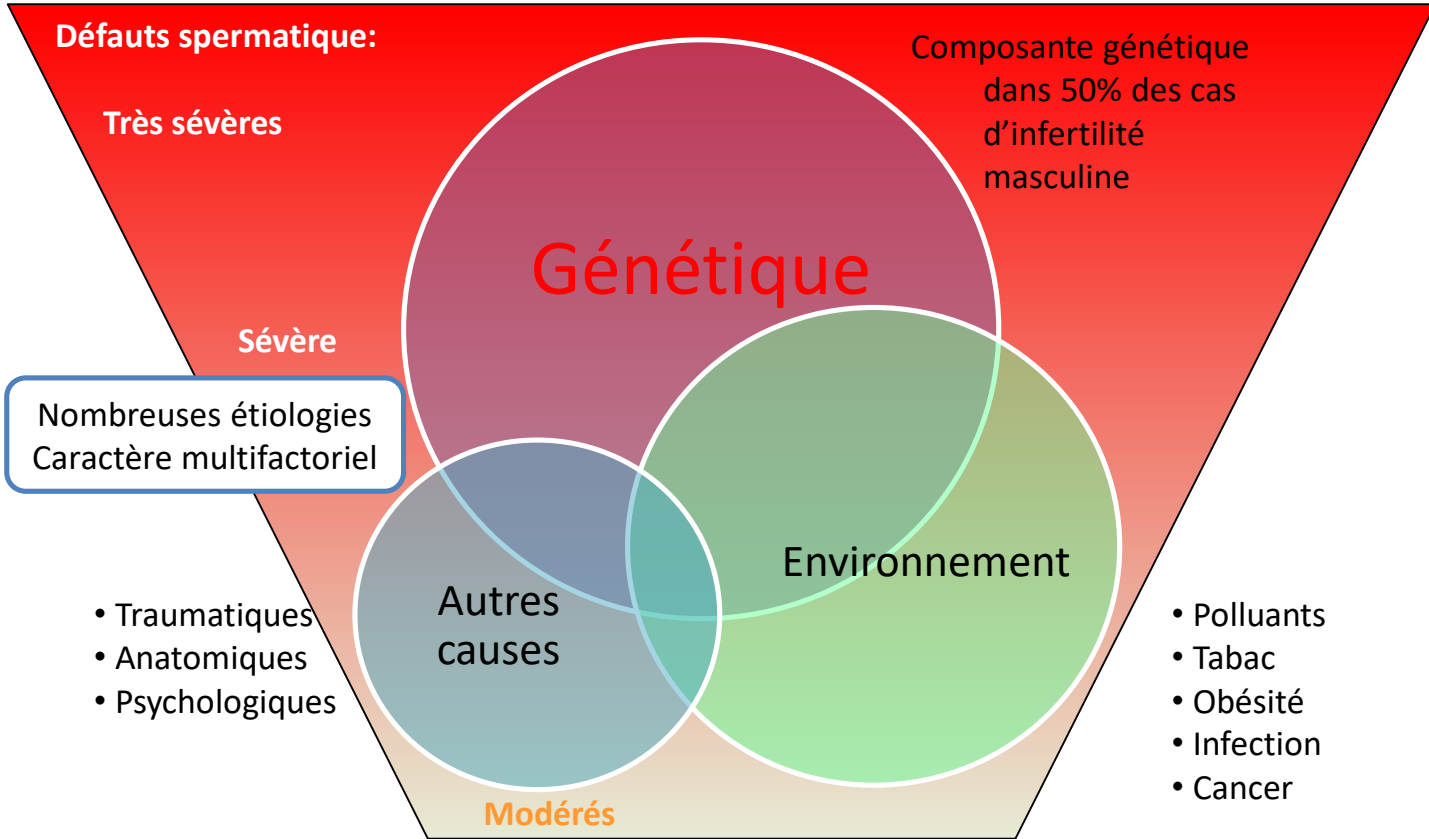
- Dégradation **progressive** et importante des paramètres spermatiques



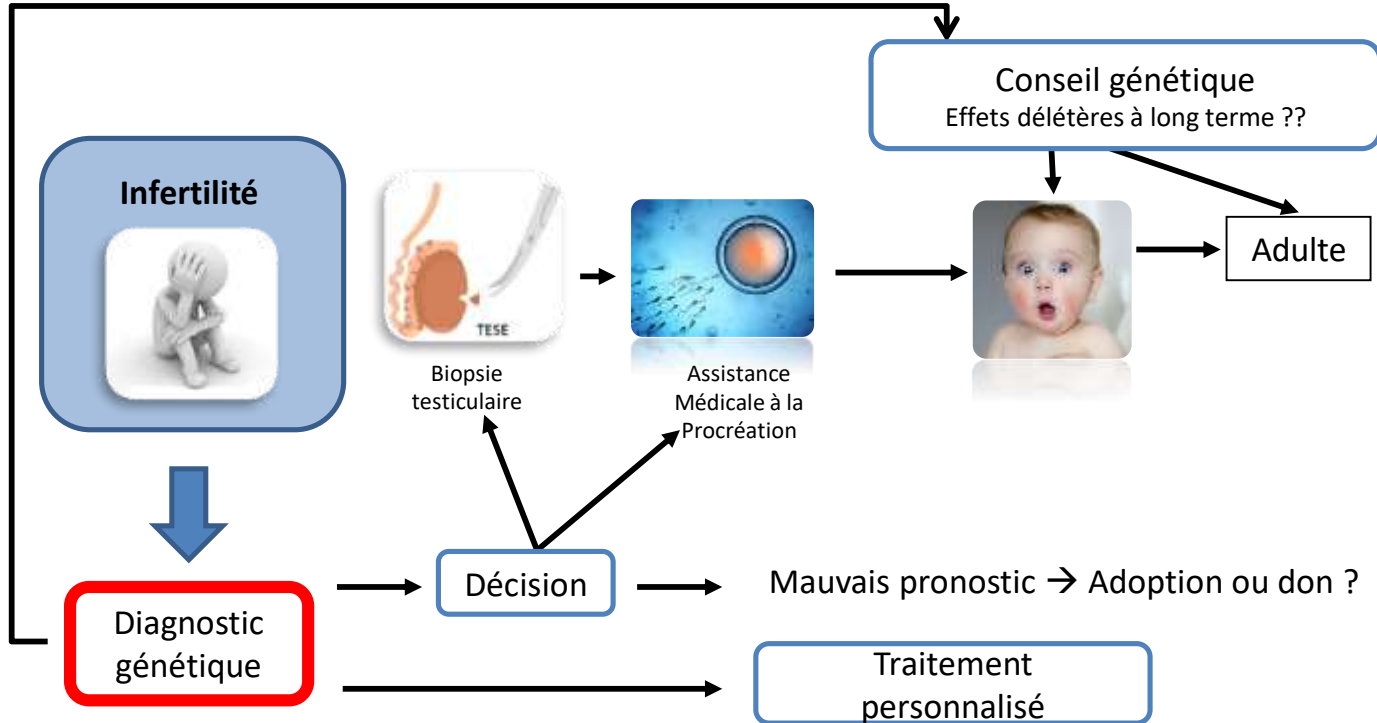
Impact délétère des modifications environnementales sur la fertilité



Causes de l'infertilité masculine

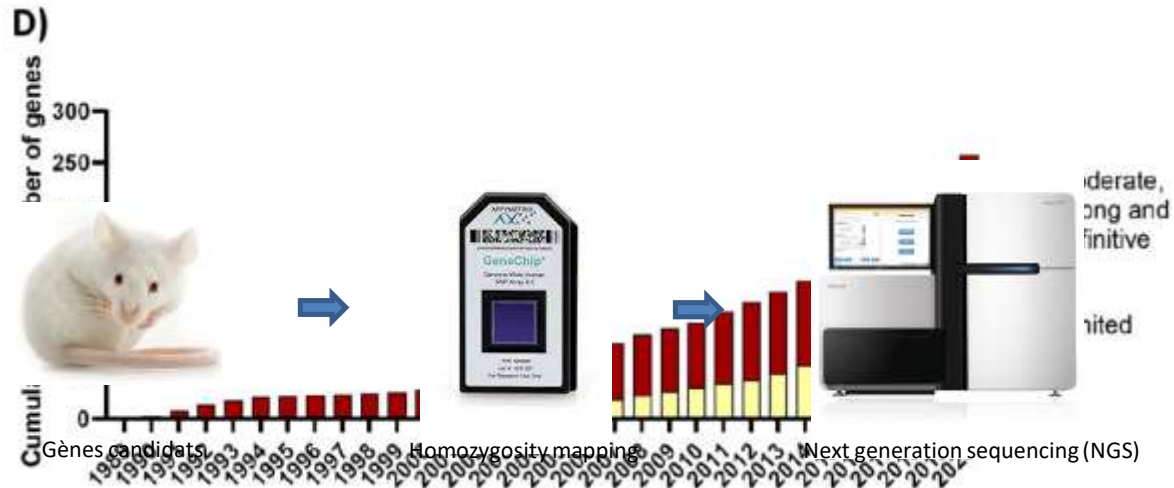


Enjeux du diagnostic génétique



Génétique de l'infertilité masculine

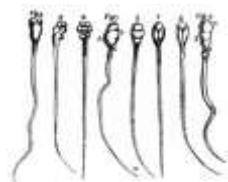
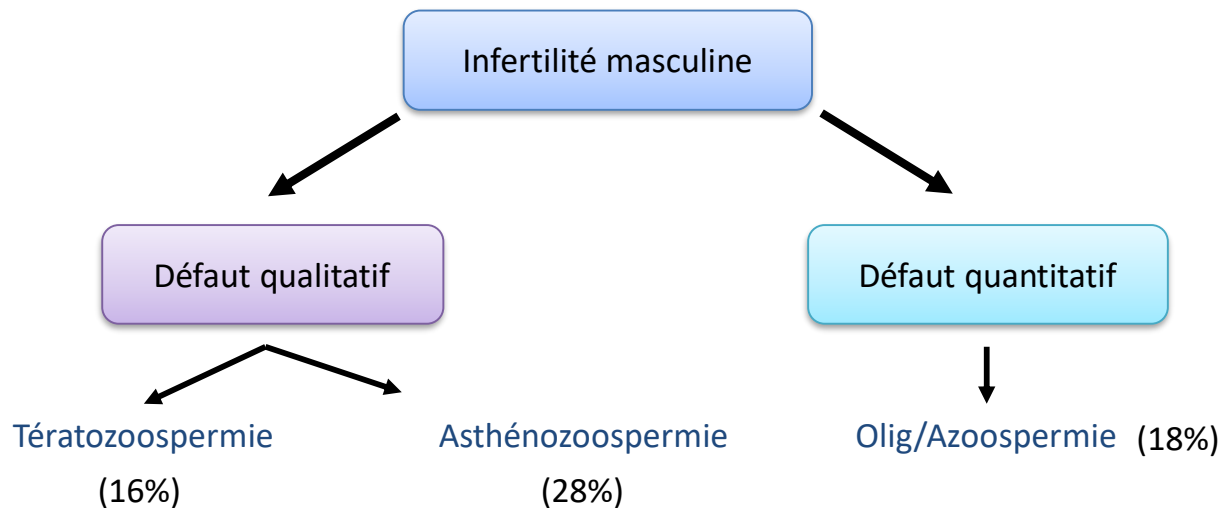
- Méthodes d'investigation



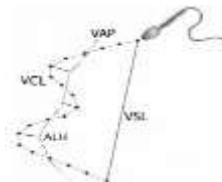
- A ce jour, environ 120 gènes **formellement** associés à l'infertilité masculine



Phénotypes



+



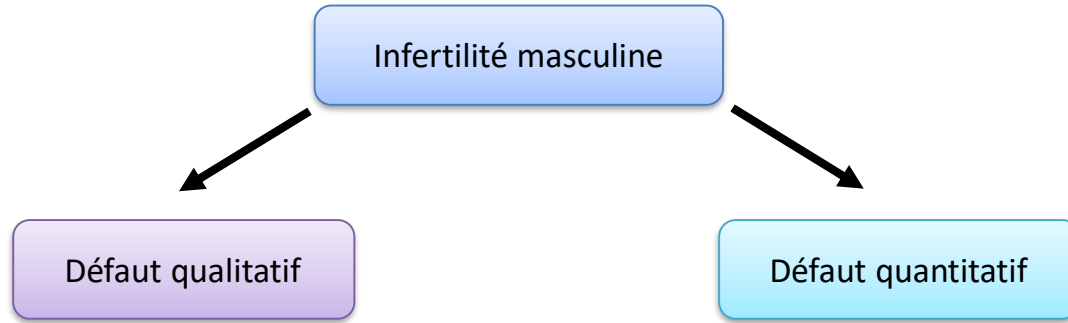
+



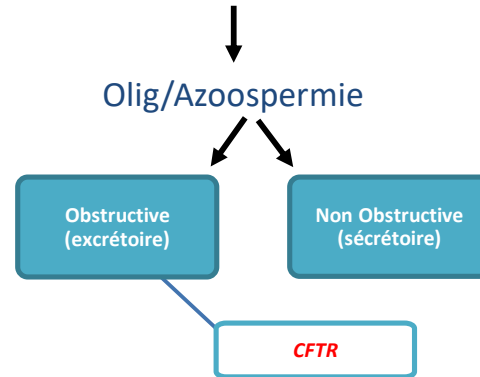
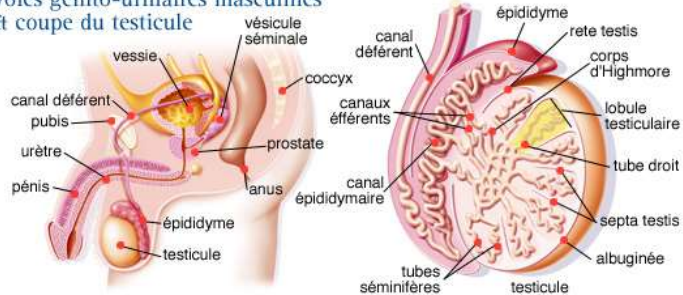
= Oligo-Asthéno-Térazoospermie (OAT) (34%)



Phénotypes



voies génito-urinaires masculines
& coupe du testicule



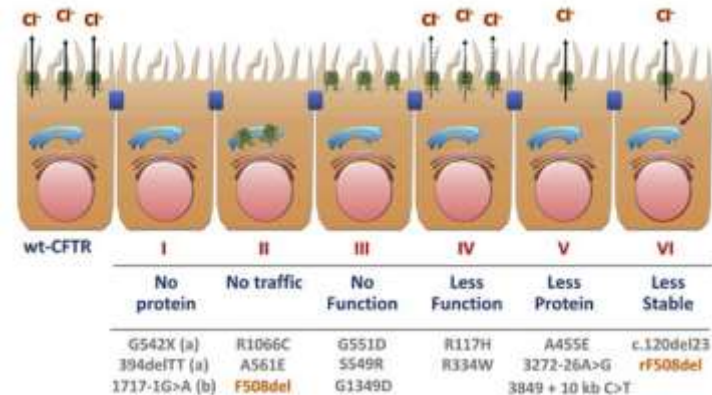
AO et *CFTR*

- **Recherche de mutations du gène *CFTR* (Chr 7; canal Cl⁻)**

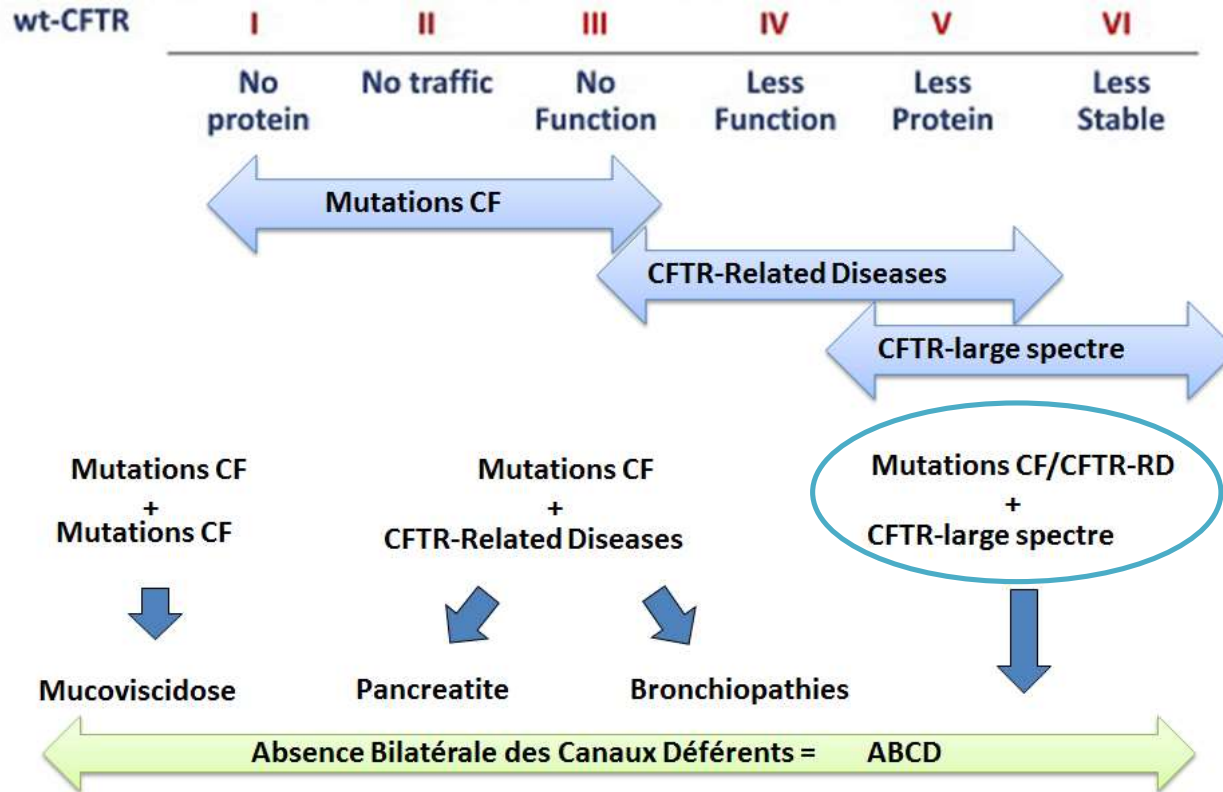
- Gène dont les mutations à l'état homozygote sont responsables de la mucoviscidose
- Absence bilatérale voire unilatérale des canaux déférents (ABCD)
 - 98% chez patient muco (atrésie secondaire et non pas agénésie), 1,7% patients infertiles , 1/1000 hommes
- Azoospermie excrétoire, obstructive ou oligospermie < 5 millions / ml

Mutations : > 2000

- p.F508del ($\Delta F508$) = 70 % des mutations
- 7 - 8 mutations fréquentes (G542X, N1303K,...)
- Possibilité d'hétérozygote composite
- Variations régionales ou ethniques



AO et CFTR

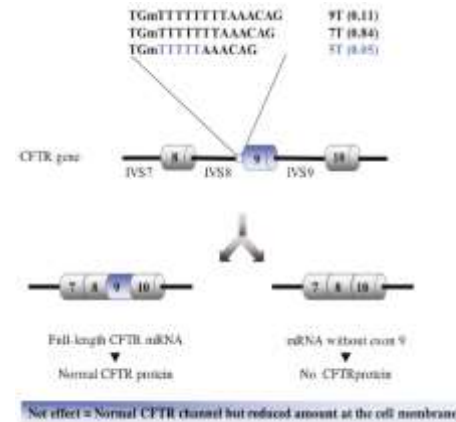


AO et CFTR

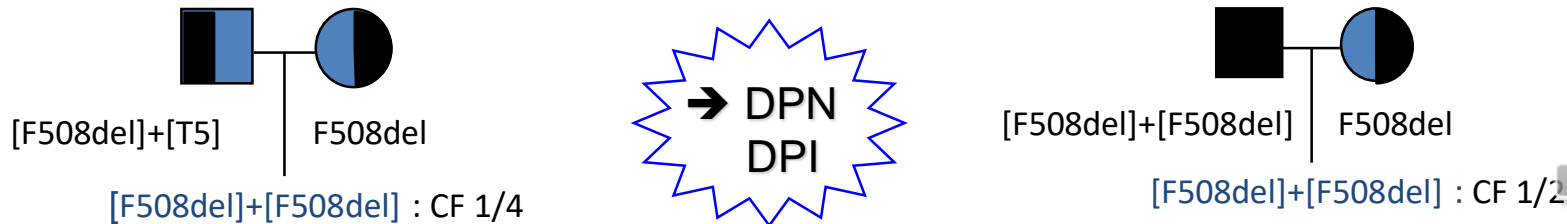
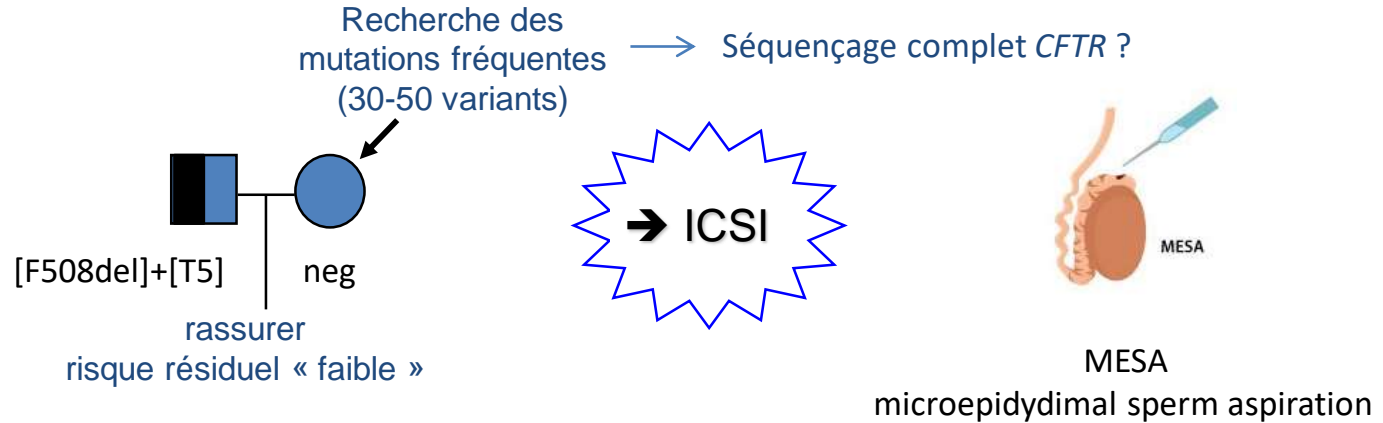
- Recherche des mutations du gène *CFTR* positive dans environ **80%** des cas d'ABCD (4% dans la population générale) (en absence d'anomalie rénale associée)

	Mutations	Variant 5T	%
1 mutation grave + 1 mutation modérée	2	0	19
1 mutation grave (classe I, II, III) + 5T (V)	1	1	33
	1	0	16
	0	1	10
Absence de mutation ou mutation non détectable ?	0	2	2
	0	0	20

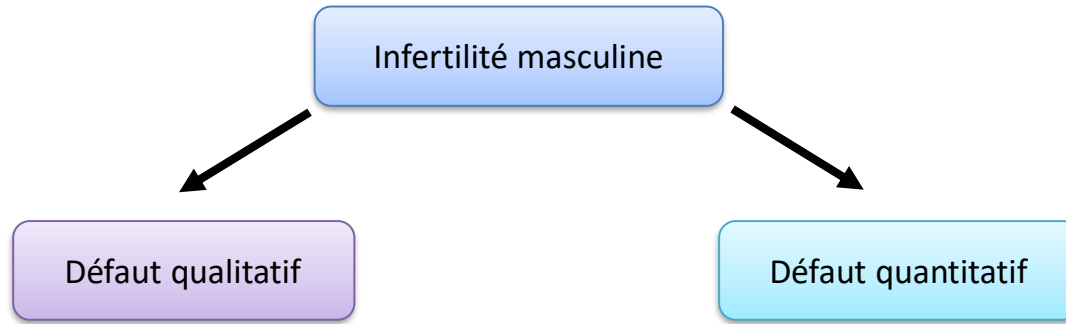
80%



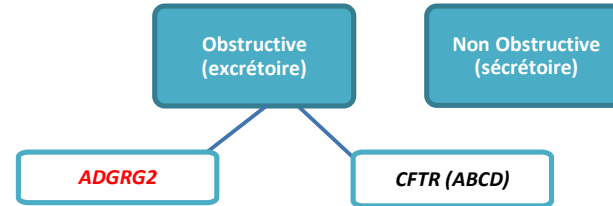
AO et CFTR



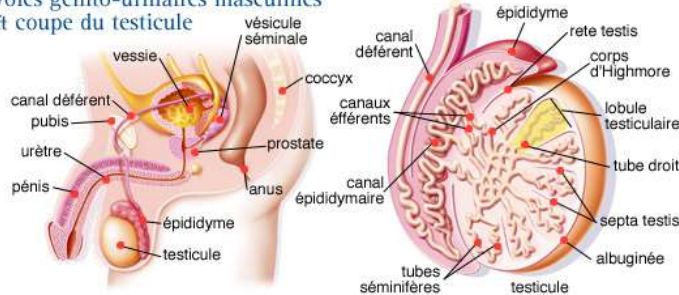
Phénotypes



Olig/Azoospermie



voies génito-urinaires masculines & coupe du testicule



ADGRG2

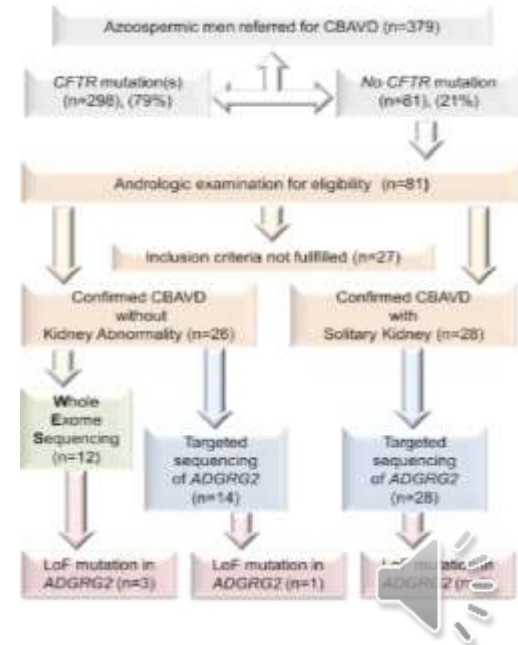
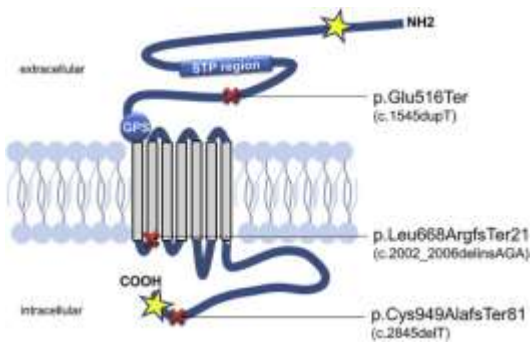
ADGRG2 localisé sur le chr. X

ADGRG2 code pour un récepteur couplé aux protéine G dans les canaux efférents et nécessaire pour la réabsorption du fluide

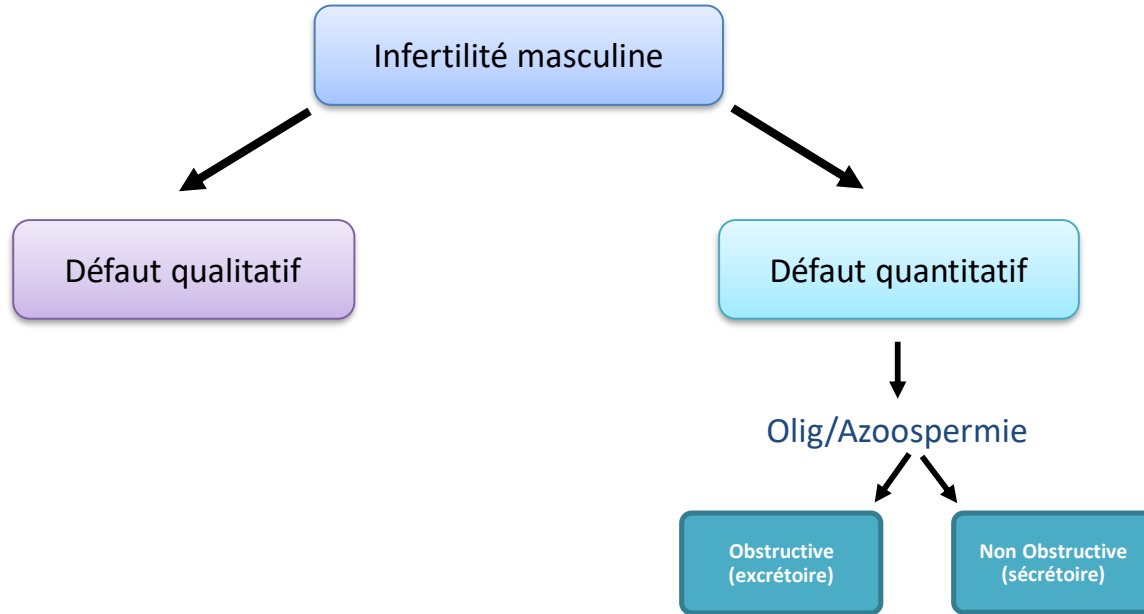
L'absence du canal entraîne un épaissement puis une stase des fluides dans les canaux efférents

Mutations d'ADGRG2 :

- 15% des patients AO CFTR négatif
- 1% chez tous les patients AO

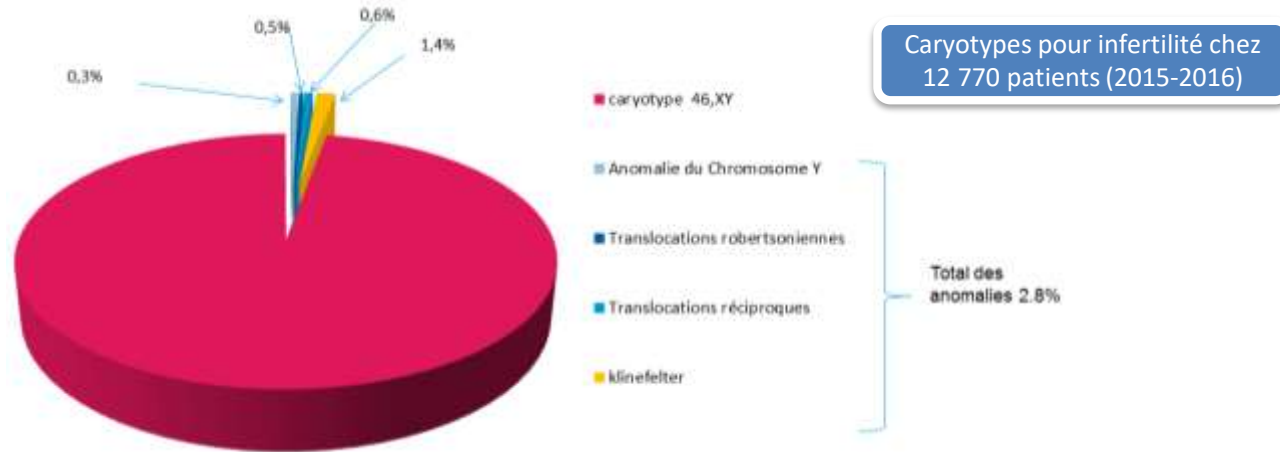


Phénotypes



Anomalies chromosomiques

- Retrouvées en moyenne chez 5% des patients infertiles (0,5% pop. générale)
- Prévalence variable selon le degré de sévérité de l'infertilité:
 - Jusqu'à 15% chez les patients azoospermiques
 - Environ 4,5% chez les patients oligozoospermiques



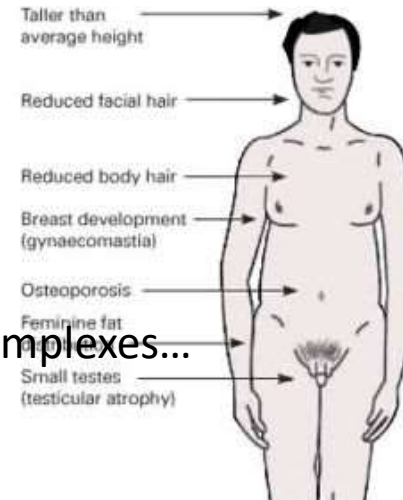
Anomalies chromosomiques

- Anomalies de nombre

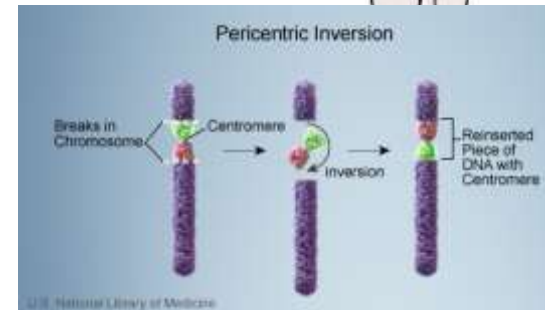
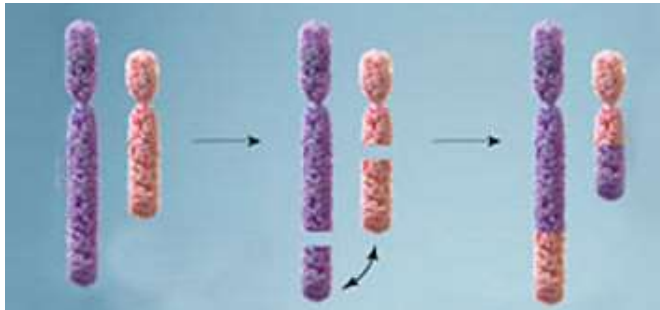
- Syndrome de Klinefelter +++: 47,XXY
- Autres aneuploïdes (47,XYY, marqueurs...)

- Anomalies de structure

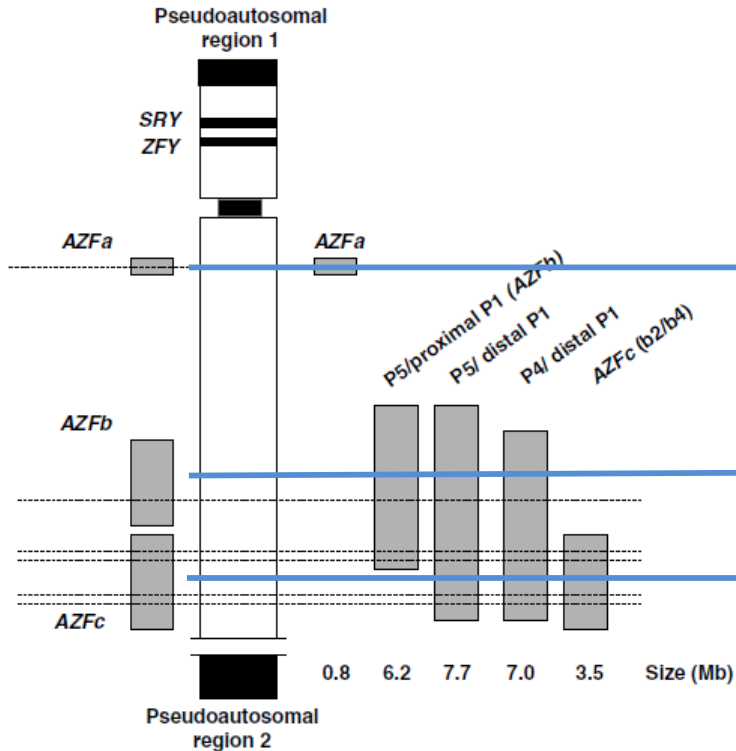
- Translocations, inversions, réarrangements complexes...
- Anomalies de structures du chromosome Y



Biopsie testiculaire positive >50% des patients



Microdélétions du chromosome Y



Deletion	Frequency	
	Patients	Controls
	Azoo	OAT
AZF microdeletions	5-10%	0%

Krausz et al., 2015

SCO: syndrome des cellules de Sertoli seules (0,5-4%)

↔ CI Biopsie

Arrêt en méiose (1-5%)

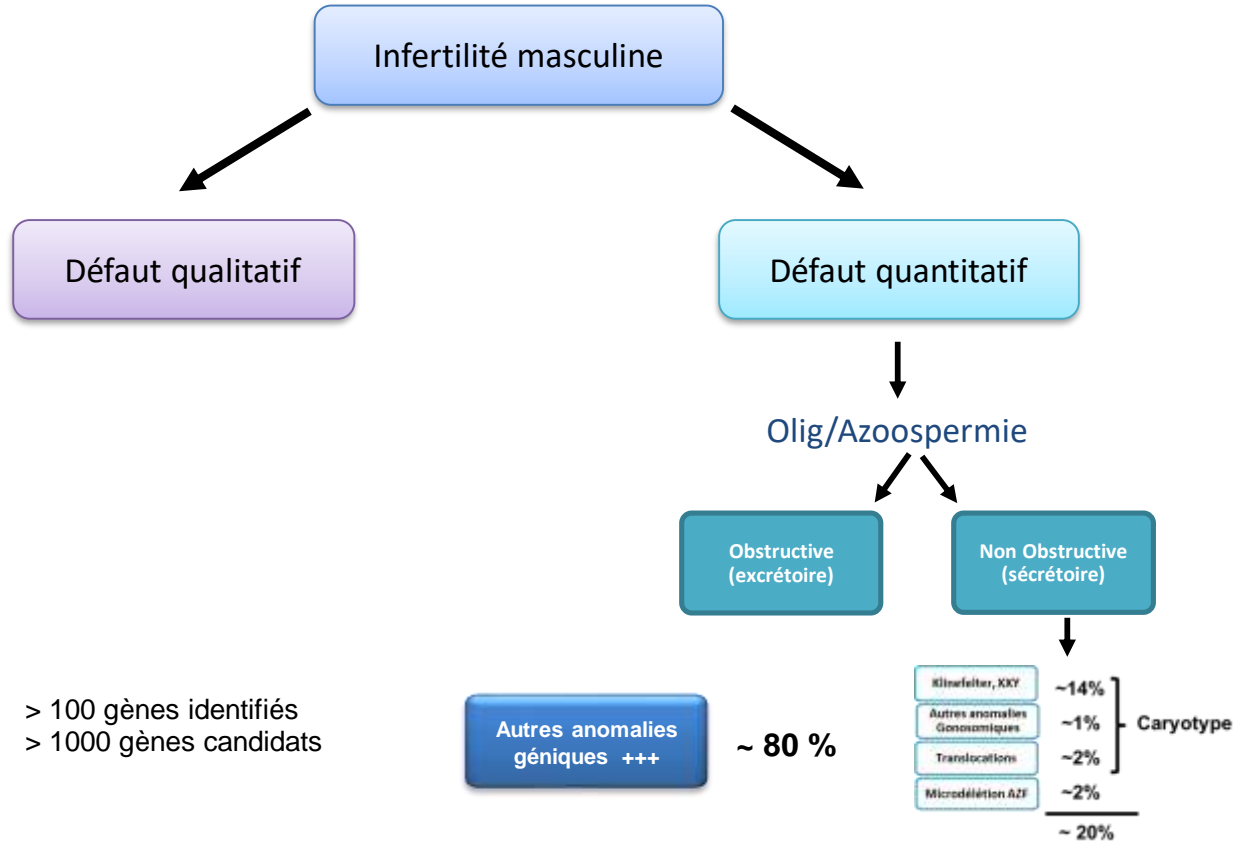
Phénotype variable (~80%)

} AZFb+c
1-3%

↳ Biopsie testiculaire possible
Risque transmission si garçon



Phénotypes



Next generation sequencing (NGS)

> 100 gènes identifiés
> 1000 gènes candidats



Intérêt du NGS dans l'azoospermie non obstructive

ARTICLE

Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia

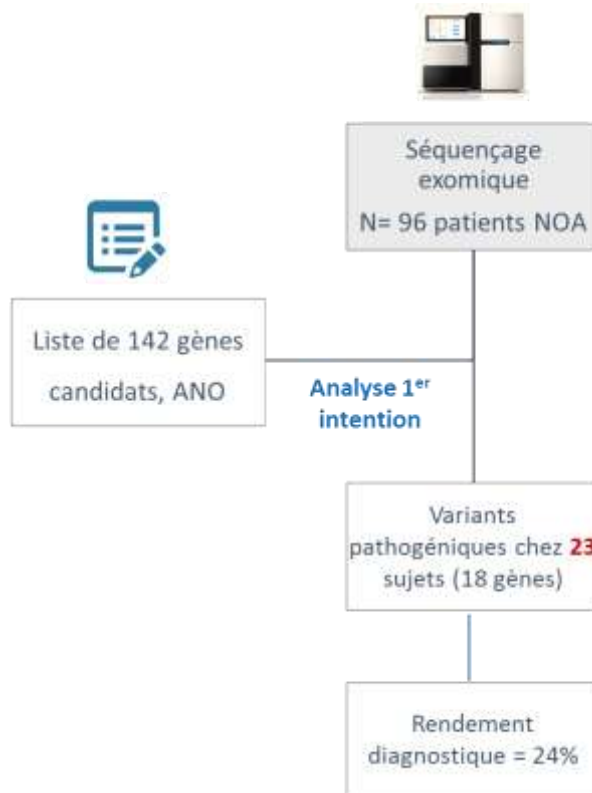
Zine-Eddine Kherraf,^{1,2,8} Caroline Cazin,^{1,2,7,8} Amine Bouker,³ Selima Fourati Ben Mustapha,³ Sylviane Hennebicq,^{1,4} Amandine Septier,⁵ Charles Coutton,^{1,6} Laure Raymond,⁷ Marc Nouchy,⁷ Nicolas Thierry-Mieg,⁵ Raoudha Zouari,³ Christophe Arnoult,¹ and Pierre F. Ray^{1,2,*}

Summary

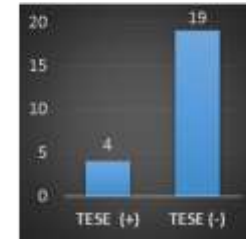
Non-obstructive azoospermia (NOA) is a severe and frequent cause of male infertility, often treated by testicular sperm extraction followed by intracytoplasmic sperm injection. The aim of this study is to improve the genetic diagnosis of NOA, by identifying new genes involved in human NOA and to better assess the chances of successful sperm extraction according to the individual's genotype. Exome sequencing was performed on 96 NOA-affected individuals negative for routine genetic tests. Bioinformatics analysis was limited to a panel of 151 genes selected as known causal or candidate genes for NOA. Only highly deleterious homozygous or hemizygous variants were retained as candidates. A likely causal defect was identified in 16 genes in a total of 22 individuals (23%). Six genes had not been described in man (*DDX25*, *HENMT1*, *MCMDC2*, *MSHS*, *REC8*, *TDRKH*) and 10 were previously reported (*C14orf39*, *DMCI*, *FANCM*, *GCNA*, *HFM1*, *MCM8*, *MEIOB*, *PDHA2*, *TDRD9*, *TERBI*). Seven individuals had defects in genes from piwi or DNA repair pathways, three in genes involved in post-meiotic maturation, and 12 in meiotic processes. Interestingly, all individuals with defects in meiotic genes had an unsuccessful sperm retrieval, indicating that genetic diagnosis prior to TESE could help identify individuals with low or null chances of successful sperm retrieval and thus avoid unsuccessful surgeries.



Intérêt du NGS dans l'azoospermie non obstructive



Résultats TESE sujets mutés



	Echec TESE	Succès TESE	
Anomalie mauvais pronostic	15	2	17
Anomalie bon pronostic	2	4	6
Négatif	52	21	73
	69	27	



Au-delà du diagnostic: le conseil génétique

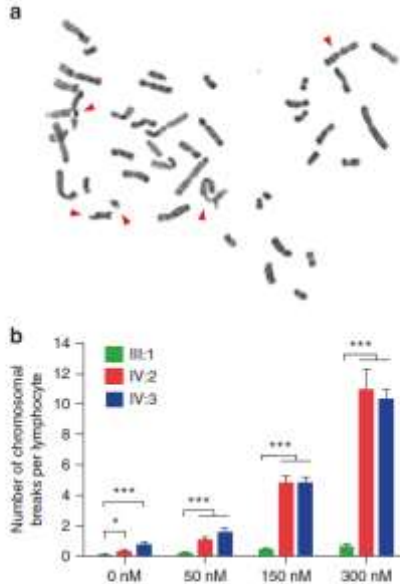


Fig. 2 FANCM PV impairs DNA break repair in patients. a A representative cultured metaphase lymphocyte from patients after 300 nM MMC treatment. Chromosomal breaks are indicated by arrowheads. b Quantification of chromosomal breaks in lymphocytes from patients (IV:2 and IV:3) and their father (III:1) after MMC treatment range from 0 nM to 300 nM. At least 40 cells were scored for each group. Data are represented as mean \pm SEM from at least two independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; one-way analysis of variance (ANOVA) test

ARTICLE

Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in *FANCM* Cause Non-obstructive Azoospermia

Laura Kasak,¹ Margus Punab,² Liina Nagirnaia,¹ Marina Grigorova,¹ Ave Minajeva,¹ Alexandra M. Lopes,^{4,5} Anna Maria Punab,¹ Kenneth I. Aston,⁶ Filipa Carvalho,^{5,7} Eve Laasik,¹ Lee B. Smith,^{8,9} GEMINI Consortium, Donald E. Conrad,^{5,10} and Maris Laan^{1,*}

Genetics in Medicine | ARTICLE

Corrected: Correction

© The Author(s)

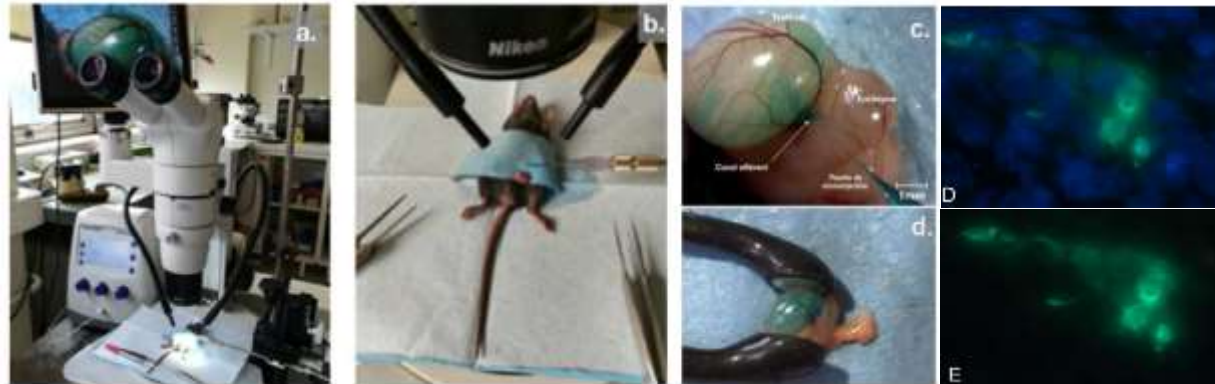
Open

A homozygous *FANCM* frameshift pathogenic variant causes male infertility

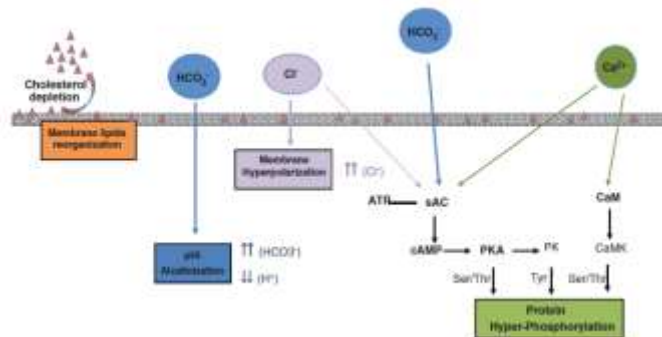
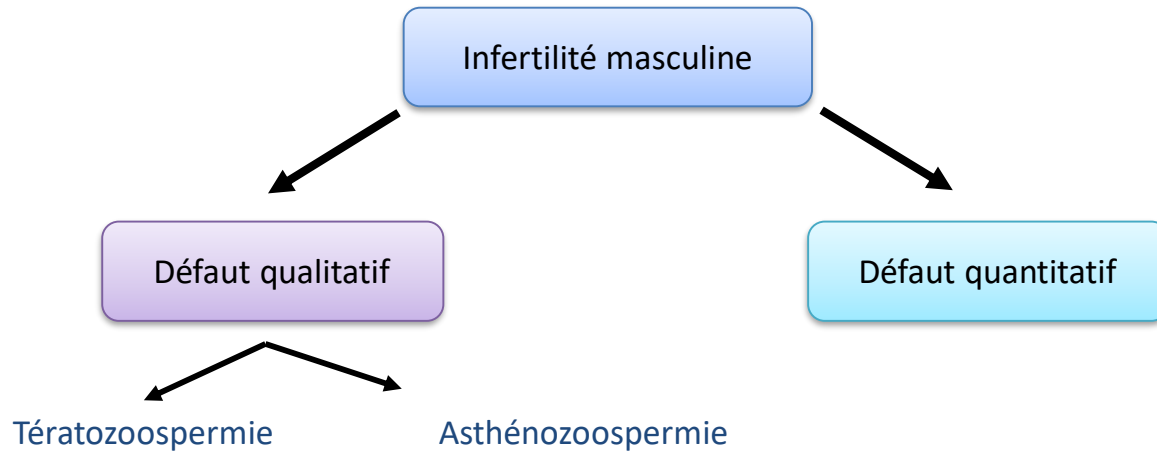
Hao Yin, BS¹, Hui Ma, PhD¹, Sajjad Hussain, MS¹, Huan Zhang, PhD¹, Xuefeng Xie, BS¹, Long Jiang, PhD¹, Xiaohua Jiang, PhD¹, Furhan Iqbal, PhD¹, Ihtisham Bukhari, PhD¹, Hanwei Jiang, PhD¹, Asim Ali, MS¹, Liangwen Zhong, PhD¹, Tao Li, BS¹, Suixing Fan, BS¹, Beibei Zhang, BS¹, Jianing Gao, BS¹, Yang Li, BS¹, Jabeen Nazish, MS¹, Teika Khan, MS¹, Manan Khan, MS¹, Muhammad Zubair, BS¹, Qiaomei Hao, BS¹, Hui Fang, BS¹, Jun Huang, PhD², Mahmoud Huleihel, PhD³, Jiahao Sha, PhD⁴, Tej K. Pandita, PhD⁵, Yuanwei Zhang, PhD¹ and Qinghua Shi, PhD¹

Vers des traitements personnalisés ?

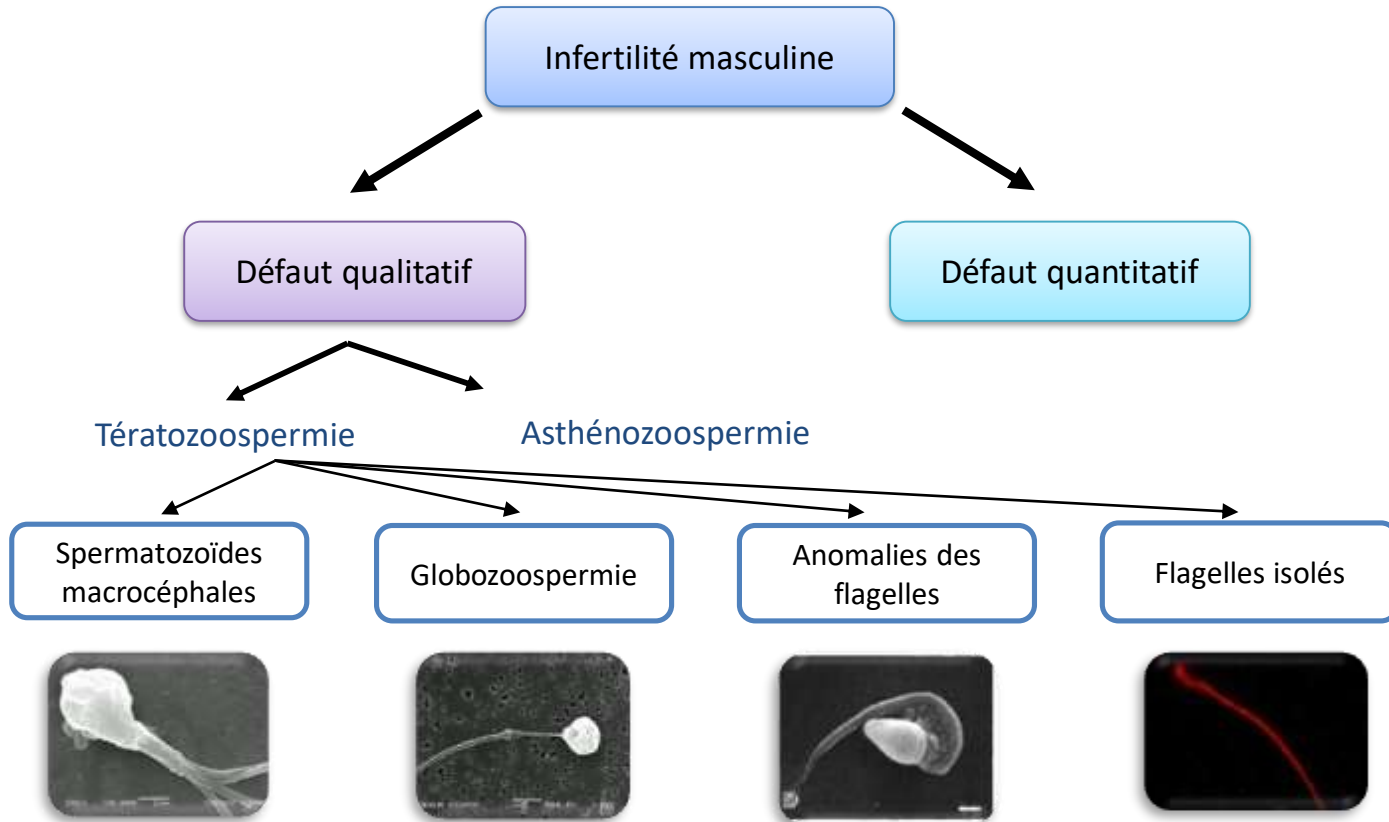
- Approches pharmacologiques
 - Inconvénients: barrière hémato-testiculaire
- Approches par thérapie génique
 - Injection intra-testiculaire (rete testis) de vecteurs non intégratifs (ex: épisome)
 - Restauration sur le temps d'un cycle de spermatogénèse (74 j chez l'homme)
 - Inconvénients: éviter de modifier les cellules souches germinales



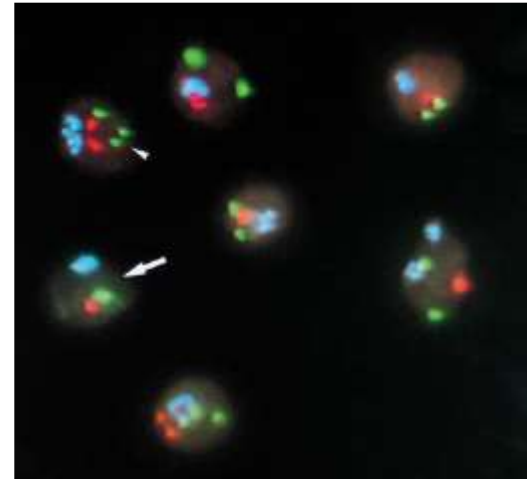
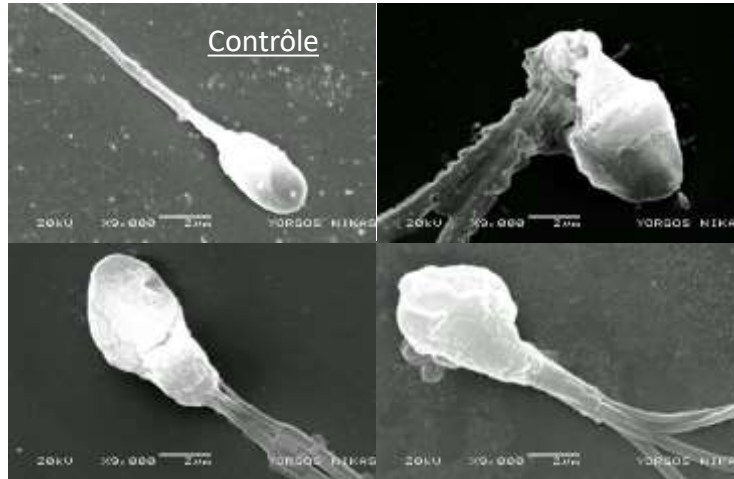
Phénotypes



Phénotypes



Spermatozoïdes macrocéphales



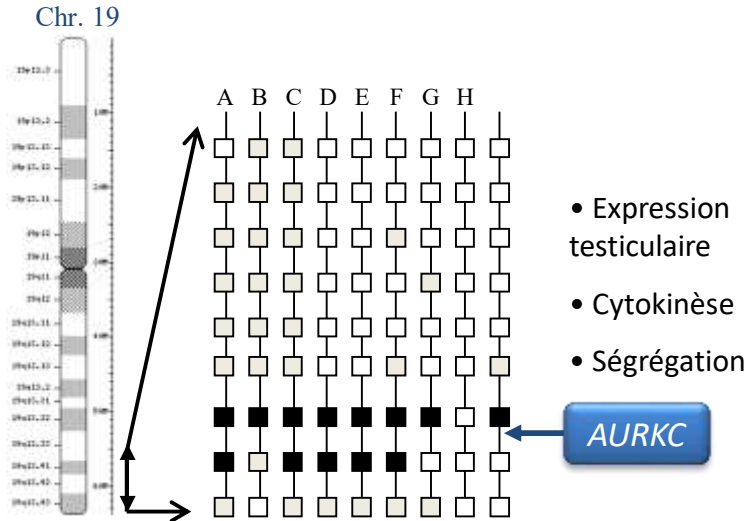
Devillard et al., 2002

- Volume de la tête spermatique augmentée (x3-4)
- Spermatozoïdes multiflagellés
- Associé à une oligo-asthénozoospermie

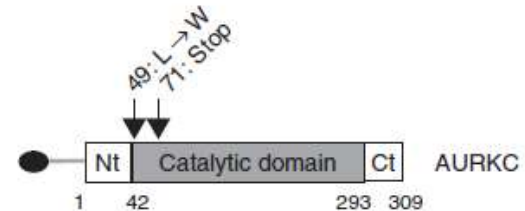
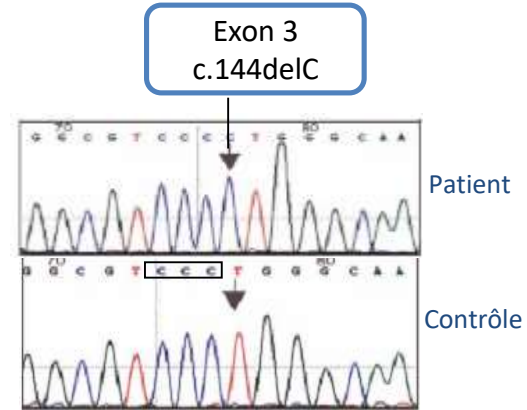


AURKC

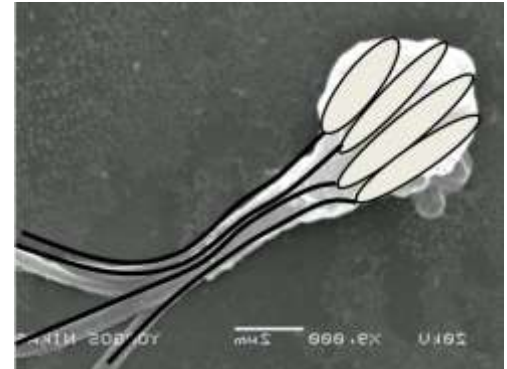
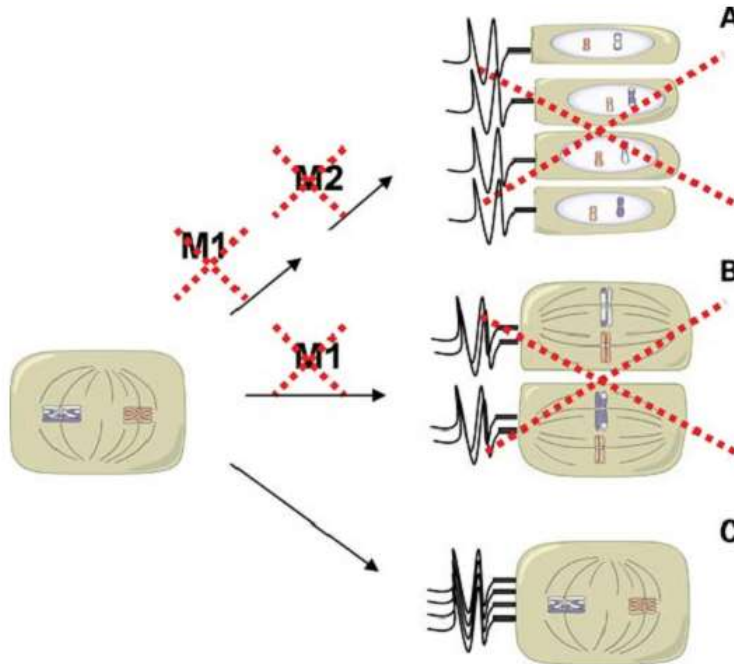
Cohorte initiale de 14 patients maghrébins



Tous les patients sont homozygotes



AURKC et aneuploïdies



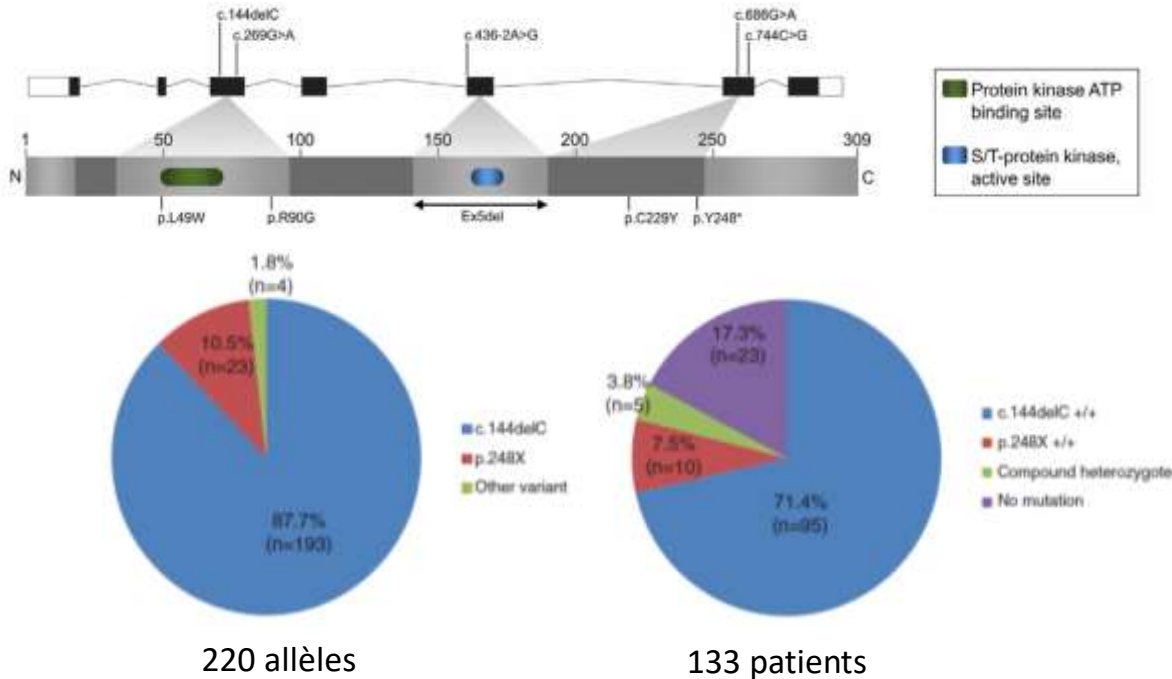
Dieterich et al., HMG, 2009

Défaut pré-méiotique entraînant un contenu tétraploïde des spermatozoïdes
=> **Contre-indication absolue** d'une prise en charge par ICSI



Spectre mutationnel

➤ Distribution et fréquence des mutations:



Une mutation dans le gène *AURKC* est retrouvée chez **83% des patients**

Les mutations récurrentes c.144delC et p.Y248X représentent **98% des mutations** identifiées

La mutations c.144delC est présente dans plus de **87% des allèles mutés**



Recommandations

Patients macrozoospermiques



> 70% de spermatozoïdes macrocéphales
Spermatozoïdes multiflagellés

Exons 3 et 6

Gène *AURKC* entier

AURKC négatif (15%)

AURKC positif (85%)

FISH sur spermatozoïdes

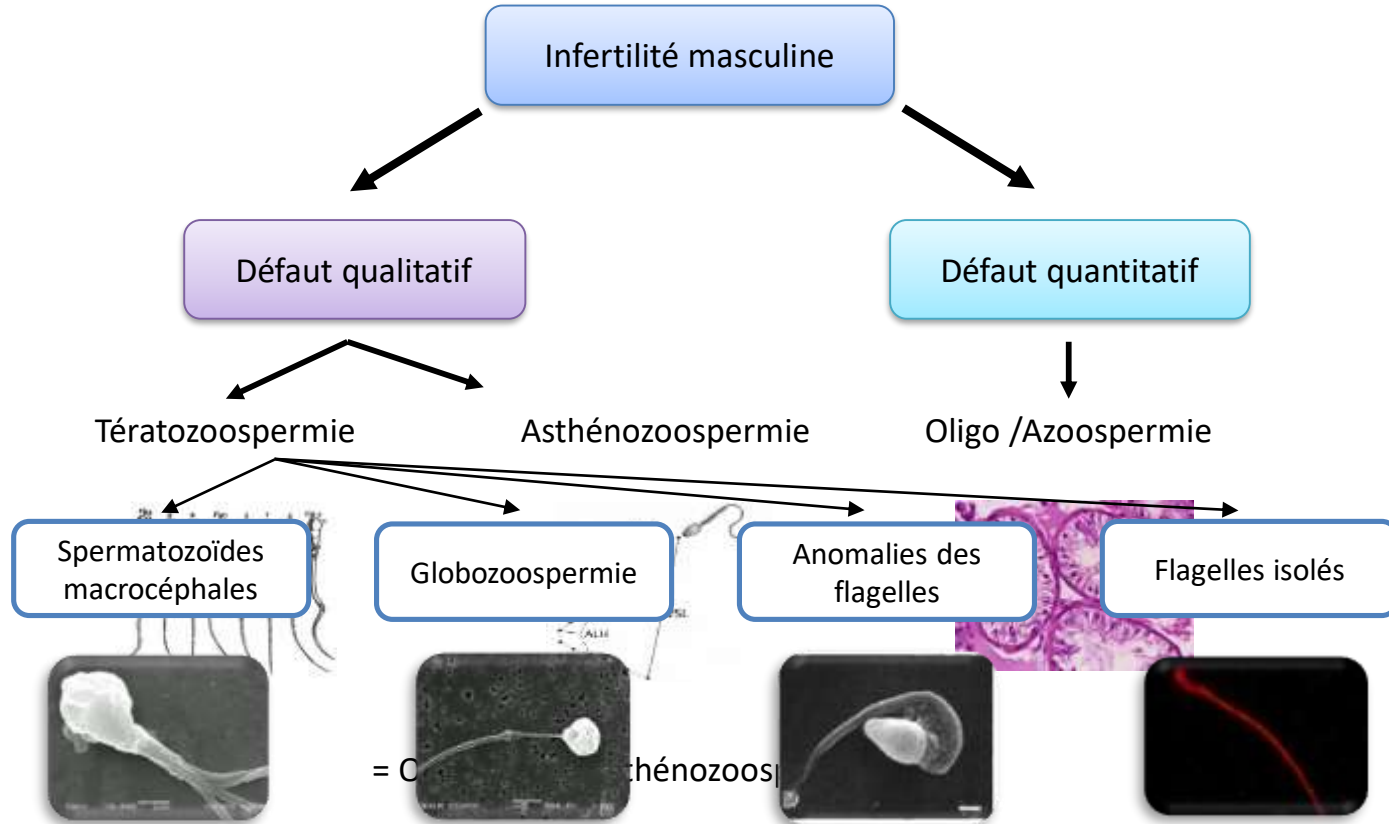
ICSI ?

ICSI contre-indiquée

adoption
don de sperme

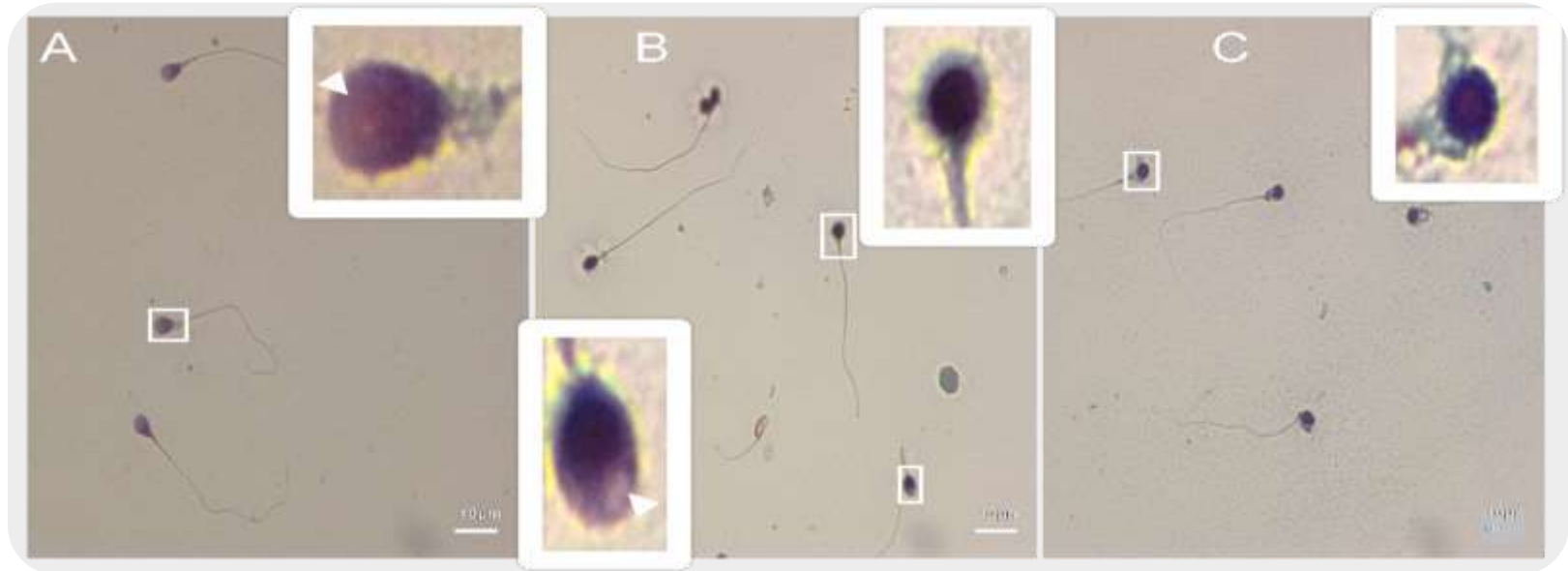


Phénotypes



Globozoospermie

- <1% des causes d'infertilité masculine primaire

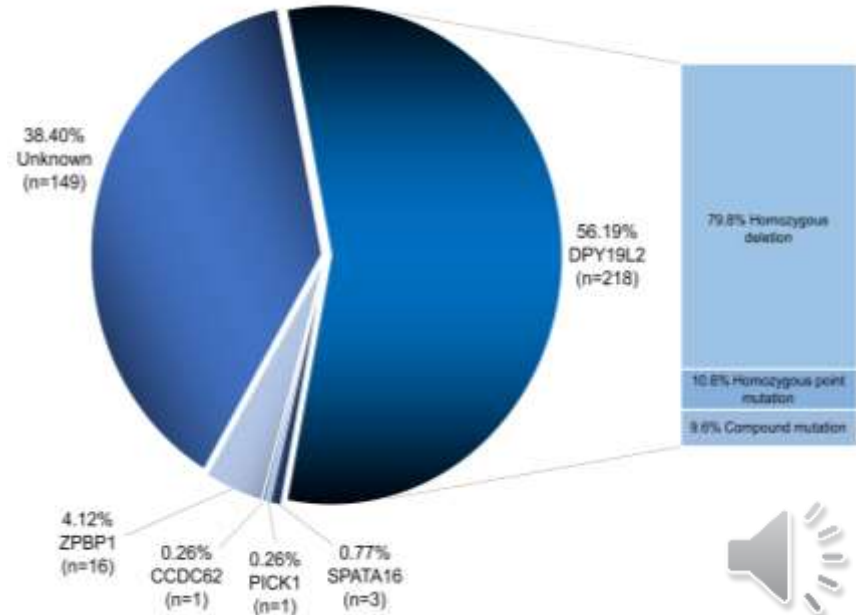
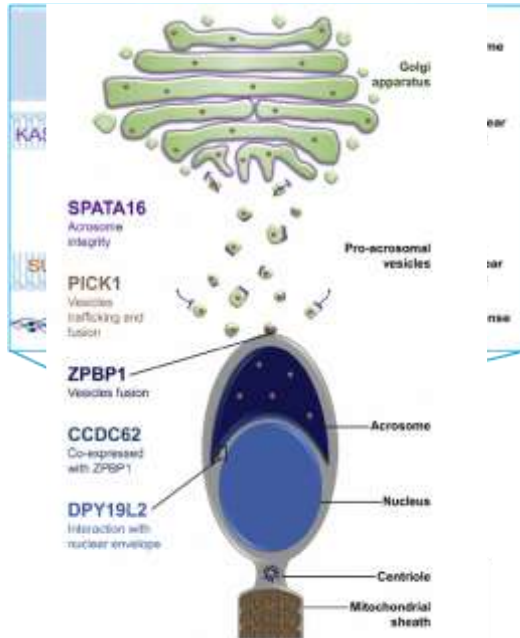


Spermatozoïdes normaux (A), globozoospermie partielle (B) et totale (C)

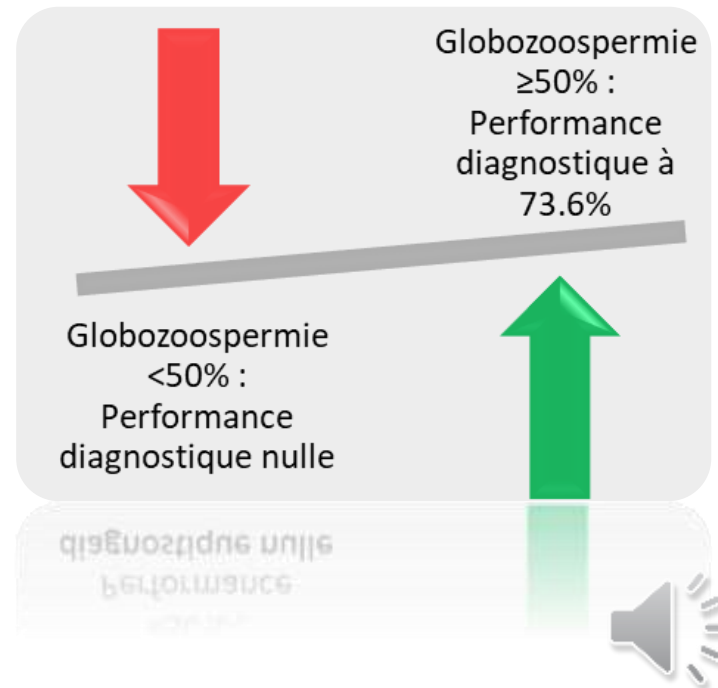
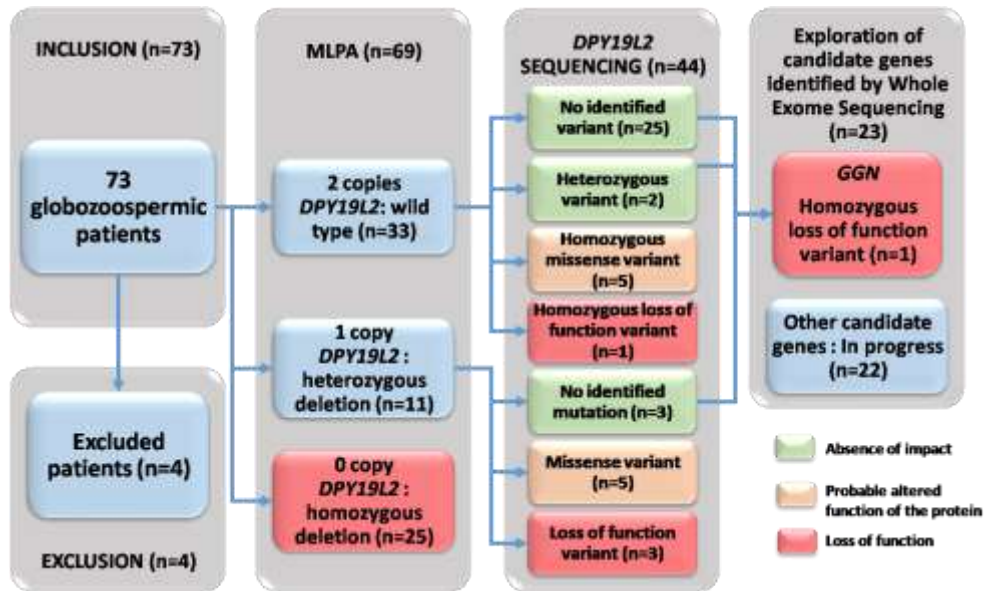


Globozoospermie

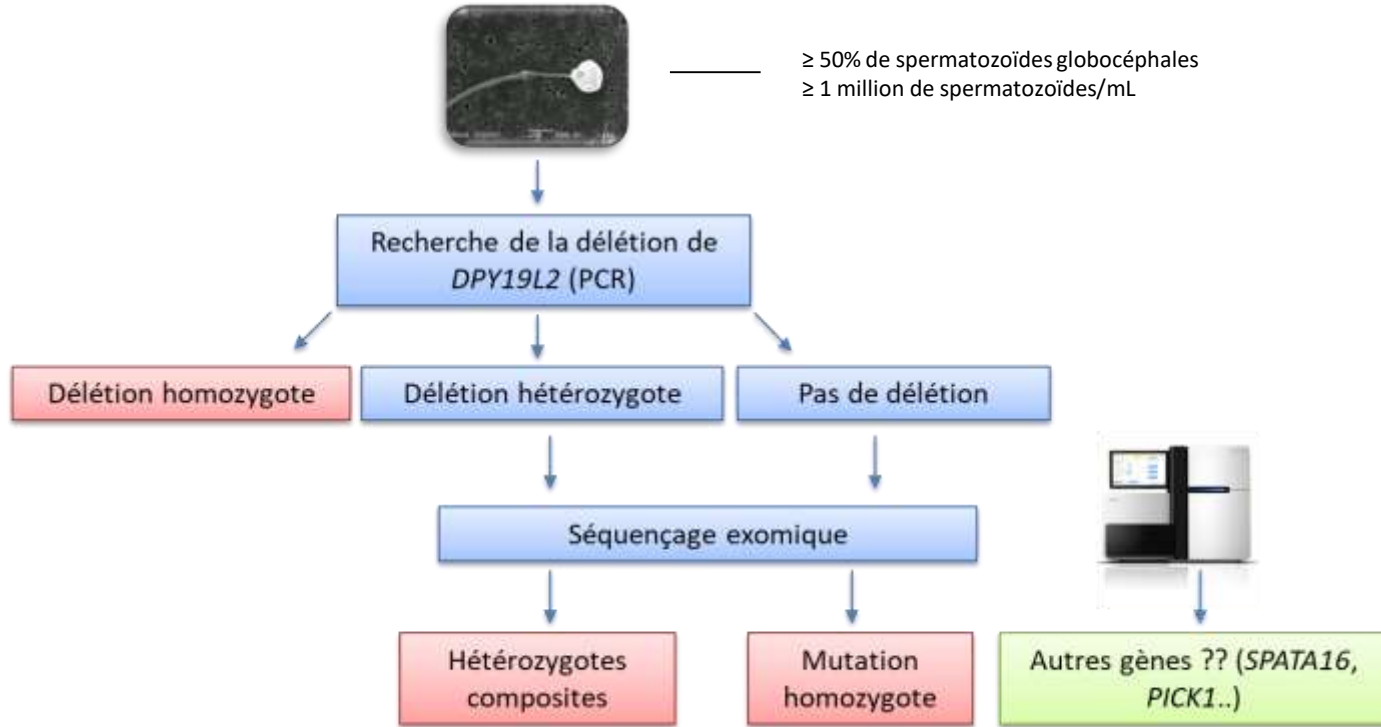
- Un gène majoritaire: *DPY19L2*
 - délétion homozygote récurrente de 200 kb +++
 - 23 mutations ponctuelles publiées



Globozoospermie

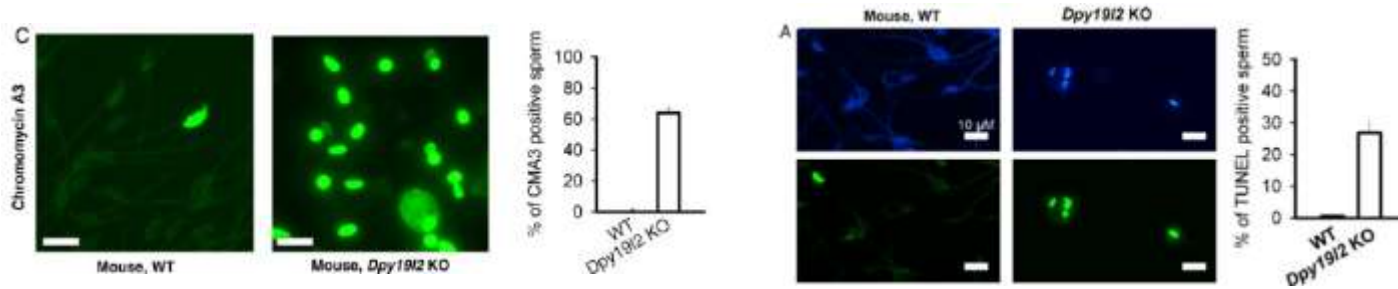


Recommandations

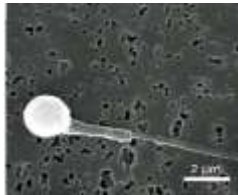


DPY19L2, qualité nucléaire et ICSI

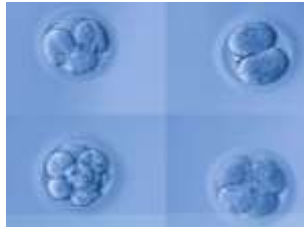
- Défauts importants de condensation de la chromatine et de fragmentation de l'ADN



⇒ Impact négatif sur le développement précoce des embryons



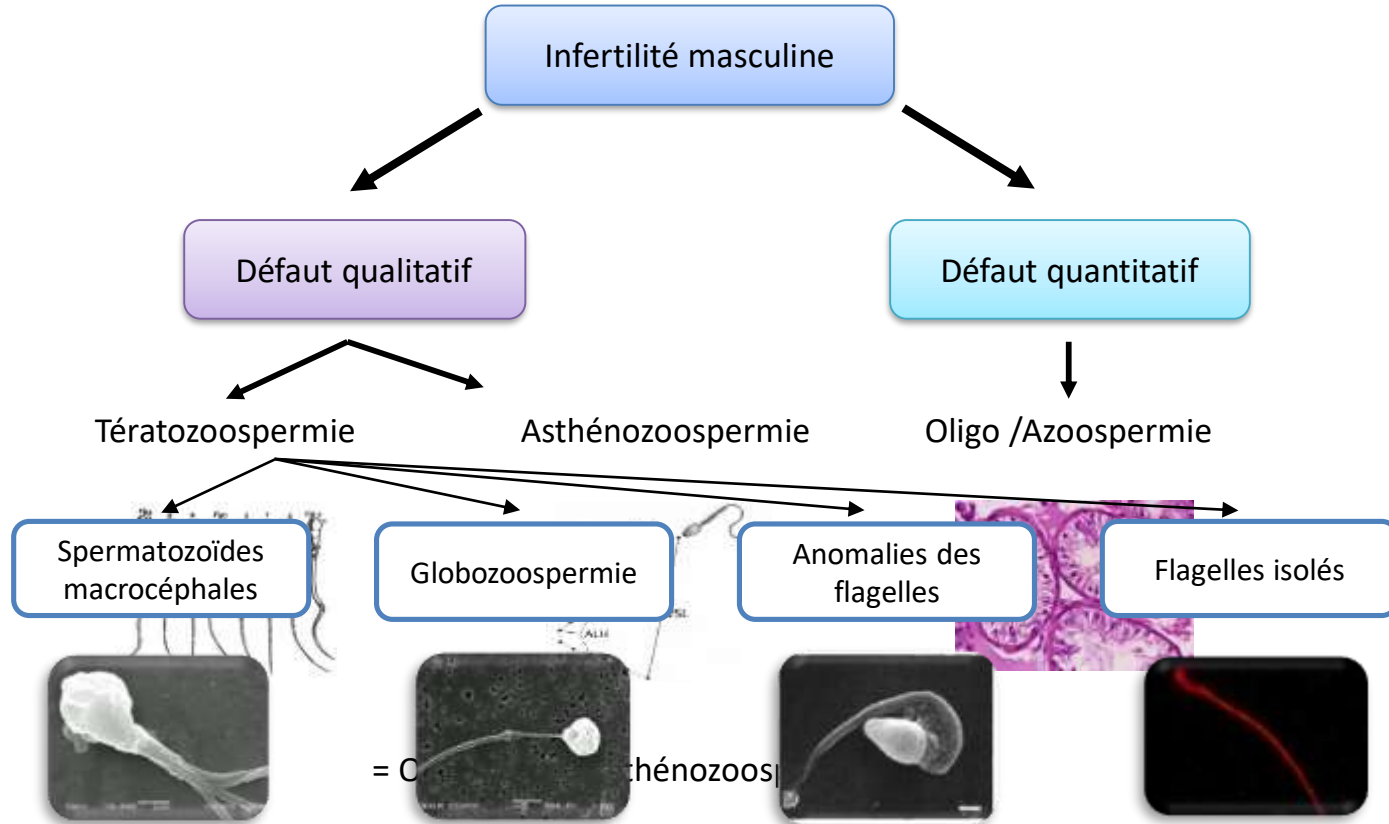
ICSI ?



Défauts épigénétiques
impactant le
développement de
l'embryon ou de
l'enfant à naître ?

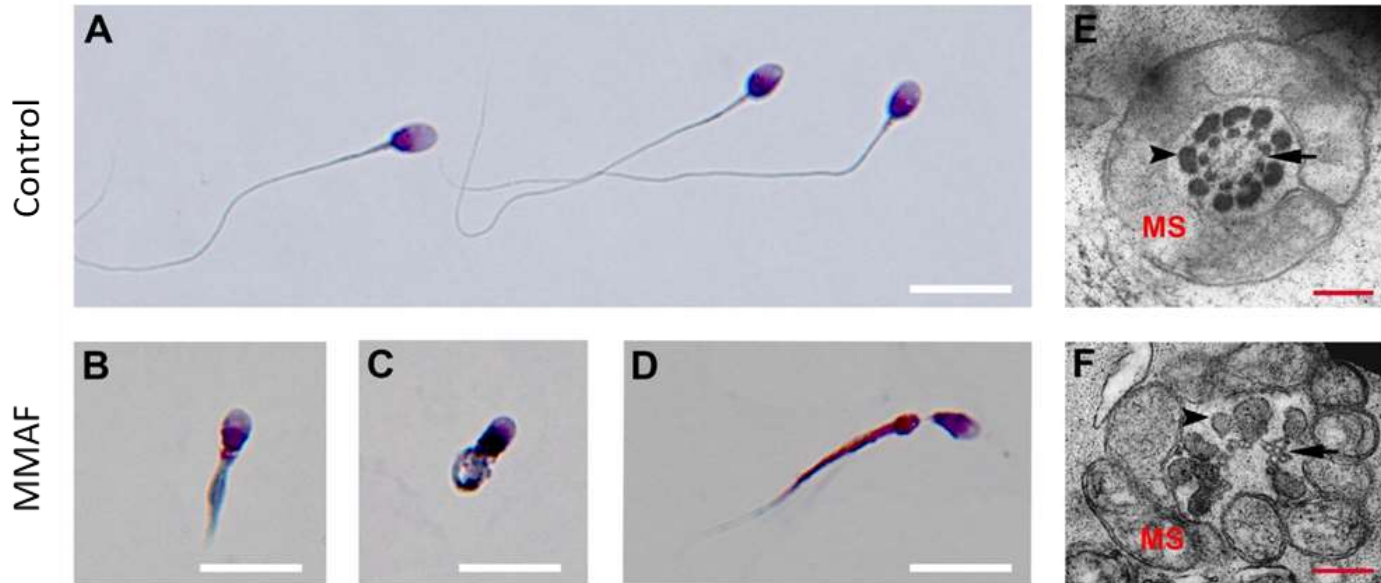


Phénotypes

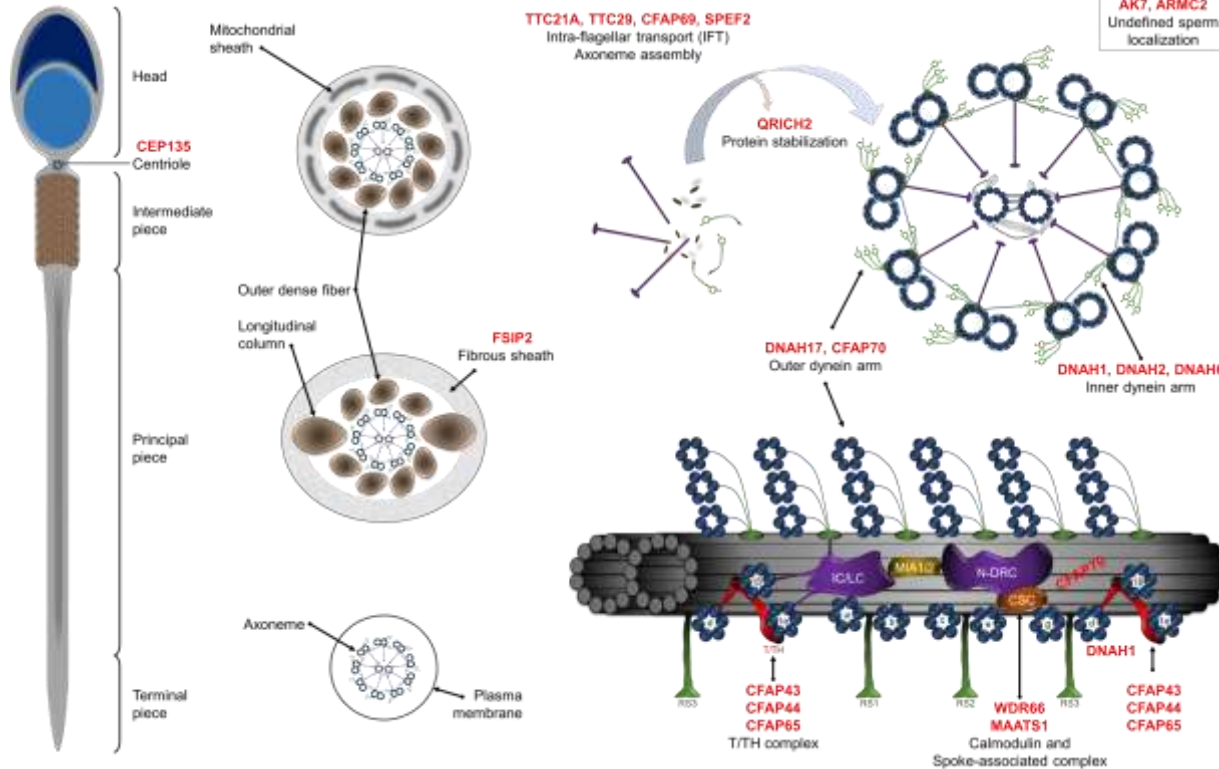


Anomalies morphologiques multiples du flagelle (MMAF)

- Asthénozoospermie **et** anomalies morphologiques multiples du flagelle (MMAF): courts, enroulés, diamètres irréguliers
- **Absence d'autre signe clinique** associé



Gènes d'anomalies flagellaires



39 gènes MMAF



Gènes d'anomalies flagellaires

Gènes identifiés	Nombre de patients	Pourcentage (%)	References
<i>ARMC2</i>	4	2,4	Coutton et al., <i>AJHG</i> , 2018
<i>CFAP43</i>	10	6	Coutton et al., <i>Nature Comm</i> , 2018
<i>CFAP44</i>	6	3,6	Coutton et al., <i>Nature Comm</i> , 2018
<i>CFAP65</i>	2	1,2	Li et al., <i>JMG</i> , 2019
<i>SPEF2</i>	2	1,2	Liu et al., <i>JMG</i> , 2019
<i>TTC21A</i>	2	1,2	Liu et al., <i>AJHG</i> , 2019
<i>TTC29</i>	5	3	Lorès et al., <i>AJHG</i> , 2019
<i>WDR66</i>	7	4,2	Kherraf et al., <i>AJHG</i> , 2018
Autres gènes	22	13	
Total	82/167	49%	

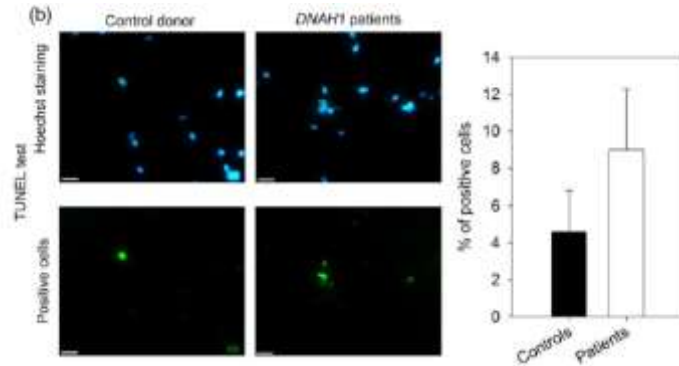
- ✓ Grande hétérogénéité génétique
- ✓ Nouvelles causes identifiées régulièrement

=> **Exome en première intention**
Approche d'investigation globale et dynamique

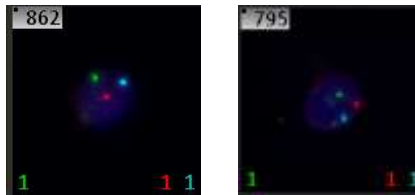


MMAF et pronostic en ICSI

Fragmentation et compaction de l'ADN



Taux d'aneuploïdies



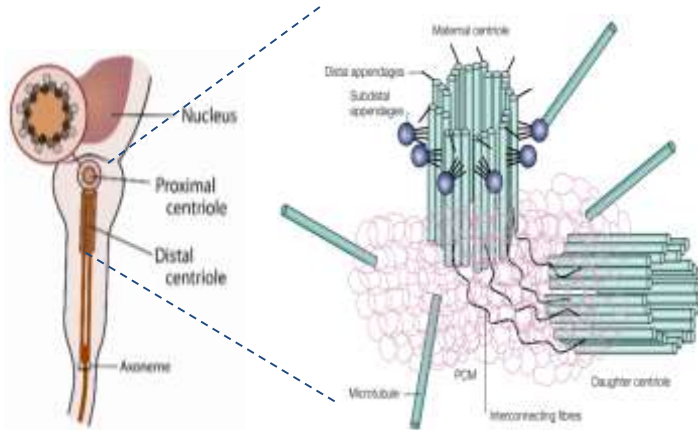
Sperm FISH

Table II Outcomes of ICSI cycles in the three different groups (not including frozen embryo transfers).

Variable	MMAF DNAHI +	MMAF DNAHI -	Overall ICSI outcomes in age-matched patients
No. of patients	6	13	1431
Mean male age (years)	36.1 ± 4.8	40.6 ± 7.3	40.5 ± 5.6
Mean female age (years)	31.6 ± 7.1	33.4 ± 4.4	34.4 ± 3.5
No. of cycles	9	29	1574
No. of oocytes collected	145	315	15 135
No. of oocytes injected	106	243	10 447
No. of oocytes fertilized	75	186	7292
Fertilization rate (%)	70.8	76.5*	69.8
Mean number of embryos replaced	2.0 ± 0.5	2.2 ± 0.5	2.0 ± 0.6
No. of transfers	8	28	1478
Implantation rate (%)	31.3	24.6	25.9
Clinical pregnancy (% per embryo transfer)	4 (50)	13 (46.5)	584 (39.5)
No. of miscarriage (n)	1	2	106
No. of deliveries (% per embryo transfer)	3 (37.5)	11 (39.3)	478 (32.3)



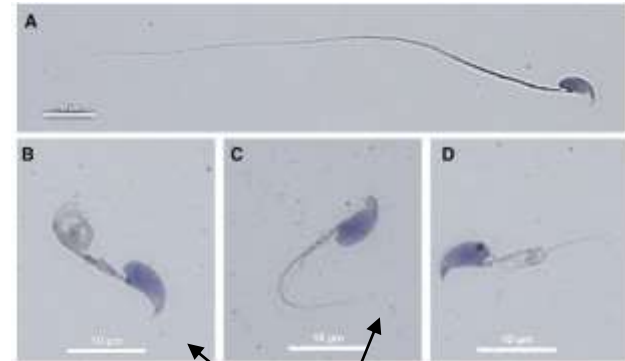
Est-ce vrai pour tous les gènes ?



- ✓ Mutations tronquantes homozygotes dans *CCDC146* chez 2 patients de la cohorte
- ✓ Protéine CCDC146 (coil-coil domain protein) localisée sur le centriole mère
- ✓ Expression testiculaire spécifique



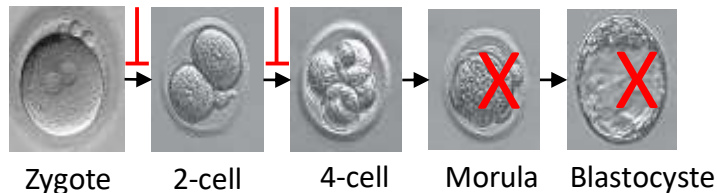
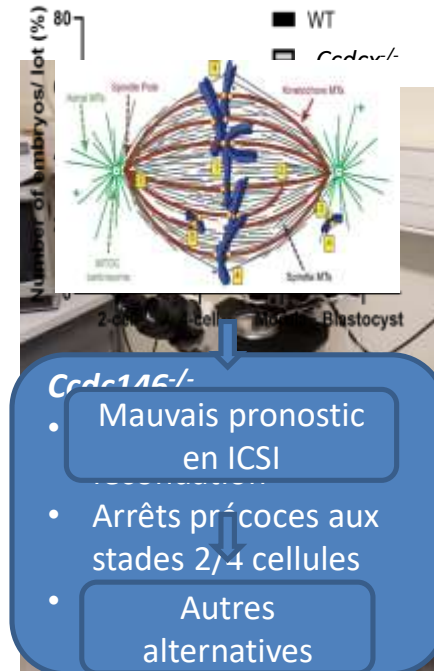
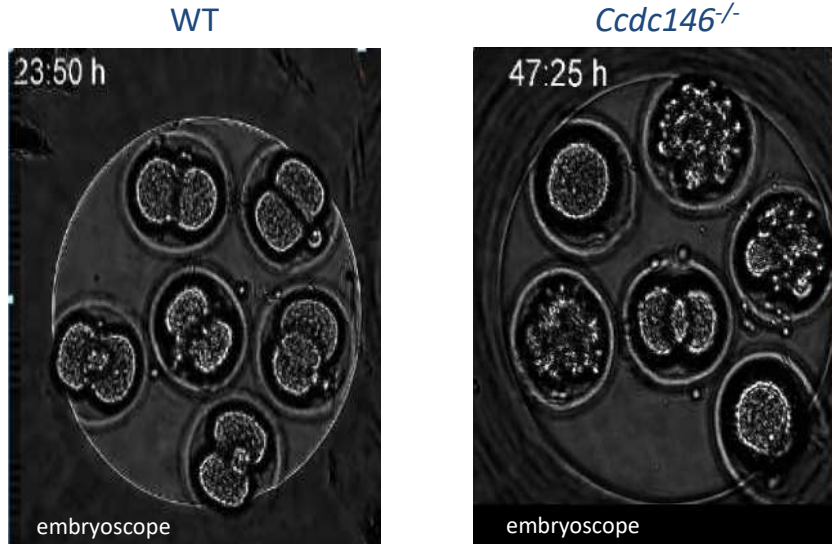
KO *Ccdc146*^{-/-}



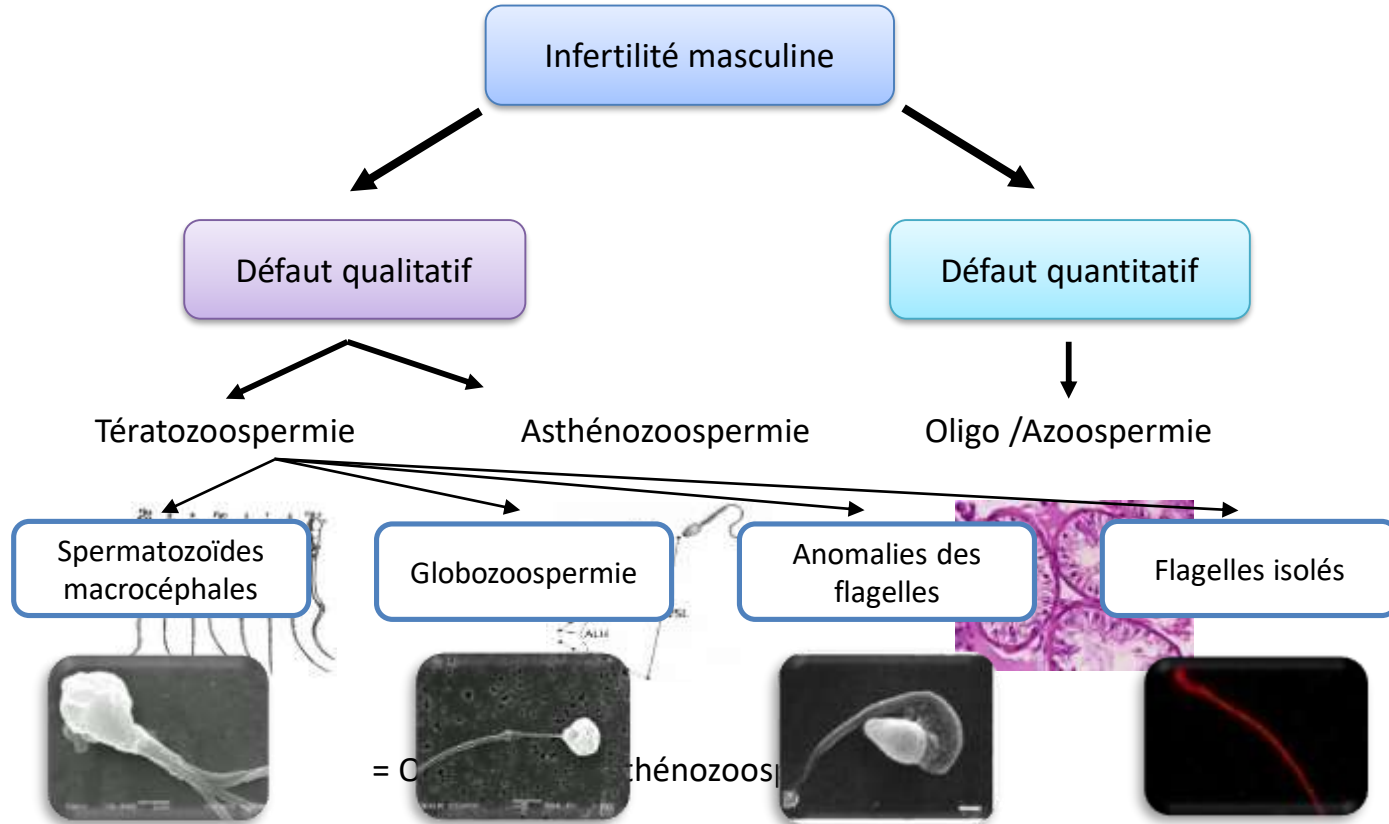
Flagelles enroulés, courts



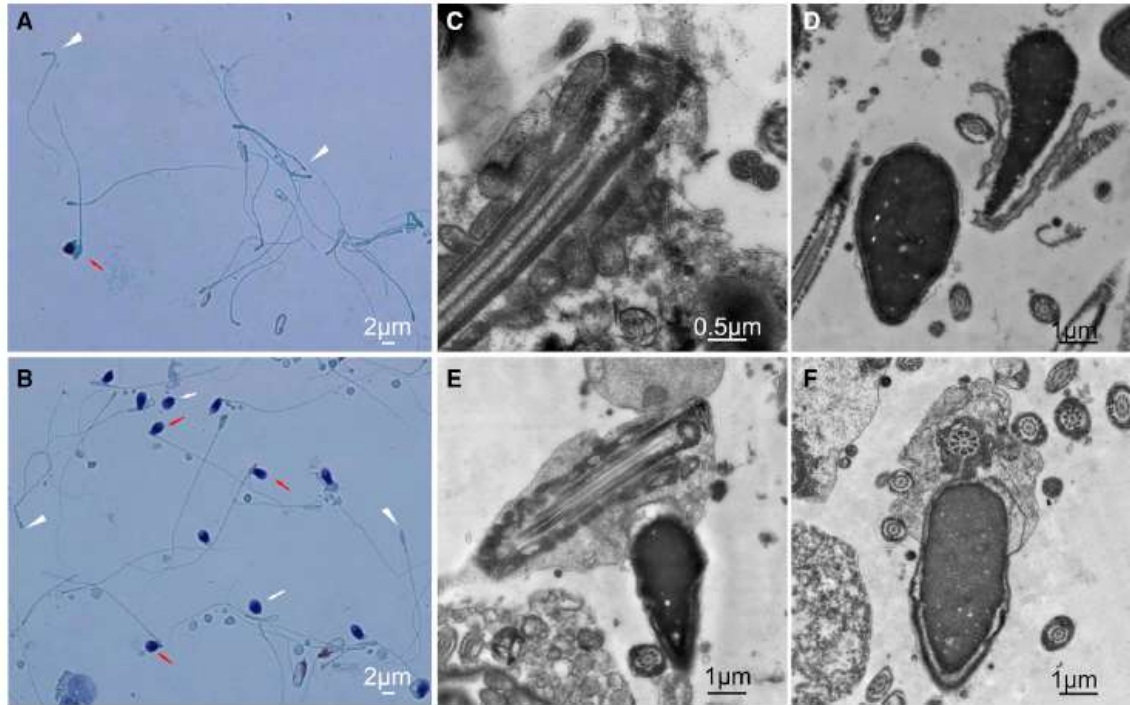
CCDC146 et développement embryonnaire



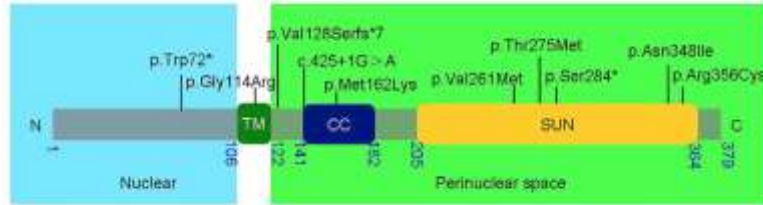
Phénotypes



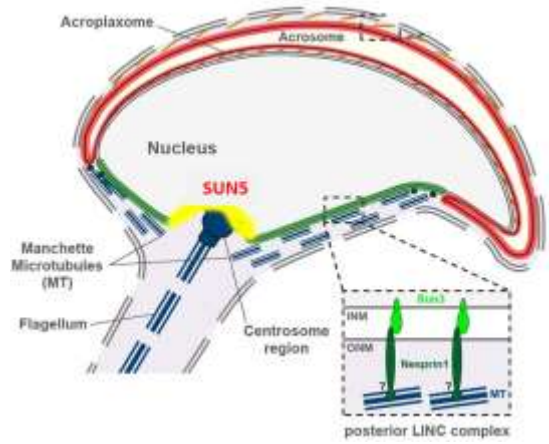
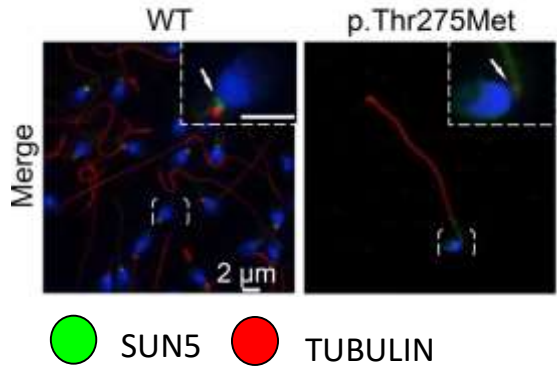
Têtes isolées (spz décapités)



Flagelles isolés (spz décapités)



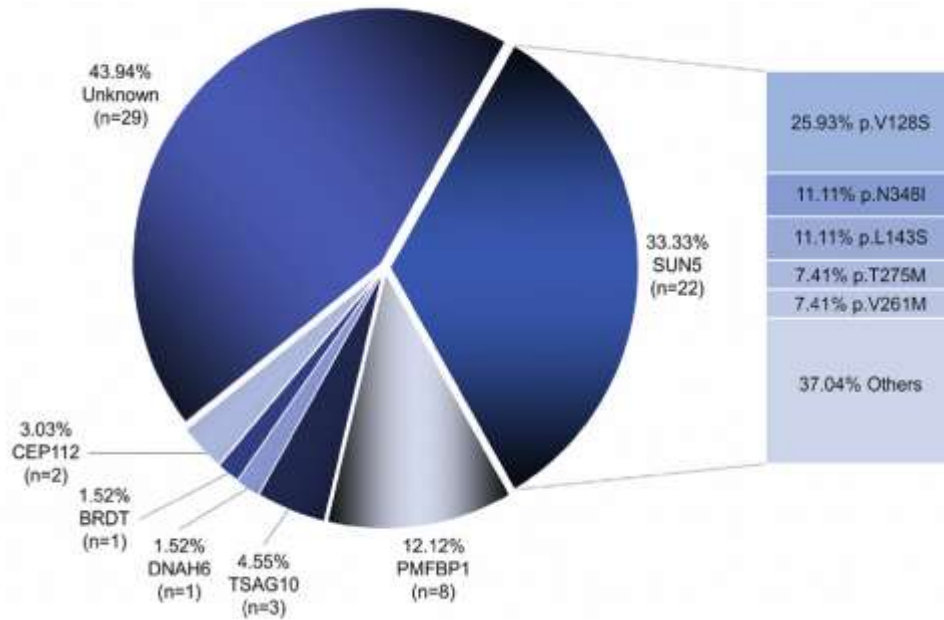
8/15 (47%)
patients analysés
ont une mutation
SUN5



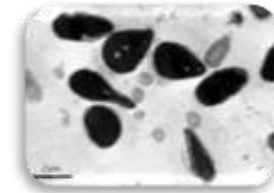
SUN5 est localisé sur la membrane nucléaire interne en vis-à-vis du flagelle (fossette d'implantation) et sert à fixer le flagelle au noyau



Recommandations



- SUN5 est le gène le plus fréquemment muté (1/3)
- Hétérogénéité génétique et mutationnelle



Séquençage *SUN5*



Séquençage NGS



Génotype et pronostic de l'ICSI



Human Reproduction, pp. 1–4, 2018
doi:10.1093/humrep/dex182

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE **Andrology**


Patients with acephalic spermatozoa syndrome linked to *SUN5* mutations have a favorable pregnancy outcome from ICSI

Jianzheng Fang¹, Jingjing Zhang^{2,3}, Fuxi Zhu^{2,3,*}, Xiaoyu Yang^{1,*}, Yugui Cui¹, and Jiayin Liu¹

WILEY 

ORIGINAL ARTICLE

TSGA10 is a novel candidate gene associated with acephalic spermatozoa

Y.-W. Sha¹ | Y.-K. Sha² | Z.-Y. Ji¹ | L.-B. Mei¹ | L. Ding¹ | Q. Zhang¹ | P.-P. Qiu¹ | S.-B. Lin¹ | X. Wang¹ | P. Li¹ | X. Xu³ | L. Li⁴ 

SHORT REPORT

 WILEY

Patients with acephalic spermatozoa syndrome linked to novel *TSGA10/PMFBP1* variants have favorable pregnancy outcomes from intracytoplasmic sperm injection



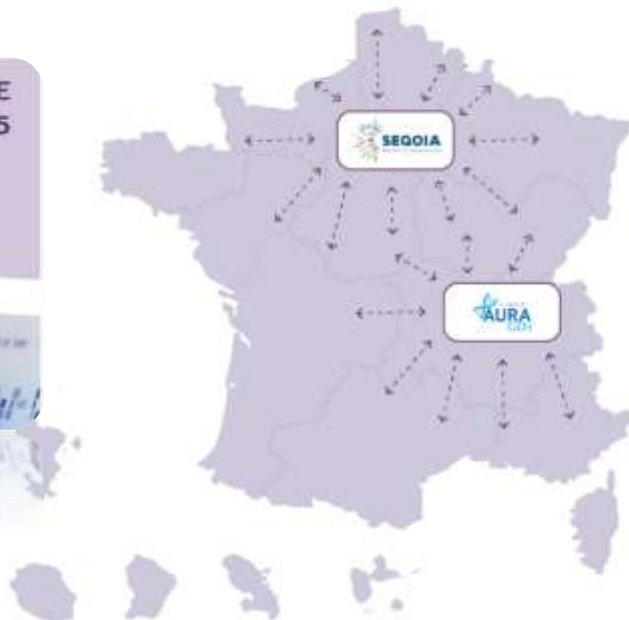
Quelle stratégie diagnostique possible en routine ?

A adapter selon :

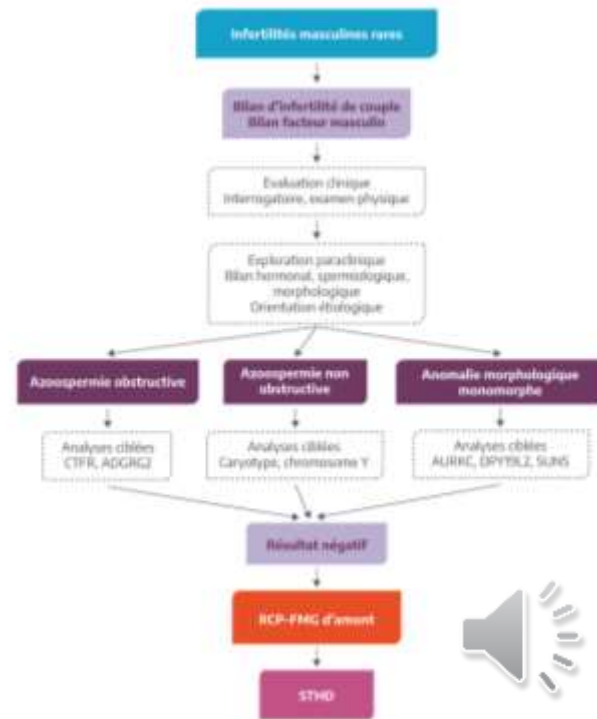
- Critères phénotypiques +++
- L'hétérogénéité génétique +++
- Rendement diagnostique des gènes connus
- En fonction du type d'anomalies à détecter
- Exploitation des résultats en recherche ?



Plan France Médecine Génomique 2025



PLACE DU STHD DANS LA STRATÉGIE DIAGNOSTIQUE



En résumé

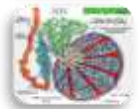


Azoospermie non
obstructive



1. Caryotype + microdeletion Y 2. Exome (NGS)

Biopsie à discuter en fonction du génotype ?



Azoospermie
Obstructive



Recherche *CFTR*, si neg. *ADGRG2*

Microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA)



Asthenozoospermie



Pas de recommandation

Pas de contre-indication à l'ICSI



Macrozoospermie



Recherche *AURKC*

ICSI contre-indiquée



Globozoospermie



Recherche *DPY19L2*

ICSI très discutable (PLCzeta ?)



Défauts flagellaires



Exome (NGS)

Pronostic de l'ICSI corrélé au génotype



Flagelles isolés



Recherche *SUN5* puis NGS (exome)



MERCI DE VOTRE ATTENTION

