

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 147794 8

ANNEE 2004



SCO/372-6/372-7/N°3704

Thèse : 337/1/1

**Microdélétions du chromosome Y et infertilité
masculine : mise au point de la technique de
détection consensuelle et revue de la littérature**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenue après soutenance du

MEMOIRE
Du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement
Le 28 octobre 2004 à Toulouse
Par

Marjolaine HERAUD
Née à Nantes le 10 novembre 1976

JURY

Président : Monsieur le professeur P. Calvas
Directeur de thèse : Monsieur le Docteur L. Bujan
1^{er} assesseur : Monsieur le professeur J.L. Beneytout
2^{ème} assesseur : Monsieur le Docteur S. Hamdi

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur CHULIA Dominique

Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE - CRYPTOGRAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE - CRYPTOGRAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy

PHARMACOGNOSIE

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE

CARDI Patrice

PHYSIOLOGIE

CLEDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE

COMBY Francis

CHIMIE THERAPEUTIQUE

DELEBASSEE Sylvie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

DREYFUSS Marie-Françoise

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

EA KIM Leng (CLM)

PHARMACODYNAMIE

FAGNERE Catherine

CHIMIE ORGANIQUE

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE

FOURNIER Françoise

BIOCHIMIE

JAMBUT Anne Catherine

CHIMIE THERAPEUTIQUE

LAGORCE Jean-François

CHIMIE ORGANIQUE

LARTIGUE Martine

PHARMACODYNAMIE

LIAGRE Bertrand

SCIENCES BIOLOGIQUES

LOTFI Hayat

TOXICOLOGIE

MARION-THORE Sandrine

CHIMIE THERAPEUTIQUE

MOREAU Jeanne

IMMUNOLOGIE

PARTOUCHE Christian

PHYSIOLOGIE

ROUSSEAU Annick

BIOMATHEMATIQUE

SIMON Alain

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE

TROUILLAS Patrick

BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

VIANA Marylène

PHARMACIE GALENIQUE

VIGNOLES Philippe

INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER

BELLET Virginie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE

DUCHIRON Cécile

PHARMACOLOGIE

A notre président de thèse,

Monsieur le professeur Patrick Calvas
Professeur des Universités
Chef de service du laboratoire de génétique
Hôpital Purpan – CHU Toulouse

Nous vous sommes très reconnaissante d'avoir accepté la
présidence du jury de cette thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre
profond respect

A notre jury de thèse

Monsieur le professeur Jean-Louis Beneytout
Professeur des Universités
Hôpital Dupuytren – CHU Limoges

Nous sommes particulièrement sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.
Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

Monsieur le Docteur Louis Bujan
Maître de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier
Laboratoire de spermologie – CECOS Midi-Pyrénées
Groupe de recherche Fertilité Humaine (EA 3694)
Hôpital Paule De Viguier – CHU Toulouse

Vous nous avez accordé votre confiance pour la réalisation de ce travail.
Nous avons pu apprécier à cette occasion votre compétence et votre grande disponibilité.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Safouane Hamdi
Laboratoire de biochimie
Hôpital La Grave – CH Toulouse

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à ce travail.
Merci d'avoir accepté spontanément de siéger au jury de cette thèse.

Je dédie cette thèse,

A ma grand-mère Anne pour sa patience et sa gentillesse.

A mes parents pour leur amour et leur soutien permanent.

A mon frère Guillaume sans qui la vie aurait été bien triste.

A mes grands-parents disparus Violette, Lucien et Edouard.

A mes amis de Nantes, Limoges et Toulouse pour leur humour et leur constance.

Merci tout particulièrement à Andrée, Claudine, Corinne, Françoise, Laurence, Myriam, Nicole, Martin... qui ont rendu ce travail possible par leurs conseils et leur bonne humeur de tous les jours.

Merci également au Docteur Isabelle Aknin-Siefer pour son aide précieuse dans la réalisation de cette étude.

1/ INTRODUCTION	10
2/ LA SPERMATOGENESE	11
II Les différentes phases de la spermatogenèse (figure n°3)	15
A) Première phase : spermatogonies et renouvellement cellulaire.	15
B) Deuxième phase : spermatocytes et méiose	16
1) La mitose réductionnelle (figure n°4)	16
2) La mitose équationnelle (figure n°5)	19
C) Troisième phase: spermiogenèse (figure n°6)	21
III La régulation de la spermatogenèse	25
A) La régulation neuro-endocrine	25
B) La régulation paracrine et autocrine	27
1/ La régulation paracrine de la fonction leydigienne	27
2/ La régulation paracrine du tubule séminifère	27
C) La régulation non endocrine et non paracrine	28
1) Régulation vasculaire	28
2) Régulation thermique	28
D) Facteurs extérieurs influençant la spermatogenèse	29
3/ LE CHROMOSOME Y	30
I La structure du chromosome Y	30
A) Les régions d'homologie	44
B) La région non recombinante NRY : Male Specific region MSY	47
III Les fonctions du chromosome Y	65
A) La détermination du sexe (figure n°20)	65
1) SRY	65
2) Les autres gènes de la cascade (figure n°19)	67
B) La fertilité masculine	71
C) La croissance staturale : l'effet anti-Turner	71
4/ CHROMOSOME Y ET INFERTILITE	73
I Les causes de l'infertilité masculine	73
III Infertilité et anomalies caryotypiques	75
III Les délétions du chromosome Y	77
A) Origine des microdélétions	77
B) Conséquences des délétions sur la spermatogenèse : lien entre génotype et phénotype.	80
C) Epidémiologie	85
IV Conclusion : diagnostic d'une infertilité masculine	103
5/ INTERET DE LA PCR MULTIPLEX ET APPLICATION AU LABORATOIRE DU CECOS	112
I) La PCR	112
A) Principe	112
B) Limites	117
C) Les principaux problèmes rencontrés	118
D) Exploitation des produits amplifiés par PCR	122
II) Les recommandations de l'EAA (European Academy of Andrology)	122

III) Mise au point de la technique au laboratoire du CECOS de Toulouse	129
A/ Matériel et méthodes	130
B/ Résultats	131
<i>MIX 1 et 2 : deux PCR quadruplex</i>	<i>132</i>
<i>MIX 7 : PCR simplex</i>	<i>136</i>
C/ Discussion	137
IV) Résultats obtenus	140
<i>6/ CONCLUSION</i>	<i>141</i>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>142</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>149</i>
<i>EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE LEUCOCYTES</i>	<i>150</i>
Produits et matériel utilisés	150
Technique	151
DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT	153
<i>PROTOCOLES DE REALISATION DES PCR MULTIPLEX</i>	<i>154</i>
1/ Réactifs utilisés	154
2/ Préparation des mix	156
Programme d'amplification n°126	156
Programme d'amplification n°124	157
Programme d'amplification n°123	158
Programme d'amplification n°128	159
3/ Amorces	160
4/ Visualisation des bandes	161
5/ Rendu du résultat	161
6/ Interprétation des résultats – conduite à tenir	162
<i>PRECAUTIONS PARTICULIERES AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE</i>	
<i>MOLECULAIRE</i>	<i>163</i>
1/ Organisation des locaux	163
2/ Port de blouse et de gants	164
3/ Matériel utilisé	164
4/ Décontamination des surfaces	165
5/ Précautions de manipulation concernant le technicien	165
6/ Gestion des déchets propre à l'activité de biologie moléculaire	165
<i>GLOSSAIRE</i>	<i>168</i>

1/ INTRODUCTION

Les problèmes d'infertilité du couple, bien qu'ils soient de mieux en mieux pris en charge, restent à l'heure actuelle un problème de santé publique. L'origine masculine de cette infertilité peut être suspectée dans près de 40% des cas parmi lesquels 50 à 60% ne pourront être diagnostiqués précisément.

Bien qu'on ne connaisse pas encore toutes les causes génétiques d'infertilité masculine, certaines ont été clairement identifiées et doivent donc être explorées de façon judicieuse et correcte. La technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) étant particulièrement adaptée à la recherche d'anomalie moléculaire, c'est celle qui a été choisie par le plus grand nombre pour la détection des microdélétions du chromosome Y.

Devant la diversité des résultats obtenus par les différents laboratoires pratiquant cette technique de PCR, l'Académie Européenne d'Andrologie (EAA) a décidé d'édicter des règles de bonne pratique visant à uniformiser les techniques employées. Suite à ces recommandations, le laboratoire du CECOS a décidé d'adapter sa technique de PCR afin d'obtenir, par une méthode certifiée et beaucoup plus rapide, des résultats fiables en ce domaine.

Notre travail a donc consisté à adapter cette technique de PCR multiplex aux spécificités du laboratoire du CECOS de Toulouse.

Après un rappel sur la physiologie de la spermatogenèse et sur la constitution du chromosome Y, nous détaillerons la technique de PCR, les recommandations de l'EAA et la mise au point des différentes amplifications nécessaires au diagnostic de microdélétions du chromosome Y.

2/ LA SPERMATOGENESE

La spermatogenèse ou fonction gamétogène mâle est le processus physiologique permettant l'obtention de spermatozoïdes par multiplication et différenciation cellulaire à partir des cellules germinales souches.

Elle débute à la puberté sous l'influence des gonadotrophines et devient moins efficiente avec l'âge.

La spermatogenèse a lieu dans les tubules séminifères (figure n°1 et 2). Elle peut être décomposée en quatre phases distinctes : une phase de multiplication des spermatogonies (renouvellement cellulaire important), une phase de multiplication des spermatocytes par méiose, une phase dite de spermiogenèse (différenciation en spermatides) puis une phase de spermiation (obtention des spermatozoïdes).

C'est un mécanisme centripète : il démarre au bord de la membrane du tubule séminifère et se termine au niveau de la lumière de ce tubule c'est-à-dire au centre de celui-ci.

Le cycle spermatogénétique est le temps qui s'écoule entre la première division de spermatogonie entrant en spermatogenèse et la spermiation (libération des spermatozoïdes dans la lumière du tubule), temps constitué par la succession des différents stades de maturation d'une même génération de cellules germinales (une génération est l'ensemble des cellules germinales reliées par un pont cytoplasmique et provenant toutes d'une même spermatogonie Ap : groupe cellulaire isogénique). Chez l'homme, le cycle spermatogénétique dure 74 jours. Le départ d'une nouvelle lignée en un point donné du tubule est déclenché tous les 16 jours.

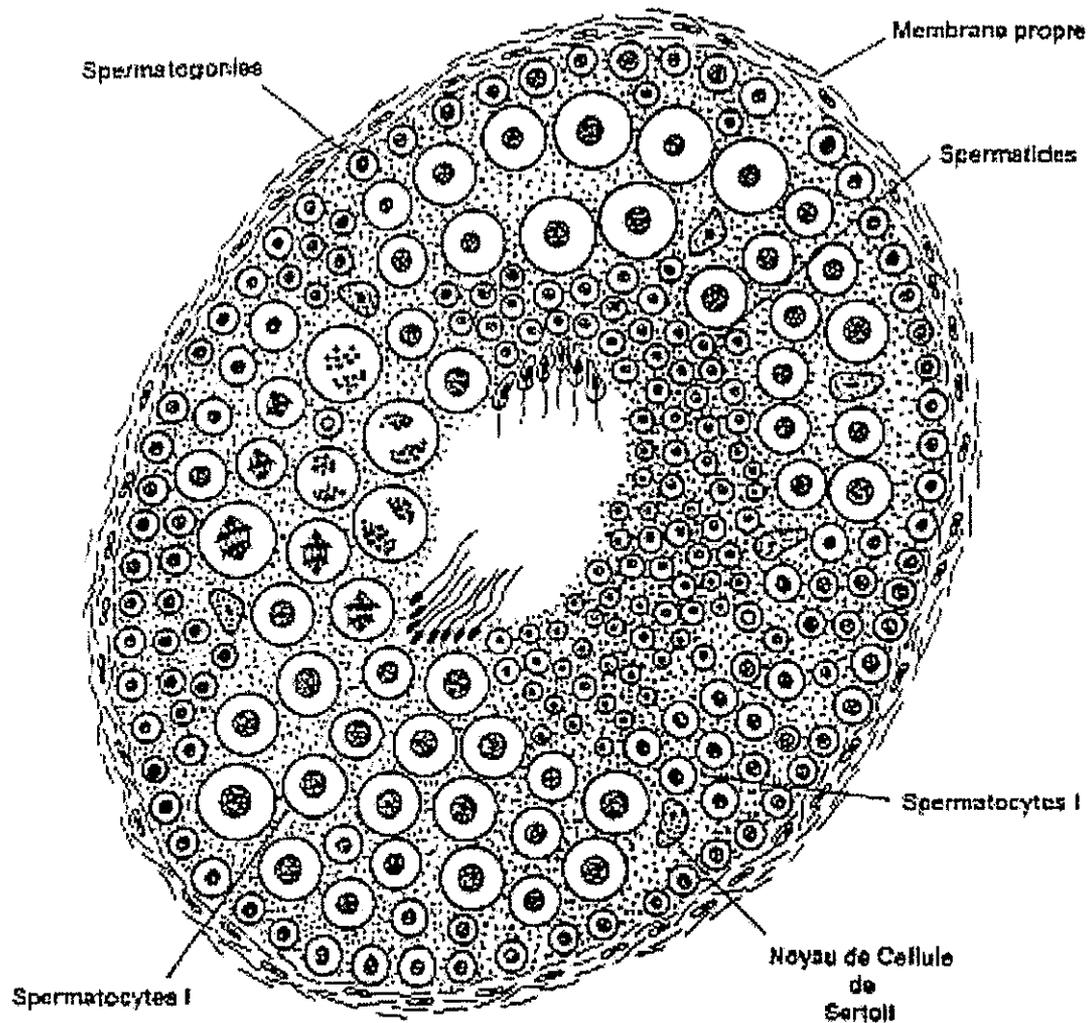


Figure 1 : Coupe transversale d'un tube séminifère d'après Prs Czyba et Montella [1]

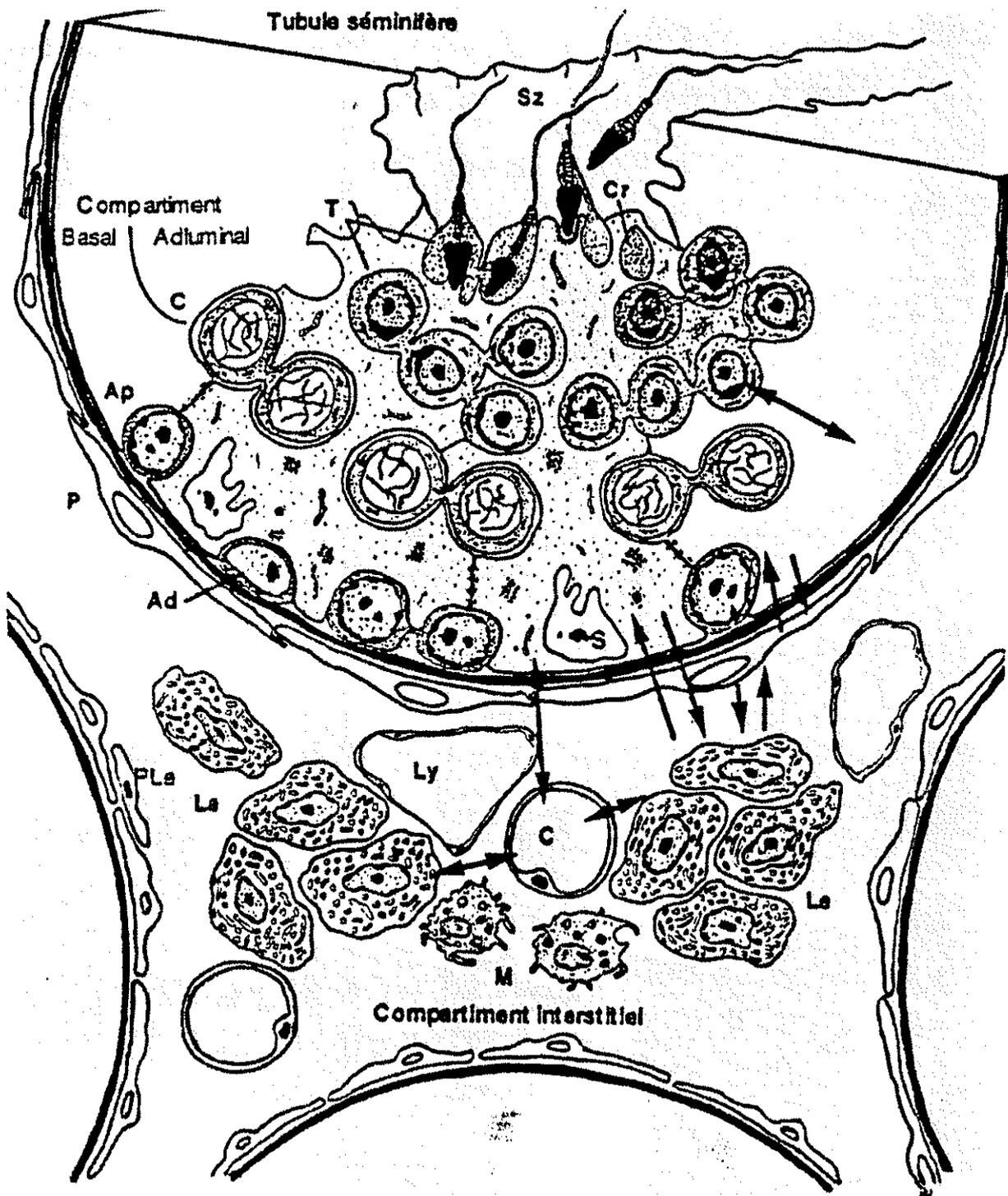


Figure n°2 : coupe d'un tube séminifère (Dr Bujan)

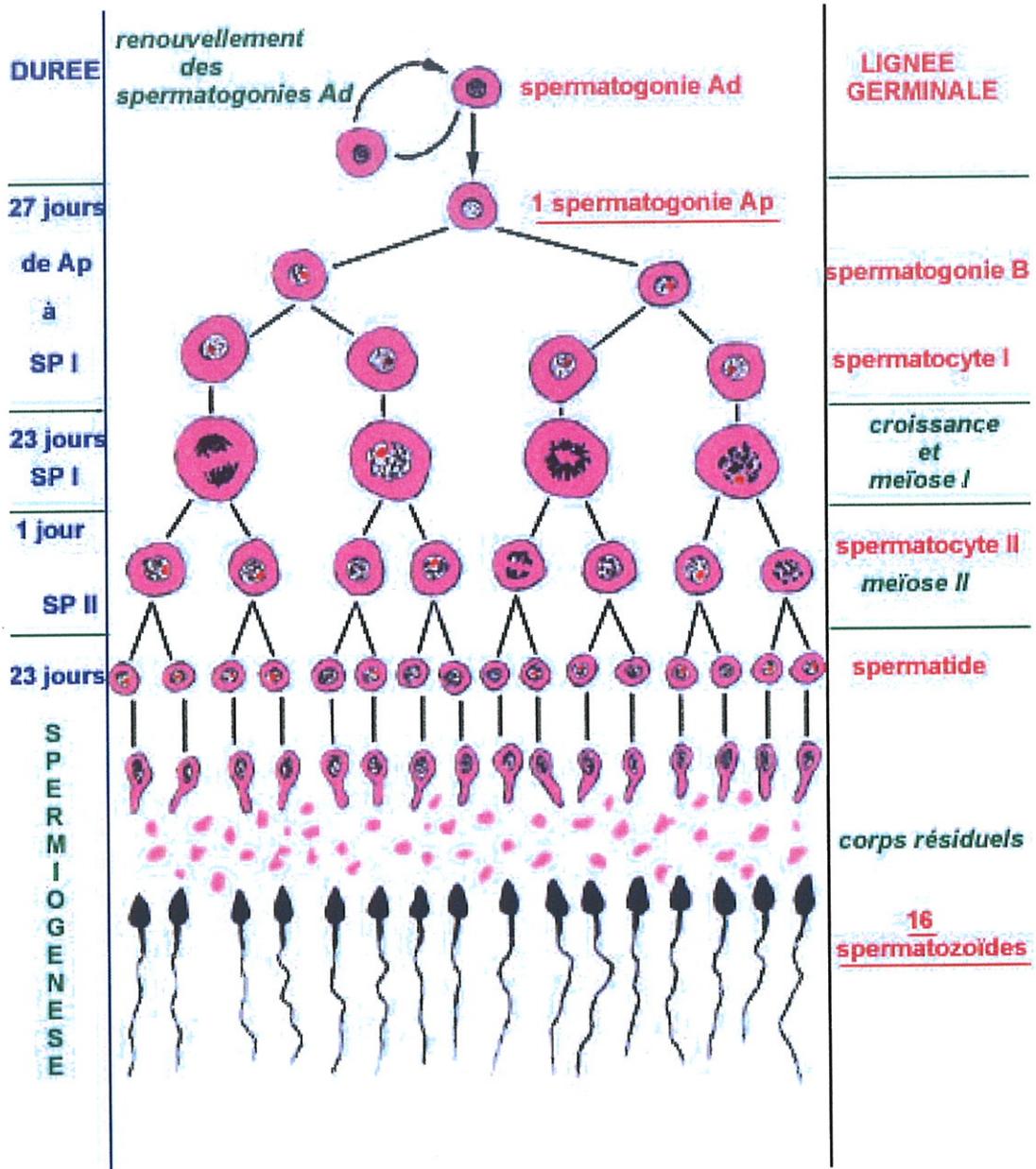


Figure n°3 : Schéma théorique de la spermatogenèse d'après Nicole Vacheret sur <http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr>

I/ Les différentes phases de la spermatogenèse (figure n°3)

A) Première phase : spermatogonies et renouvellement cellulaire.

Les spermatogonies sont les cellules souches diploïdes de la spermatogenèse. Elles sont toujours disposées à la périphérie du tubule au contact de la membrane basale. Trois populations de spermatogonies sont identifiées :

→ Les spermatogonies Ad à chromatine finement granuleuse dense d'aspect sombre (d = « dark ») considérées comme des cellules de réserve. Elles s'activent et se multiplient lorsque le nombre de cellules germinales est inférieur à un certain seuil.

→ Les spermatogonies Ap à chromatine « poussiéreuse » claire (p = « pale ») qui se multiplient par mitoses somatiques normales. Leur durée de vie moyenne est de 18 jours. Lorsqu'elles se divisent et se différencient en spermatogonies B, on dit qu'elles entrent en spermatogenèse. La division des spermatogonies Ap est incomplète : un pont cytoplasmique persiste entre les deux cellules filles issues d'une même cellule mère.

→ Les spermatogonies B dont la chromatine forme de gros grains irréguliers et qui proviennent de la division des Ap. Leur durée de vie est de 9 jours.

Les ponts cytoplasmiques existant entre les cellules vont persister tout au long du processus de spermatogenèse ce qui permet une synchronisation de leur développement : les cellules dérivant de ces groupes restent elles-mêmes attachées formant ainsi des clones de cellules rendues au même stade de différenciation. Ces ponts persistent jusqu'à la fin de la spermiogenèse au moment où les spermatozoïdes perdent leur corps résiduel.

B) Deuxième phase : spermatocytes et méiose

1) La mitose réductionnelle (figure n°4)

La division des spermatogonies B aboutit à la formation des spermatocytes de premier ordre.

Ceux-ci restent en interphase pendant quelques jours puis a lieu une réplication de l'ADN suivie de la première mitose de la méiose. Elle est caractérisée par sa prophase qui se déroule à travers plusieurs stades :

- Stade leptotène : les chromosomes sont sous formes de filaments fins et enchevêtrés et sont rattachés à l'enveloppe nucléaire par leurs extrémités.

- Stade zygotène : les chromosomes homologues, disposés en boucle, s'apparient. Ils sont partiellement réunis au niveau du complexe synaptoménal.

- Stade pachytène : l'appariement est complet : les séquences homologues sont juxtaposées et les centromères sont au même niveau. Chaque paire de chromosome forme un bivalent ou tétrade de chromatides. Les chromosomes sexuels ne s'apparient que par leur extrémité pseudo-autosomique et sont isolés contre l'enveloppe nucléaire sous la forme d'une petite motte d'hétérochromatine (vésicule sexuelle dite maintenant X-Y body). Au niveau des complexes synaptonémaux des condensations protéiques (« nodules de recombinaisons ») apparaissent à intervalles réguliers et entraînent la formation d'enjambement (crossing over) entre les chromatides non-sœurs du bivalent. Ce stade dure environ 16 jours. Malgré la mitose en cours, il se produit une forte activité de synthèse d'ARN et de protéines. La cellule atteint un diamètre de 25 à 30 μm .

- Stade diplotène : Les chromosomes homologues s'écartent tout en restant réunis par des chiasmas. C'est au cours de cette séparation qu'a

lieu l'échange de matériel génétique entre les chromatides non-sœurs dans les régions correspondant aux enjambements.

- Stade diacinèse : les complexes synaptonémaux disparaissent, les centromères sont écartés et les chromosomes ne sont plus fixés que par des chiasmas distaux. La vésicule sexuelle disparaît et les chromosomes sexuels se ré individualisent.

La diacinèse est immédiatement suivie de la métaphase : les bivalents se disposent sur les fibres du fuseau, les centromères se trouvant de part et d'autre de la plaque équatoriale. Il y a formation de microtubules en direction des pôles du fuseau.

A l'anaphase, les microtubules se rétractent en provoquant la séparation des chromosomes des bivalents, chaque chromosome (à deux chromatides) étant entraîné vers l'un des pôles.

A la télophase, les enveloppes nucléaires se reconstituent mais la séparation cytoplasmique reste incomplète. On obtient deux spermatocytes de deuxième ordre réunis par un pont cytoplasmique.

A ce stade, le mécanisme de la méiose a déjà permis deux phases de brassage génétique (échange de segments entre chromatides à la prophase, séparation aléatoire des chromosomes maternels et paternels à la métaphase) et la ségrégation des chromosomes sexuels.

Cette première partie de méiose est appelée mitose réductionnelle car une cellule germinale à 46 chromosomes va donner naissance à deux cellules filles de 23 chromosomes à deux chromatides. Le nombre de chromosomes par cellules est divisé par deux mais la quantité d'ADN totale reste la même.

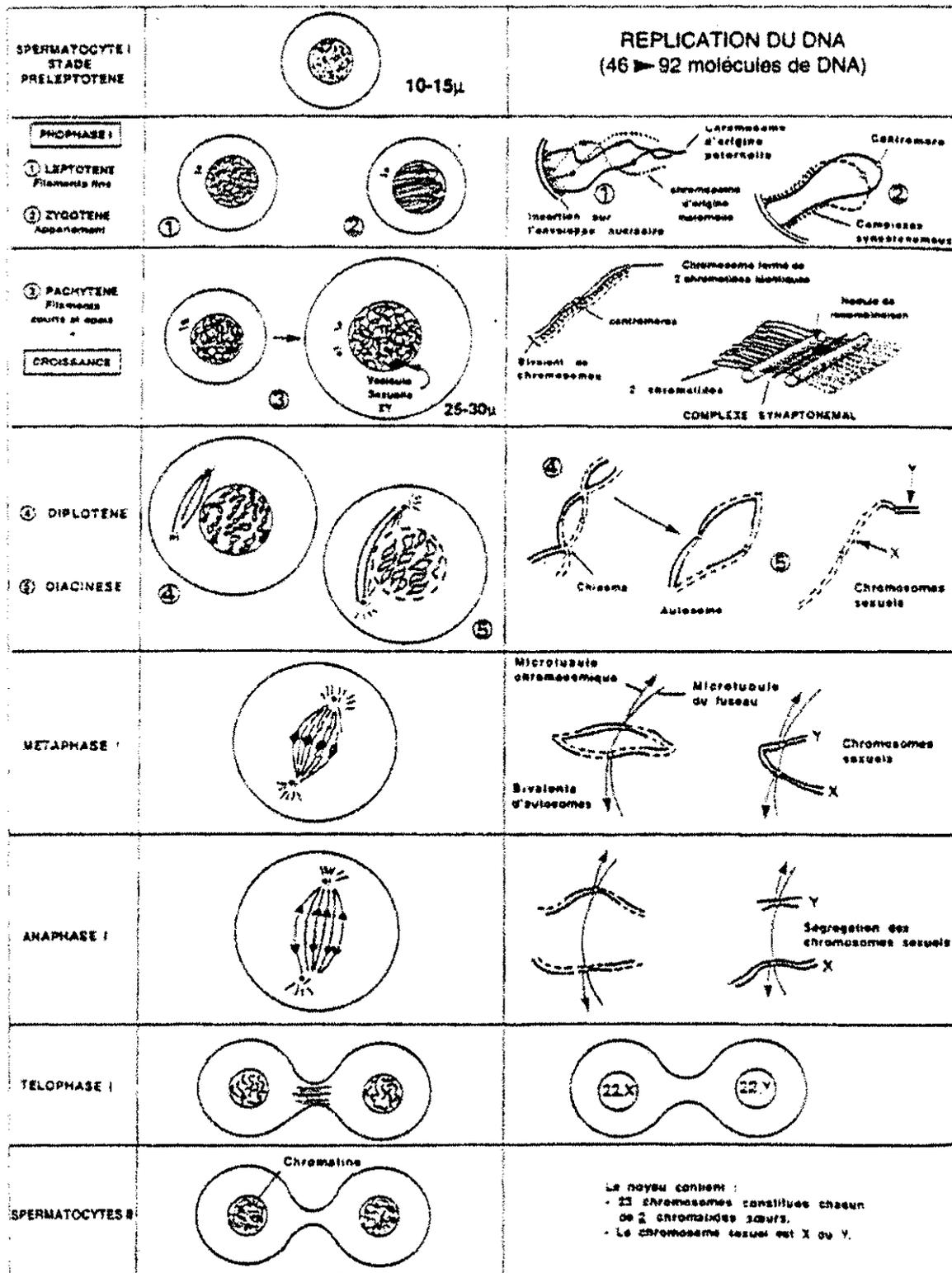


Figure n°4 : la mitose réductionnelle d'après Prs Czyba et Montella [1]

2) La mitose équationnelle (figure n°5)

Cette deuxième mitose a lieu très rapidement et sans être précédée d'une réplication de l'ADN.

Elle se déroule comme une mitose somatique normale à ceci près qu'il y a 23 chromosomes au lieu de 46.

A la fin de cette mitose, on obtient des spermatides reliées par un pont cytoplasmique.

Ces spermatides contiennent chacun 23 chromosomes à une seule chromatide.

Cette mitose est appelée équationnelle car le nombre de chromosomes ne change pas. Cependant, la quantité d'ADN chute de moitié.

L'ensemble des deux mitoses permet la réduction chromatique c'est-à-dire la formation de spermatides à 23 chromosomes et contenant 23 molécules d'ADN (une chromatide chacune).

Un spermatocyte primaire donne en théorie quatre spermatides. Cependant la méiose présente de nombreuses anomalies. Ainsi, 25 % des cellules dégénèrent entre les stades spermatocyte primaire et spermatide. Le rendement réel estimé est de deux ou trois au lieu de quatre. On ne connaît pas les raisons de cette dégénérescence mais il est notable qu'elle augmente avec l'âge.

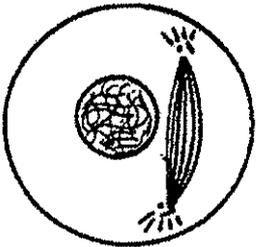
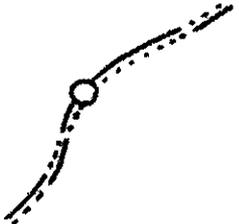
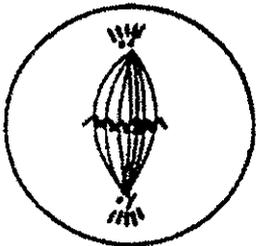
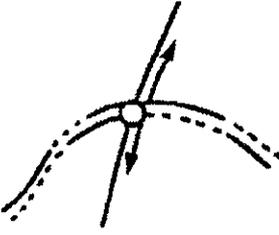
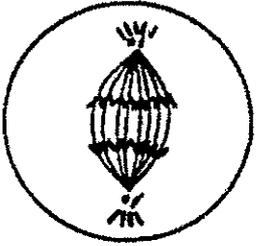
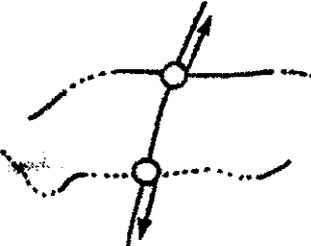
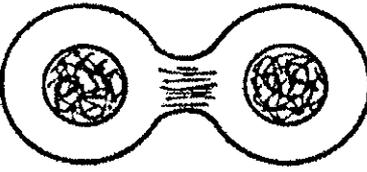
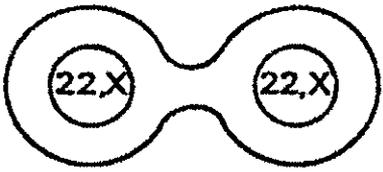
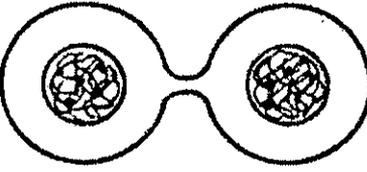
PROPHASE II		
METAPHASE II		
ANAPHASE II		
TELOPHASE II		
SPERMATIDES		<p>Le noyau contient :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 23 chromosomes constitué chacun d'une chromatide • le chromosome sexuel est identique dans les 2 cellules.

Figure n°5 : La mitose équationnelle d'après Prs Czyba et Montella [1]

C) Troisième phase: spermiogenèse (figure n°6)

Cette troisième étape dure 23 jours chez l'homme.

Les spermatides subissent des transformations morphologiques profondes qui permettent l'obtention de spermatozoïdes capables d'assurer la transmission du génome paternel à l'ovocyte. Cinq étapes sont nécessaires lors de cette phase :

- ❶ La réorganisation du noyau :
- ❷ Le développement du système acrosomique
- ❸ L'assemblage des structures du flagelle
- ❹ La perte du cytoplasme
- ❺ La formation de la pièce intermédiaire

Elle peut être subdivisée en 15 à 19 stades cytologiques :

Stades 1 à 8 : les spermatides rondes. Elles sont caractérisées par la mise en place de l'acrosome, la synthèse de la substance périnucléaire et la transformation de l'enveloppe nucléaire. On note une perte progressive de l'activité transcriptionnelle, l'inactivation puis la perte du nucléole et le remplacement des histones de type somatique par des variants spécifiques aux testicules. Petit à petit, il y a mise en place d'un axonème, partie principale du futur flagelle. L'acrosome régule son volume en émettant des vésicules postacrosomiques, le cytoplasme glisse en position distale et la vésicule proacrosomique sécrétée par l'appareil de Golgi rejoint le noyau.

Stades 9 à 11 : les spermatides en allongement. Les noyaux s'allongent et s'aplatissent. Ils sont entourés par une sorte de jupe constituée de microtubules, la manchette. Celle-ci est en relation avec une spécialisation du centriole proximal, la baguette centriolaire. Beaucoup de matériel est perdu à ce stade : histones, nucléoprotéines, granules péri et interchromatiniens. La chromatine se réorganise : la distinction entre hétéro et euchromatine s'estompe. Les spermatides s'enfoncent dans les espaces inter-sertoli et se rapprochent du pôle basal de l'épithélium séminifère.

Stades 12 à 15 : Les spermatides allongées. La chromatine se compacte fortement, la manchette glisse vers l'arrière du noyau et disparaît tandis que la substance périnucléaire s'étend vers l'arrière. Les spermatides rejoignent la lumière des tubes séminifères. L'annulus glisse le long de l'axonème et forme l'anneau de Jensen. Les grosses fibres qui flanquent l'axonème et la gaine fibreuse qui entoure le flagelle sont mises en place. Les mitochondries s'organisent en une hélice autour du flagelle uniquement dans sa partie proximale. Enfin, le cytoplasme contenant les organites non intégrés à la spermatide est phagocyté par les cellules de Sertoli lors de la spermiation phase au cours de laquelle les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubules séminifères. Ils sont immobiles et n'ont pas encore acquis leur pouvoir fécondant : leur maturation complète nécessite leur transit dans l'épididyme.

A l'exception des spermatogonies et des spermatocytes pré-méïotiques, localisés dans le compartiment basal, tous les éléments de la lignée germinale sont groupés dans le compartiment adluminal et sont donc entièrement dépendants des cellules de Sertoli en raison de l'existence de la barrière hémato-testiculaire (figure n°7).

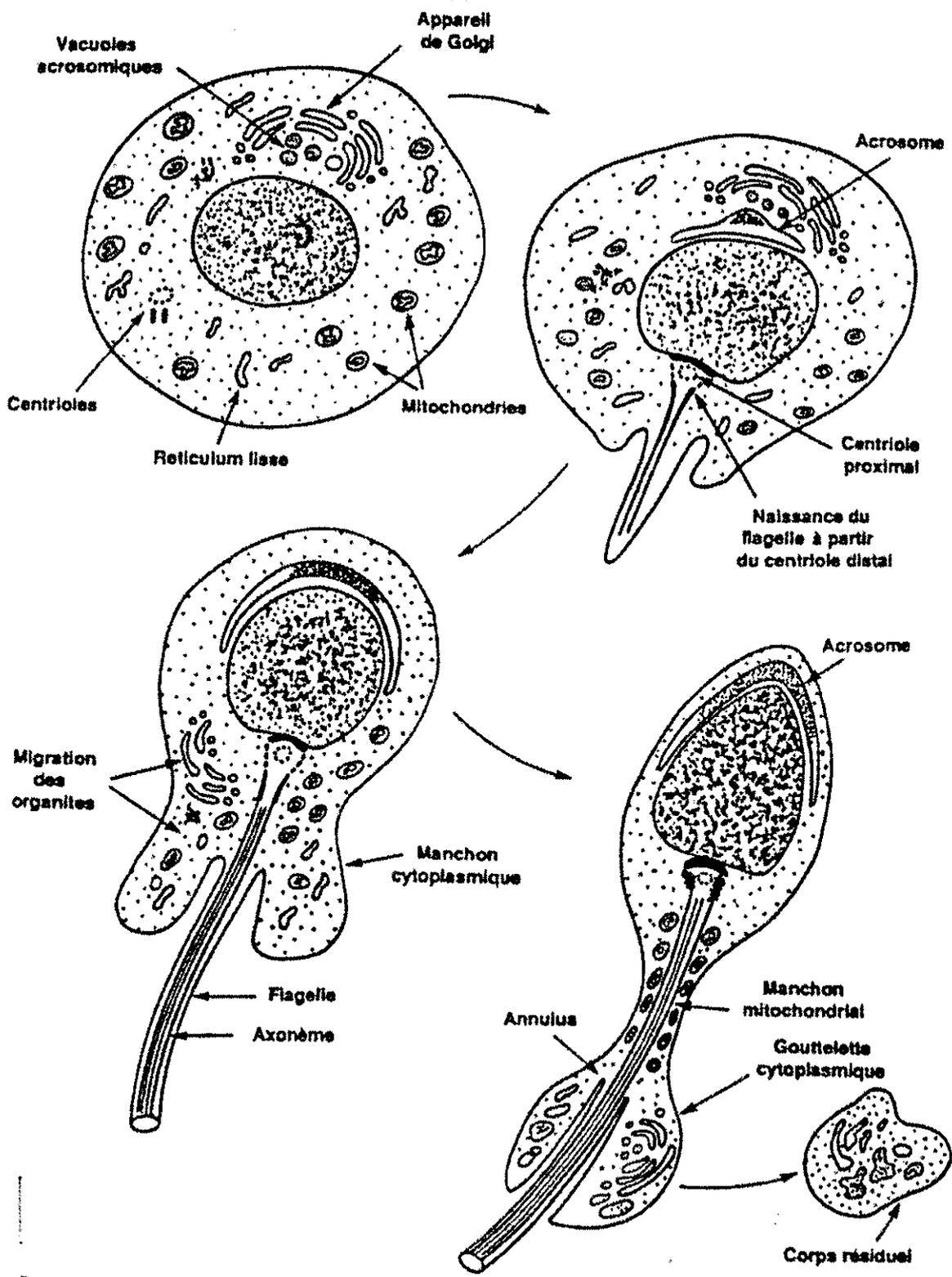


Figure n°6 : La spermiogenèse d'après Prs Czyba et Montella [1]

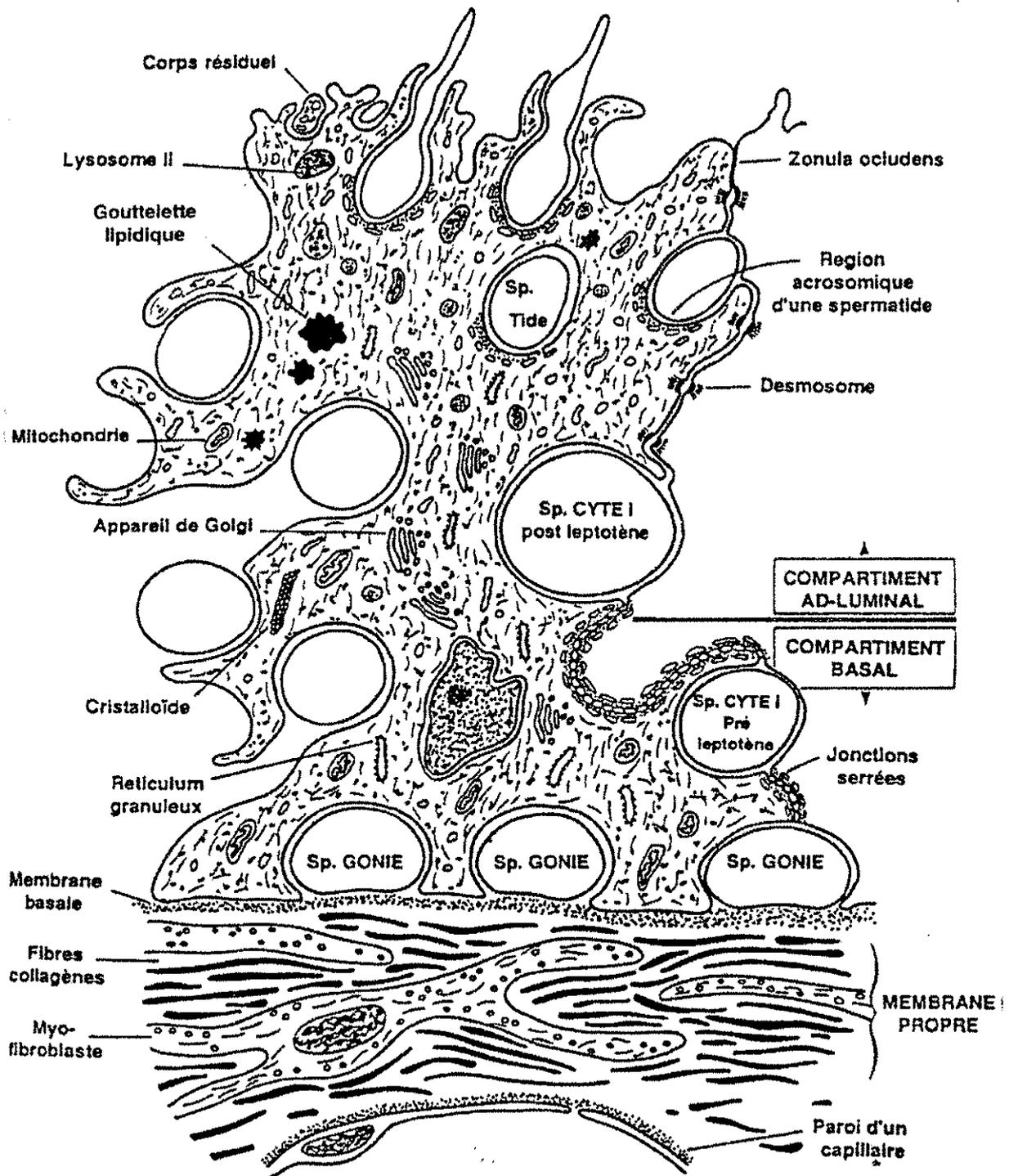


Figure n°7 : Structure histologique simplifiée de l'épithélium séminifère d'après Prs Czyba et Montella [1] : notion de barrière hémato-testiculaire (capillaire, membrane basale et cellule de Sertoli).

III/ La régulation de la spermatogenèse

Les fonctions testiculaires et donc la spermatogenèse sont soumises à un double contrôle, le contrôle neuro-endocrine grâce aux gonadotrophines hypophysaires et le contrôle paracrine local dû aux interactions cellulaires intra-gonadiques. Cependant, il faut noter l'influence déterminante d'autres facteurs physiologiques tels que la vascularisation et la régulation thermique du testicule.

A) La régulation neuro-endocrine

Elle est assurée par les hormones gonadotrophiques hypophysaires LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Folliculo-Stimulating Hormone) qui agissent de façon synergique. La sécrétion de ces deux hormones est contrôlée par un décapeptide hypothalamique le GnRH lui-même secrété de façon pulsatile (période de 60 à 90 minutes). La production de GnRH est influencée par les hormones sexuelles mais aussi par des neuro-peptides (ProOpioMélanoCortine) et par des neurotransmetteurs (N-Méthyl-D-aspartate, glutamate, acide gammabutyrique). Il existe également un système de rétrocontrôle positif et négatif agissant au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus.

La LH : elle se fixe sur des récepteurs spécifiques au niveau des cellules de Leydig et assure ainsi la production d'androgènes, indispensables à la spermatogenèse. Le nombre de récepteurs à LH sur les cellules de Leydig est augmenté par l'action de la PRL et de la GH.

La FSH : ses récepteurs spécifiques se trouvent sur les cellules de Sertoli. Son interaction avec ceux-ci permet la synthèse d'ABP (Androgen Binding Protein). L'ABP se lie à la testostérone et ce complexe permet l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. Dans les périodes prénatales et pré-pubertaires, la FSH a des effets mitogène sur les cellules de Sertoli ce qui permet leur prolifération jusqu'à la puberté période à laquelle elle s'arrête. Cette prolifération est très importante car c'est le nombre de cellule de Sertoli qui détermine la longueur de l'épithélium séminifère (donc sa capacité à produire des spermatozoïdes). Chez l'adulte, les effets mitotiques de la FSH s'exercent sur les spermatogonies. La FSH permet

également l'activation de certaines enzymes : 17β -oxydoréductase (conversion de l'androstènedione en testostérone), 5α -réductase (conversion de la testostérone en dihydrotestostérone) et aromatasase (conversion irréversible des androgènes en oestrogènes).

Le rétrocontrôle est assuré par plusieurs substances différentes :

- La testostérone et la dihydro-testostérone diminueraient la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus et de LH par l'hypophyse. Au contraire, elles augmenteraient la sécrétion de FSH par l'hypophyse. De plus, les cellules de Sertoli convertissent la testostérone en oestradiol. Celui-ci se fixe sur les cellules de Leydig et bloque la synthèse de testostérone.

- Les oestrogènes (issus de l'aromatation de la testostérone) exerceraient une inhibition sur les deux gonadotrophines.

- L'inhibine B, sécrétée par les cellules de Sertoli, réduit la sécrétion de FSH. Elle bloque également la duplication des spermatogonies B.

Le rôle des autres hormones sur la spermatogenèse est plus discuté :

La prolactine serait stimulante pour des faibles taux et inhibitrice pour des taux plus élevés.

L'insuline augmente la stéroïdogénèse basale et est stimulée par la LH.

Les glucocorticoïdes agissent sur des récepteurs de cellules de Leydig et entraînent une diminution de la conversion du cholestérol en hormones stéroïdes.

B) La régulation paracrine et autocrine

Dans la régulation paracrine, le facteur libéré dans le milieu interstitiel agit sur une cellule située à proximité sans emprunter le courant sanguin.

Dans la régulation autocrine, la cellule libère un facteur qui module son propre fonctionnement (elle est intracrine si le facteur ne sort pas de la cellule).

1/ La régulation paracrine de la fonction leydigienne

L'épithélium séminal est impliqué dans le contrôle de la fonction leydigienne : l'aspect et l'activité des cellules de Leydig varient selon les stades du cycle de l'épithélium séminifère.

La cellule de Sertoli produit des peptides capables de réguler la stéroïdogénèse : positivement avec l'inhibine et l'IGF1, négativement avec l'activine. Leur action est inverse sur la multiplication des cellules germinales.

Le TGF β entraîne une diminution du nombre des récepteurs à la LH sur les cellules de Leydig au contraire du TGF α qui augmente ses capacités stéroïdogènes.

2/ La régulation paracrine du tubule séminifère

P.Mod.S. (Protéine Modulant la fonction Sertolienne) est produite par les cellules péricubulaires sous l'influence de la testostérone leydigienne. Elle permet d'augmenter la production d'ABP et de transferrine et de diminuer l'action aromatisique.

L'ocytocine produite par la cellule de Leydig stimule la contraction des cellules péricubulaires.

L'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF α (Transforming Growth Factor α) et le β FGF (β Fibroblast Growth Factor) synthétisés par la cellule de Leydig ont un effet mitogène sur la cellule de Sertoli prépubère.

La cellule de Sertoli apporte au niveau du liquide tubulaire des éléments indispensables à la nutrition des cellules germinales. Elle produit le SCF (Stem Cell Factor) facteur impliqué dans la migration et la prolifération des cellules germinales primordiales et dans la multiplication des spermatogonies A.

Le $TNF\alpha$ présent dans les spermatocytes pachytènes et dans les spermatides rondes diminue l'activité aromatisique et la production d'inhibine par la cellule de Sertoli. Au contraire, il augmente la production de lactates et le nombre de récepteurs au FGF et à l'IGF1. Le FGF présent dans les spermatogonies et les spermatocytes pachytènes stimule toutes les fonctions sertoliennes.

L'EGF (Epidermal Growth Factor) produit par les cellules germinales augmente la production d'inhibine et d'IGF1 par les cellules de Sertoli.

C) La régulation non endocrine et non paracrine

1) Régulation vasculaire

Une artère unique arrive au testicule. Elle permet l'apport de tous les éléments nécessaires aux cellules testiculaires somatiques et germinales pour réaliser synthèse et multiplication cellulaire. Elle permet également le transport des substances synthétisées et sécrétées. Les quantités de substances transportées sont donc dépendantes du débit sanguin intra-testiculaire.

Le testicule est très sensible à l'ischémie : une ischémie de 30 minutes détruit les spermatides. Une ischémie d'une heure entraîne la destruction de toutes les cellules de la lignée germinale.

2) Régulation thermique

L'euthermie testiculaire se situe à une température inférieure de 3 à 5 °C à la température corporelle.

Deux systèmes permettent la régulation de la température testiculaire :

- Le plexus pampiniforme au niveau duquel ont lieu des échanges de température du sang artériel vers sang veineux permettant un pré-refroidissement du sang avant son arrivée au testicule. Ce système ne fonctionne que si le sang veineux est à une température inférieure à celle du sang artériel. Cette condition est assurée par le deuxième système.

- Le système scrotal : L'importante surface d'échange cutané (dartos et plissements), les modifications du débit sanguin scrotal et une sudation basale plus importante que dans tout autre territoire cutané permettent une

évacuation de la chaleur exogène (environnementale) et de la chaleur intra-testiculaire (chaleur apportée par le sang artériel et chaleur consécutive au métabolisme cellulaire). La mise en jeu de ces phénomènes thermorégulateurs est due à la présence de récepteurs cutanés thermiques localisés dans la peau scrotale.

Le réchauffement prolongé des testicules au-dessus de 37°C provoque un ralentissement notable de la spermatogenèse.

Ainsi toute fièvre prolongée chez un homme affecte transitoirement la spermatogenèse.

D) Facteurs extérieurs influençant la spermatogenèse

- Certaines pathologies : infections virales, varicocèle, cryptorchidie ...
- Certains traitements dont principalement la radiothérapie, la chimiothérapie, la ribavirine, la salazopyrine ...
- Des facteurs environnementaux comme les toxiques (pesticides, métaux lourds, certains éthylène-glycols), l'hyperthermie (soudeurs, céramistes, hauts-fourneaux), certains modes de vie (tabac, position assise prolongée)

La diminution séculaire de la production de sperme décrite ces dernières années est actuellement discutée et fait apparaître un rôle de l'environnement sur le testicule, in utero et chez l'individu.

3/ LE CHROMOSOME Y

Le chromosome Y est le plus petit des chromosomes humains (il ne représente que 2 à 3 % du génome haploïde). Comparé aux autres chromosomes, il ne contient que peu de gènes, ceux-ci étant essentiellement impliqués dans la différenciation sexuelle et la spermatogenèse.

Les chromosomes X et Y dériveraient d'une paire d'autosomes ancestraux. Au fil du temps, ils auraient subi de nombreuses modifications (transposition et duplication de gènes, insertions de séquences ...). Actuellement, ces deux chromosomes ne conservent de cette « histoire » que leur parties télomériques pseudo-autosomiques communes. De nombreux gènes, encore présents sur le chromosome X, ont été perdus sur le Y humain par rapport aux génomes des autres mammifères. A l'inverse, l'origine de certains gènes en simple copie Y spécifiques comme SRY reste encore une énigme.

I/ La structure du chromosome Y

La taille du chromosome Y est estimée à 60 Mb (50 286 555 bps). Il est composé d'une région d'hétérochromatine qui couvre environ la moitié du chromosome et de plusieurs régions d'euchromatine. Le chromosome Y a été subdivisé en 7 intervalles (carte de Vergnaud) et 43 sous-intervalles (carte de Vollrath). Les différentes subdivisions du chromosome Y sont présentées figure n°9. Si un certain nombre de gènes a pu être identifié à ce jour, la fonction de la majorité d'entre eux reste inconnue. Les gènes codant pour des protéines du chromosome Y ont été classés en deux catégories :

- Gènes en simple copie : Ils ont un homologue sur le chromosome X qui échappe à l'inactivation du chromosome X. Ils fonctionnent comme une paire de gènes autosomiques mais non soumis à recombinaison.

- Gènes Y spécifiques : le plus souvent présents en plusieurs copies, leur expression est théoriquement limitée au testicule et ils joueraient un rôle lors de la spermatogenèse

Cette classification connaît déjà des exceptions comme *RBM1*, gène appartenant à la deuxième catégorie et dont on a retrouvé un homologue sur le chromosome X.

Le chromosome Y contient beaucoup de séquences répétées (Alu, LINE) à l'origine de son instabilité durant l'évolution, de la fréquence de ses délétions et de la difficulté à le séquencer et à rechercher de petites délétions ou des mutations.

Il faut noter que le chromosome Y a été entièrement séquencé début 2003 à partir du génome d'un seul homme. Il semble donc prudent de considérer avec circonspection les résultats concernant les séquences polymorphes possiblement sur ou sous-représentées.

Une représentation récente et complète du chromosome Y est disponible sur le site : www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=Y

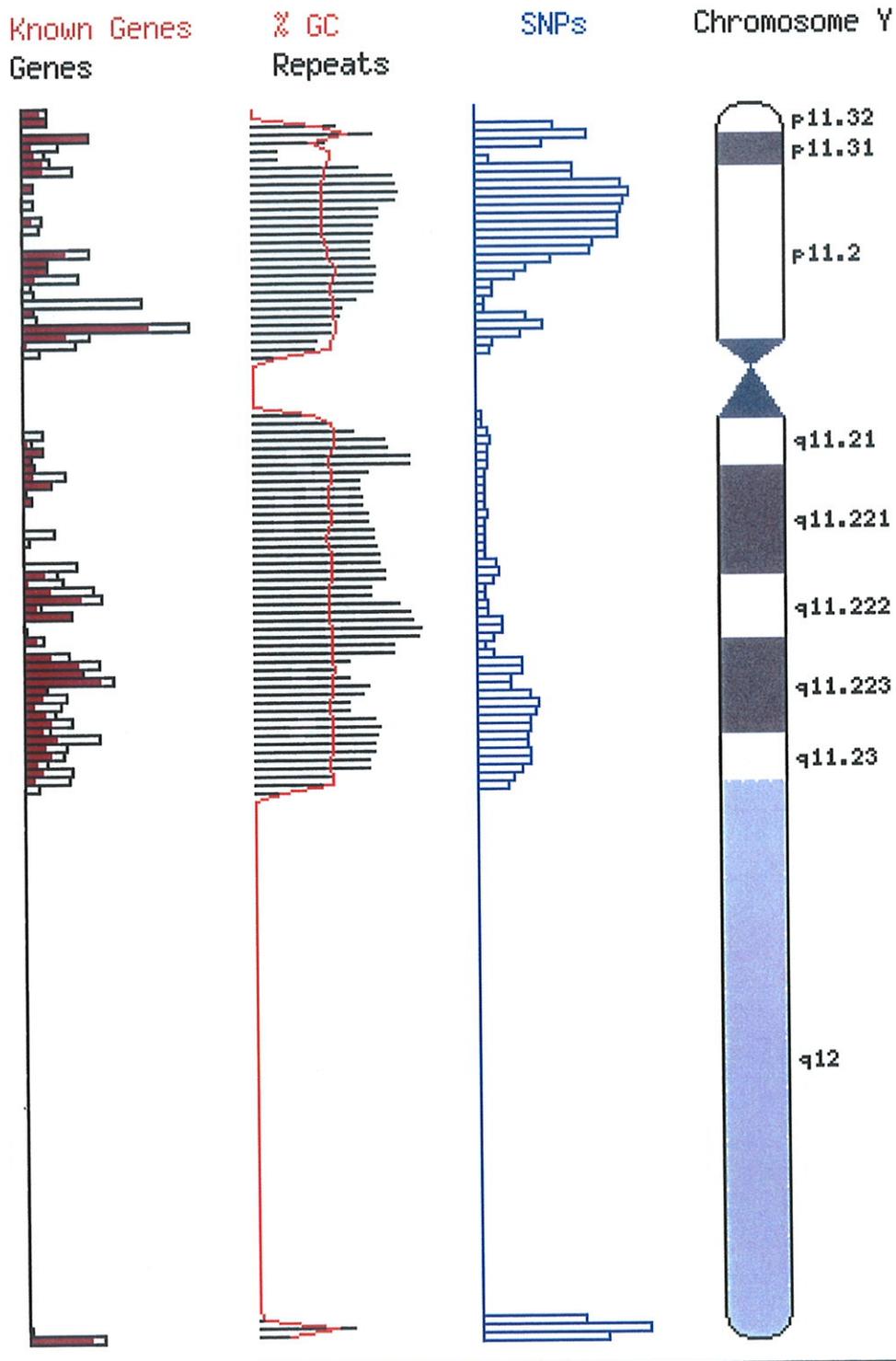


Figure n°8 : le chromosome Y : carte physique actualisée 2004 (site Ensembl www.ensembl.org)

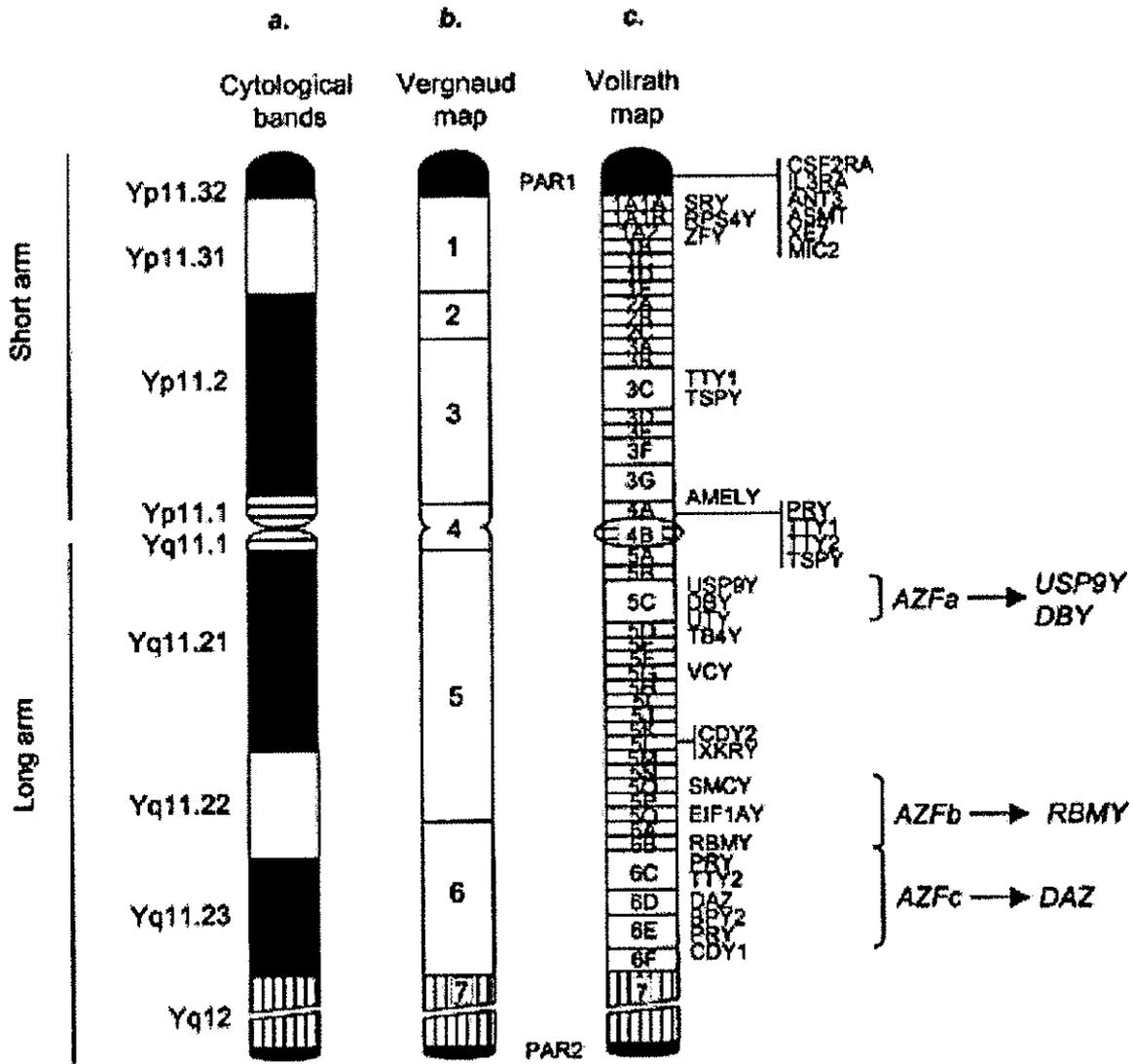


Figure n°9 : cartographies du chromosome Y [2]

Figure n°10 : les gènes du chromosome Y humain (document GDB : www.gdb.org)

Symbol	Aliases	AccessionID	Cytogenetic Location
<i>ACTGP2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ACTL2</i> • actin, gamma pseudogene 2 	GDB:120537	Yq11-Yq11*
<i>ADPRTLIP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ADP-ribosyltransferase (NAD⁺; poly (ADP-ribose) polymerase)-like 1 Y-linked pseudogene 	GDB:11505603	Y-Y
<i>ALTE</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ac-like transposable element • <i>TRAMP</i> • KIAA0785 • Hs.9933 	GDB:9958980	Xp22.33- Xp22.33 Yp11-Yp11
<i>AMELY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hs.1238 • <i>AMGL</i> • amelogenin (Y chromosome) 	GDB:119676	Yp11.2- Yp11.2*
<i>APXLP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • apical protein-like (<i>Xenopus laevis</i>) pseudogene 	GDB:9954905	Yq11-Yq11
<i>ARSDP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • arylsulfatase D pseudogene 	GDB:9954909	Yq11.21- Yq11.21
<i>ARSEP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • arylsulfatase E pseudogene 	GDB:9954907	Yq11.21- Yq11.21
<i>ASMT</i>	<ul style="list-style-type: none"> • acetylserotonin O-methyltransferase • <i>HIOMT</i> 	GDB:136259	Xp22.3- Xp22.3* Yp11.3- Yp11.3*
<i>ASMTL</i>	<ul style="list-style-type: none"> • acetylserotonin O-methyltransferase-like • Hs.6315 • Weakly similar to hydroxyindole-O-methyltransferase [H.sapiens] 	GDB:9956043	Xp22.3- Xp22.3 Yp11.3- Yp11.3
<i>ASSP6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • argininosuccinate synthetase pseudogene 6 	GDB:119020	Ypter-Yqter*

<i>AZF1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • AZF • azoospermia factor 1 	GDB:119027	Yq11-Yq11*
<i>AZF2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • azoospermia factor 2 	GDB:456131	Ycen-Yqter
<i>CASKP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family) pseudogene 	GDB:9954903	Yq11-Yq11
<i>CD24L4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • CD24 antigen-like 4 	GDB:383841	Yq11-Yq11
<i>CDY1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromodomain protein, Y chromosome, 1 • <i>CDY</i> 	GDB:9954846	Yq11.22-Yq11.22
<i>CDY2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromodomain protein, Y chromosome, 2 	GDB:9956669	Yq11.22-Yq11.22
<i>CRLF2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • cytokine receptor-like factor 2 • <i>CRL2</i> 	GDB:11499114	Xp22.3-Xp22.3 Yp11.3-Yp11.3
<i>CSF2RA</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CSF2R</i> • colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity, (granulocyte-macrophage) 	GDB:118777	Xp22.32-Xp22.32* Yp11.3-Yp11.3*
<i>CSPG4LY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chondroitin sulfate proteoglycan 4-like, Y-linked 	GDB:11505842	Y-Y
<i>CYorf1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromosome Y open reading frame 1 • 71-7A2 	GDB:9865780	Yq11.22-Yq11.22
<i>CYorf14</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromosome Y open reading frame 14 • PRO2834 	GDB:11510702	Y-Y
<i>CYorf15A</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromosome Y open reading frame 15A 	GDB:11510704	Y-Y
<i>CYorf15B</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromosome Y open reading frame 15B • LOC84663 	GDB:11510706	Yq11.22-Yq11.22
<i>CYorf16</i>	<ul style="list-style-type: none"> • chromosome Y open reading frame 16 	GDB:11510708	Y-Y

<i>DAZ</i>	<ul style="list-style-type: none"> deleted in azoospermia Hs.70936 <i>SPGY</i> 	GDB:635890	Yq12-Yq12* Yq11-Yq11
<i>DAZ2</i>	<ul style="list-style-type: none"> deleted in azoospermia 2 	GDB:11501009	Yq11.21- Yq11.21
<i>DAZ3</i>	<ul style="list-style-type: none"> deleted in azoospermia 3 	GDB:11501011	Yq11-Yq11
<i>DAZ4</i>	<ul style="list-style-type: none"> deleted in azoospermia 4 	GDB:11501013	Yq11-Yq11
<i>DBY</i>	<ul style="list-style-type: none"> DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide, Y chromosome <i>DDX3Y</i> Hs.99120 	GDB:9956138	Yq-Yq
<i>DXYS155E</i>	<ul style="list-style-type: none"> DNA segment on chromosome X and Y (unique) 155 expressed sequence <i>XE7</i> <i>XE7Y</i> Hs.21595 	GDB:9964054	Xp22.32- Xp22.32 Yp11.3- Yp11.3
<i>EIF1AY</i>	<ul style="list-style-type: none"> eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosome 	GDB:9954847	Ypter-Yqter Yq11.22- Yq11.22
<i>FAM8A4P</i>	<ul style="list-style-type: none"> family with sequence similarity 8, member A4 pseudogene 	GDB:11503326	Ypter-Yqter
<i>GCY</i>	<ul style="list-style-type: none"> growth control, Y chromosome influenced <i>STA</i> <i>TSY</i> 	GDB:119267	Yq11-Yq11*
<i>GOLGA2LY</i>	<ul style="list-style-type: none"> golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2-like, Y-linked 	GDB:11506083	Y-Y
<i>HSFY</i>	<ul style="list-style-type: none"> heat shock transcription factor, Y-linked <i>HSF2L</i> 	GDB:11506147	Y-Y

<i>IL3RA</i>	<ul style="list-style-type: none"> interleukin 3 receptor, alpha (low affinity) Hs.1726 	GDB:128985	Xp22.3- Xp22.3* Yp11.3- Yp11.3*
<i>IL9R</i>	<ul style="list-style-type: none"> Hs.1702 interleukin 9 receptor 	GDB:134444	Xq28-Xq28* Yq12-Yq12
<i>KALP</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>KAL-Y</i> <i>ADMLY</i> Kallmann syndrome sequence pseudogene 	GDB:128310	Yq11-Yq11* Yq11.2- Yq11.2
<i>MIC2</i>	<ul style="list-style-type: none"> Hs.75467 antigen identified by monoclonal antibodies 12E7, F21 and O13 	GDB:120184	Xp22.32- Xp22.32* Yp11.3- Yp11.3*
<i>NLGN4Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> neuroligin 4, Y linked 	GDB:11506338	Y-Y
<i>OA1P</i>	<ul style="list-style-type: none"> ocular albinism 1 (Nettleship-Falls) Y-linked pseudogene 	GDB:11506359	Y-Y
<i>PABY</i>	<ul style="list-style-type: none"> pseudoautosomal boundary region, Y-linked 	GDB:120259	Yp11.3- Yp11.3*
<i>PCDH11Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>PCDH22</i> protocadherin 11 Y-linked protocadherin 22 <i>PCDHY</i> 	GDB:11504539	Yp11.2- Yp11.2
<i>PPP1R12BP</i>	<ul style="list-style-type: none"> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B Y-linked pseudogene 	GDB:11507462	Y-Y
<i>PPP2R3B</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>PPP2R3L</i> protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", beta <i>PPP2R3LY</i> 	GDB:11507504	Xp22.3- Xp22.3 Yp11.3- Yp11.3
<i>PRKY</i>	<ul style="list-style-type: none"> protein kinase, Y-linked Hs.56336 	GDB:631715	Yp11.2- Yp11.2*

<i>PRY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PTPN13</i>-like, Y-linked • <i>PTPN13LY</i> 	GDB:9954842	Yq11.22- Yq11.22
<i>RBM1A1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RBM1</i> • <i>RBM2</i> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1 member A1 • RNA binding motif protein 1 • RNA binding motif protein 2 • Hs.2958 • H.sapiens mRNA for YRRM1 • <i>YRRM2</i> • <i>YRRM1</i> 	GDB:285393	Yq11.23- Yq11.23*
<i>RBM1A2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A2 	GDB:9848784	Yq11.23- Yq11.23
<i>RBM1A3P</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A3 pseudogene 	GDB:11510200	Y-Y
<i>RBM1C</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member C 	GDB:9848787	Yq11.23- Yq11.23
<i>RBM1G</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member G 	GDB:9848789	Yq11.23- Yq11.23
<i>RBM1H</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member H 	GDB:9848791	Yq11.23- Yq11.23
<i>RBM2A</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 2, member A 	GDB:9848793	Yq11.23- Yq11.23
<i>RBM2B</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA binding motif protein, Y chromosome, family 2, member B 	GDB:9848795	Yq11.23- Yq11.23
<i>RPS24P1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RPS24P</i> • ribosomal protein S24 pseudogene 1 • ribosomal protein S24 pseudogene 	GDB:10795337	Yp11-Yp11

<i>RPS4Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hs.90653 • ribosomal protein S4, Y-linked 	GDB:128052	Yp11.3- Yp11.3*
<i>RPS4Y2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ribosomal protein S4, Y-linked 2 	GDB:11507771	Y-Y
<i>RVNP2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • retroviral sequences NP2 	GDB:119582	Ypter-Yqter*
<i>SEDLP3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spondyloepiphyseal dysplasia, late, pseudogene 3 	GDB:10013962	Yq11.23- Yq11.23
<i>SEDLP4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spondyloepiphyseal dysplasia, late, pseudogene 4 	GDB:10013963	Yq11.23- Yq11.23
<i>SEDLP5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spondyloepiphyseal dysplasia, late, pseudogene 5 	GDB:10013964	Yq11.23- Yq11.23
<i>SEDLP6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spondyloepiphyseal dysplasia, late, pseudogene 6 	GDB:10013965	Yq11.23- Yq11.23
<i>SEDLP7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spondyloepiphyseal dysplasia, late, pseudogene 7 	GDB:10013966	Yq11.23- Yq11.23
<i>SLC25A15P</i>	<ul style="list-style-type: none"> • solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15 Y-linked pseudogene 	GDB:11507833	Y-Y
<i>SLC25A6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ANT3</i> • solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 • Hs.74550 • adenine nucleotide translocator 3 (liver) • <i>ANT3Y</i> 	GDB:125184	Xp22.32- Xp22.32* Yp11.3- Yp11.3*

<i>SMCY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>HY</i> • Smcy homolog, Y chromosome (mouse) • SMC (mouse) homolog, Y chromosome • histocompatibility Y antigen • selected mouse cDNA on the Y • <i>HYA</i> • <i>KIAA0234</i> 	GDB:5875390	Ycen-Yq11.23*
<i>SPRY3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • sprouty homolog 3 (Drosophila) • <i>hSPRY3</i> • sprouty (Drosophila) homolog 3 	GDB:9835923	Xq-Xq Yq-Yq
<i>SRY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • sex determining region Y • <i>TDF</i> • Hs.1992 • testis determining factor 	GDB:125556	Yp11.3-Yp11.3*
<i>STSP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • steroid sulfatase (microsomal) pseudogene 	GDB:119605	Yq11-Yq11*
<i>TBL1Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> • transducin (beta)-like 1Y-linked • <i>TBL1</i> 	GDB:11508487	Yp11.2-Yp11.2
<i>TGIF2LX</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TGFB-induced factor 2-like, X-linked</i> 	GDB:11508016	Y-Y
<i>TGIF2LY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TGFB-induced factor 2-like, Y-linked</i> 	GDB:11508018	Y-Y
<i>TMSB4Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TB4Y</i> • thymosin, beta 4, Y chromosome 	GDB:9954848	Y-Y
<i>TSPY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hs.89644 • testis specific protein, Y-linked • Hs.2051 	GDB:120471	Yp-Yp* Ypter-Yp11.2

<i>TTY1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 1 • <i>TTY1</i> 	GDB:11508086	Y-Y
<i>TTY10</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 10 	GDB:11508088	Y-Y
<i>TTY11</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 11 • <i>TTY11</i> 	GDB:11508090	Y-Y
<i>TTY12</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 12 • <i>TTY12</i> 	GDB:11508092	Y-Y
<i>TTY13</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 13 • <i>TTY13</i> 	GDB:11508094	Y-Y
<i>TTY14</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 14 • <i>TTY14</i> 	GDB:11508096	Y-Y
<i>TTY15</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 15 • <i>DKFZP434I143</i> 	GDB:11508098	Y-Y
<i>TTY16</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 16 	GDB:11510269	Y-Y
<i>TTY17</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 17 	GDB:11510271	Y-Y
<i>TTY18</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 18 	GDB:11510273	Y-Y
<i>TTY19</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 19 	GDB:11510275	Y-Y
<i>TTY2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 2 • <i>TTY2</i> 	GDB:11508100	Y-Y
<i>TTY20</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 20 	GDB:11510277	Y-Y
<i>TTY21</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 21 	GDB:11510279	Y-Y
<i>TTY22</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 22 	GDB:11510281	Y-Y
<i>TTY23</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 23 	GDB:11510283	Y-Y
<i>TTY3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 3 • <i>TTY3</i> 	GDB:11508102	Y-Y

<i>TTTTY4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 4 • <i>TTY4</i> 	GDB:11508104	Y-Y
<i>TTTTY5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 5 • <i>TTY5</i> 	GDB:11508106	Y-Y
<i>TTTTY6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 6 • <i>TTY6</i> 	GDB:11508108	Y-Y
<i>TTTTY7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 7 	GDB:11508110	Y-Y
<i>TTTTY8</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 8 • <i>TTY8</i> 	GDB:11508112	Y-Y
<i>TTTTY9</i>	<ul style="list-style-type: none"> • testis-specific transcript, Y-linked 9 • <i>TTY9</i> 	GDB:11508114	Y-Y
<i>USP9Y</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitin specific protease 9, Y chromosome (fat facets-like Drosophila) • ubiquitin specific protease 9, Y chromosome (Drosophila fat facets related) • <i>DFFRY</i> • Drosophila fat facets related Y 	GDB:9839319	Yq11.2-Yq11.2
<i>UTY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome 	GDB:9864459	Ypter-Yqter
<i>VCY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • variable charge, Y chromosome • variably charged, Y chromosome • <i>BPY1</i> 	GDB:9954845	Yq11-Yq11 Ypter-Yqter
<i>VCY2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • variable charge, Y chromosome, 2 • <i>BPY2</i> 	GDB:10797002	Yq11-Yq11
<i>XGPY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Xg pseudogene (Y-linked) 	GDB:636807	Yq11.21-Yq11.21*
<i>XGR</i>	<ul style="list-style-type: none"> • expression of XG and MIC2 on 	GDB:120533	Xp22.32-Xp22.32*

	erythrocytes • <i>YG</i>		Yp11.3- Yp11.3*
<i>XKRY</i>	• X Kell blood group precursor-related, Y-linked	GDB:9954843	Yq11.22- Yq11.22
<i>ZFY</i>	• zinc finger protein, Y-linked	GDB:120503	Yp11.3- Yp11.3*
<i>ZNF381P</i>	• zinc finger protein 381, Y-linked pseudogene	GDB:11508227	Y-Y

A l'heure actuelle, ont été identifiés 160 unités transcriptionnelles dont 81 gènes codant pour une protéine et 5 pseudogènes. Dans la région MSY (Male Specific Region), 27 protéines ou familles de protéines ont été identifiées parmi lesquelles 11 sont exprimées exclusivement dans les testicules. L'organisation du chromosome Y comprend notamment huit palindromes de grandes tailles dont six comportent des gènes essentiels à la spermatogenèse.

A) Les régions d'homologie

On recense deux régions d'homologie « vraie » entre les chromosomes X et Y au niveau desquelles les deux chromosomes s'apparient au cours de la méiose : les régions PAR (Pseudo Autosomal Region). Il existe également d'autres régions d'homologie non identiques qui ne sont pas impliquées dans le mécanisme appariement-recombinaison.

1) PAR1

PAR1 (Région pseudoautosomale 1) se trouve à l'extrémité télomérique du bras court du chromosome Y (figure n°9). C'est une région de 2,6 Mb identique à la région située à l'extrémité du bras court sur le chromosome X (Xp22) avec laquelle elle s'apparie au cours de la méiose. Toute mutation de cette région empêche cet appariement et entraîne un blocage de la prophase méiotique et donc une azoospermie.

Plusieurs gènes ont été identifiés au niveau de PAR1 :

MIC2 (M : Monoclonal IC : Imperial Cancer research fund 2 : order of discover) codant pour une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion des lymphocytes T.

CSF2RA (Colony Stimulating Factor 2 Receptor Alpha Subunit) codant pour le récepteur du GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor).

IL3RA (Interleukin 3 Receptor Alpha Subunit) codant pour la sous-unité α du récepteur de l'interleukine 3.

ANT3 (Adenine Nucleotide Translocase 3) codant pour la translocase ATP/ADP nécessaire au métabolisme énergétique

ASMT (Acetyl Serotonin Methyl Transferase) impliquée dans la dernière phase de la synthèse de la mélanotone.

ASMTL (ASMT Like) coderait pour une protéine de fusion partageant une homologie avec l'extrémité C-terminale de la protéine ASMT.

SHOX (Short stature HOmeoboX-containing gene) codant pour une protéine nécessaire en double dose pour une stature normale. Il serait impliqué dans le syndrome de Turner.

PGPL (Pseudoautosomal GTP binding Protein Like) codant pour une protéine de fonction inconnue mais possédant un motif GTP-binding.

TRAMP code pour une protéine présentant une homologie avec les transposases de la famille Ac.

2) PAR2

PAR2 (région pseudoautosomale 2) est située à l'extrémité télomérique du bras long du chromosome Y (figure n°9). La fréquence du phénomène appariement-recombinaison avec son homologue sur le X durant la méiose est moins importante que pour PAR1. PAR2 n'est pas nécessaire à la fertilité [3, 4]. Cette région couvre 320 Kb et peut être découpée en deux zones en fonction de sa composition en désoxyribonucléotides GC et de certains éléments répétitifs [5]. Plusieurs gènes y ont été identifiés :

→ Région 1 : le GC % est de 34,5% (un des plus pauvres de l'ADN humain) et les séquences répétitives Alu et LINE représentent 67% de la séquence nucléotidique. On y trouve *SYBL1* (SynaptoBrevin-Like 1 gene) et *HSPRY3* (Human SPRouty Y 3), gènes inactifs sur le chromosome Y et inactivés sur le X.

→ Région 2 : le GC% dépasse les 51% et les séquences répétitives ne représentent plus que 29% de la zone. Y sont localisés *IL9R* (Interleukin 9 Receptor), codant pour le récepteur de l'interleukine 9 et *CXYorf1* (cf. tableau page 35) tous deux exprimés sur le chromosome Y et non inactivés sur le X.

Les quatre gènes présents sur PAR2 sont retrouvés sur le chromosome X mais pas sur le Y des primates et des souris : ils ont été transposés sur le Y humain pendant les derniers millions d'années d'évolution peut être via une séquence LINE lors d'une recombinaison illégitime du X avec le Y [3]. L'apparition de ces quatre gènes s'est fait de façon indépendante pendant l'évolution des euthériens et est due à au moins trois évènements distincts [6].

Pendant la méiose, les extrémités de chromosomes qui ne recombinent pas avec un homologue risquent de s'apparier avec une région non homologue et de « subir » un certain nombre de translocations. Cette théorie expliquerait les multiples transferts et inversions à l'origine de la formation de PAR2 pendant l'évolution du chromosome Y.

3) Autres régions d'homologie X-Y sans appariement

Plusieurs autres régions, présentant une homologie importante avec leur correspondant sur le chromosome X, sont réparties le long de la région non recombinante du Y. Deux d'entre elles ont été décrites. Il s'agit d'une région située en Yp juste sous PAR1 (98% d'homologie avec Xq12-13) et de Yq11.2 (homologue de Xp22.3). La présence de ces régions de forte homologie serait due à des évènements de transposition du chromosome X vers le Y au cours de l'évolution.

Entre PAR1 et le centromère, quatre gènes ont été identifiés. Il s'agit de :

- *AMELY* (amelogenin Y) codant pour un constituant protéique de l'émail, situé entre 3G et 4A.

- *PRKY* (Y homologue of the Protein Kinase gene) codant pour une protéine kinase sérine/thréonine AMPc dépendante.

- *ZFY* (Zinc Finger Y) situé en 1A2 et codant pour un facteur de transcription nucléaire caractérisé par un domaine à 13 motifs en doigt de gant.

- *RPS4Y* (Ribosomal Protein S4 Y isoform) codant pour une isoforme Y d'une protéine ribosomique S4 de la petite sous-unité ribosomique. Il serait également impliqué dans le syndrome de Turner.

Ces quatre gènes ont un homologue sur le chromosome X.

Au niveau de Yq11.2 (bras long), on retrouve :

STSP, *ARSD-Y*, *ARSE-Y* et *KALP* pseudogènes non fonctionnels homologues de *STS*, *ARSD-X* et *ARSE-X* appartenant à la famille des gènes de la stéroïde sulfatase.

L'homologue de *KALP* est impliqué dans le syndrome de Kallman (hypogonadisme hypogonadotrope par déficit en GnRH associé à une hypo/anosmie).

UTY (Ubiquitous TPR motif Y) codant pour un antigène H-Y d'expression ubiquitaire.

SMCY (Selected Mouse cDNA on Y chromosome) codant pour une protéine de 1539 acides aminés dont peuvent dériver plusieurs épitopes antigéniques H-Y [7] [8].

TB4Y (Thymosin β 4 Y isoform) codant pour une isoforme de la thymosine β 4, d'expression ubiquitaire, qui permet la séquestration de l'actine.

EIF1AY (Translation Initiation Factor 1A Y isoform) codant pour une isoforme de eIF-1A facteur essentiel d'initiation de la traduction.

DBY (Dead Box Y) codant pour une protéine à motif dead box (fonction ARN hélicase ?) d'expression ubiquitaire.

DFFRY (Drosophila Fat Facet Related Y) ou USP9Y.

Quelques-uns de ces gènes se situent dans des régions dites AZF dont nous reparlerons plus loin.

B) La région non recombinante NRY : Male Specific region MSY

La région non recombinante du chromosome Y a été rebaptisée MSY (Male Specific region) car cette région ne s'échange pas avec le chromosome X et est donc spécifique de la lignée masculine.

Elle contient trois types de séquences (figure n°11) :

- Des séquences transposées du chromosome X : elles sont identiques à 99% à la région d'origine sur le X et proviennent de la transposition massive d'un segment du chromosome X il y a 3 à 4 millions d'années (après la divergence entre l'homme et le chimpanzé). Elles représentent 10 à 15% de MSY et sont citées plus haut.

- Des séquences dégénérées de l'X : l'origine commune est beaucoup plus ancienne et l'identité de séquence varie entre 60 et 96%. On y trouve des gènes (14) et des pseudogènes (13) tous d'expression ubiquitaire à l'exception de SRY qui a une expression testiculaire prédominante. Ces séquences occupent environ 20% de MSY.
- Des séquences palindromiques (figure n°12) : on retrouve huit palindromes dispersés dans la région MSY dont ils occupent environ 30%. Six d'entre eux contiennent des gènes dont l'expression est spécifiquement testiculaire. A l'intérieur de ces structures, des recombinaisons pourraient se produire entre les bras.

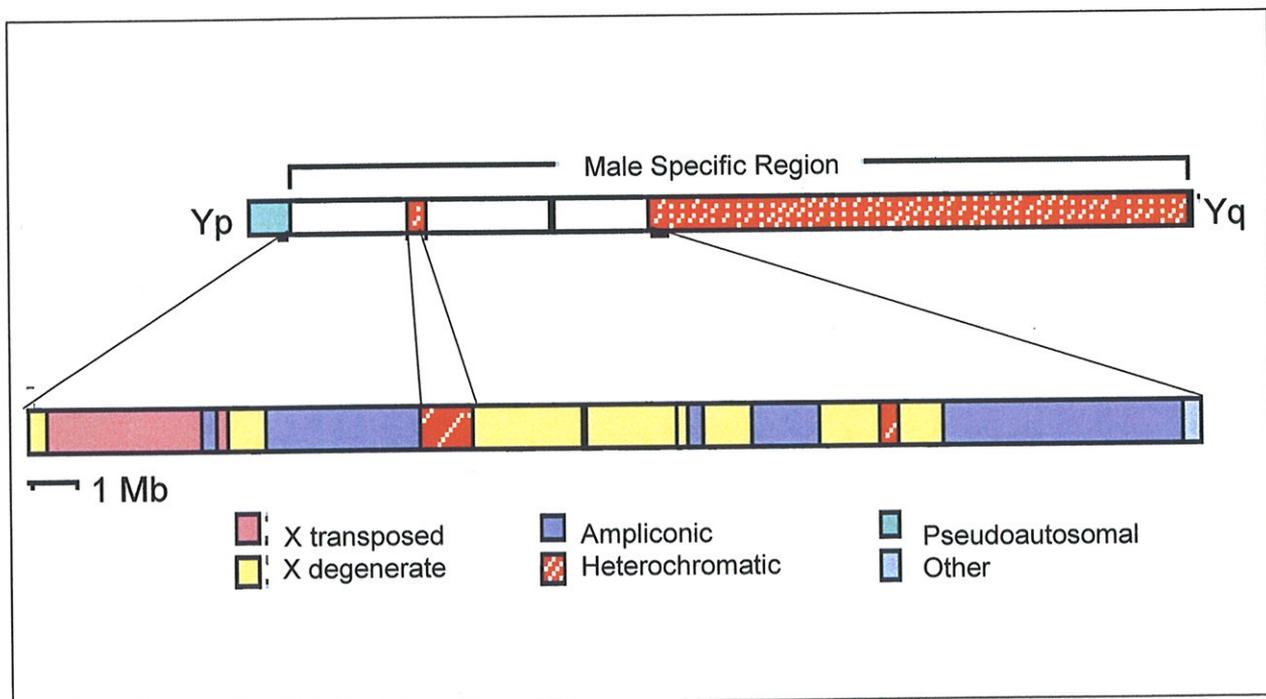
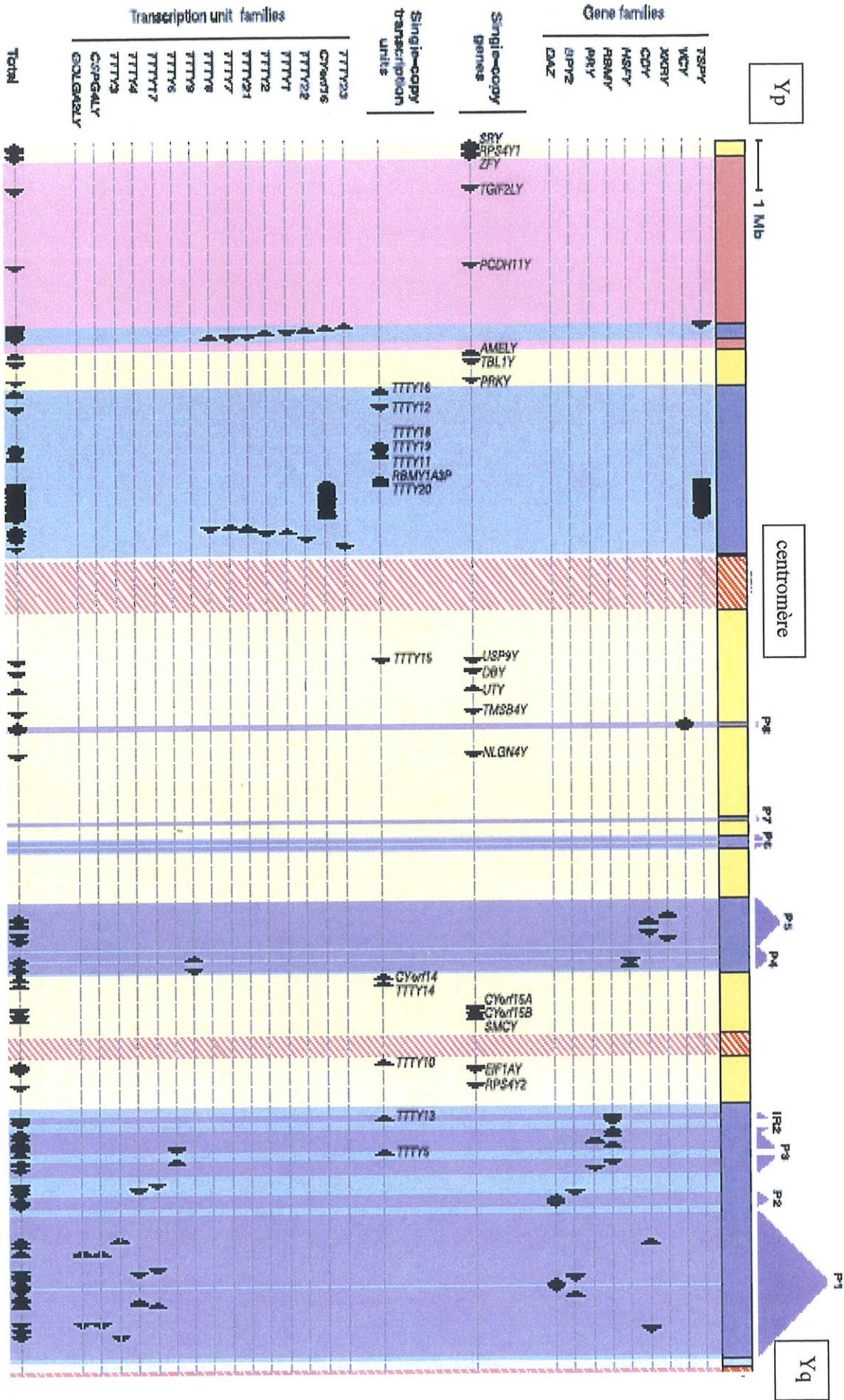


Figure n°11 : représentation schématique du chromosome Y et de la région MSY d'après Skaletsky et al. [9]

Figure n°12 : La région MSY d'après Staletsky et al. [9]



Type de séquence	Acronyme	Gène	Nombre de copies	Expression tissulaire	Homologue sur le X	Homologue autosomal
Transposée à partir du chromosome X	TGF2LY	TGFβinduced transcription factor 2 like Y	1	Testicule	TGF2LX	
	PCDH11Y	Protocadherin 11 Y	1	Cerveau	PCDH11X	
Séquence dégénérée du chromosome X	SRY	Sex Determining Region Y	1	Testicule principalement	SOX3	
	RPS4Y1	Ribosomal Protein S4 Y isoform 1	1	Ubiquiste	RPS4X	
	ZFY	Zinc Finger Y	1	Ubiquiste	ZFX	
	AMELY	Amelogenin Y	1	Dent	AMELX	
	TBL1Y	Transducinβ-like1protein Y	1	Cerveau foetal, prostate	TBL1X	
	PRKY	Protein Kinase Y	1	Ubiquiste	PRKX	
	USP9Y	Ubiquitin-Specific Protease 9 Y	1	Ubiquiste	USP9X	
	DBY	Dead Box Y	1	Ubiquiste	DBX	
	UTY	Ubiquitous TPR motif Y	1	Ubiquiste	UTX	
	TMSB4Y	Thymosinβ4Y	1	Ubiquiste	TMSB4X	
	NLGN4Y	Neurologin 4 isoform Y	1	Ubiquiste	NLGN4X	
	CYorf15A	Chromosom Y open reading frame 15A	1	Ubiquiste	CXorf15A	
	CYorf15B	Idem 15B	1	Ubiquiste	CXorf15B	
	SMCY	SMC(mouse) homologue Y	1	Ubiquiste	SMCX	
	EIF1AY	Translation initiation factor 1A Y	1	Ubiquiste	EIF1AX	
	RPS4Y2	Ribosomal Protein S4 isoform 2	1	Ubiquiste	RPS4X	

Type de séquence	Acronyme	Gène	Nombre de copies	Expression tissulaire	Homologue sur le X	Homologue autosomal
Séquences palindromiques	TSPY	Testis Specific Protein Y	35	Testicule		
	VCY	Variable Charge Y	2	Testicule	VCX	
	XKRY	XK Related Y	2	Testicule		
	CDY	Chromodomain Y	4	Testicule		CDYL
	HSFY	Heat Shock transcription Factor Y	2	Testicule		
	RBY	RNA-Binding Motif Y	6	Testicule	RBMX	
	PRY	PTP-BL Related Y	2	Testicule		
	BPY2	Basic Protein Y2	3	Testicule		
	DAZ	Deleted in AZoospermia	4	Testicule		DAZL

Figure n°13 : Les différents gènes et familles de gènes retrouvés au niveau de MSY d'après Skaletsky et al . [9]

1/ La région non recombinante sur le bras court

Au niveau du bras court, la frontière entre PAR1 et la partie non recombinante est composée de séquences répétées de type Alu (présentes jusqu'à un million de copies) et de séquences GC ainsi que d'un gène incomplet *PBDX* impliqué dans le système de groupe sanguin Xg.

Juste sous cette frontière se trouve la petite région d'homologie diminuée entre X et Y.

Un certain nombre de gènes est présent au niveau de la région non recombinante sur le bras court :

- *SRY* (Sex determining Region of Y chromosome) qui est le « facteur de détermination de la gonade primitive dans le sens mâle ».
- *TSPY* (Testis Specific Protein Y-encoded) gène répété (20 à 40 copies) codant pour une protéine apparemment homologue à celle de l'oncogène SET. Elle permettrait l'entrée en méiose des spermatogonies et serait impliquée dans l'apparition de tumeurs testiculaires et de gonadoblastome [10, 11]
- *PRY* (PTP-BL Related Y) présent également sur le bras long.
- *TTY1* et *TTY2* (Testis Transcript 1 / 2) transcrits sans cadre de lecture identifié. Ils sont également présents sur le bras long.
- *GBY* (GonadoBlastoma locus on the chromosome Y) est situé en 4A. Il prédisposerait aux dysgénésies gonadiques et aux gonadoblastomes.

2/ Le centromère

Le centromère du chromosome Y est constitué d'une centaine de copies d'une séquence alphasatellite caractéristique de 5,5 Kb. Bien que l'on retrouve une homologie d'environ 70% avec les séquences alphasatellites du X et des autosomes, les séquences Alu du chromosome Y sont suffisamment spécifiques pour être reconnues comme telles au contraire des séquences répétées LINE. Il semblerait que les séquences Alu du chromosome Y aient évolué de la même façon que les séquences spécifiques « mâles ». De plus, Kuroda-Kawaguchi suggérerait l'implication de ces séquences

dans des phénomènes de duplication et d'inversion au niveau du palindrome P1 du bras long [12].

3/ La région non recombinante au niveau du bras long

Au niveau du bras long, entre le centromère et la grande région d'hétérochromatine, se trouve une région d'euchromatine d'environ 20 Mb dans laquelle ont été identifiés la plupart des gènes responsables des fonctions du chromosome Y. Elle est constituée de séquences uniques ou faiblement répétées et contient des gènes Y-spécifiques ainsi que des gènes homologues X/Y ou Y/autosomes. C'est au niveau de cette région qu'ont été identifiées les trois régions AZF (Azoospermic Factor).

3.1) Les régions AZF

α) AZFa

AZFa (figure n°14) est localisée en Yq11 entre les sous-intervalles D3 et D6 ce qui correspond à 5B et 5C et comporte environ 1100 kbp. Elle est totalement indépendante territorialement des deux autres régions AZF.

Elle contient quatre gènes principaux : *USP9Y* (Ubiquitin-Specific Protease 9 Y) anciennement *DFFRY* (Drosophil Fat Facet related Y), *DBY* (Dead Box Y), *UTY* (Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat gene Y) et *TB4Y* (Thymosin B4 isoform Y). [13]

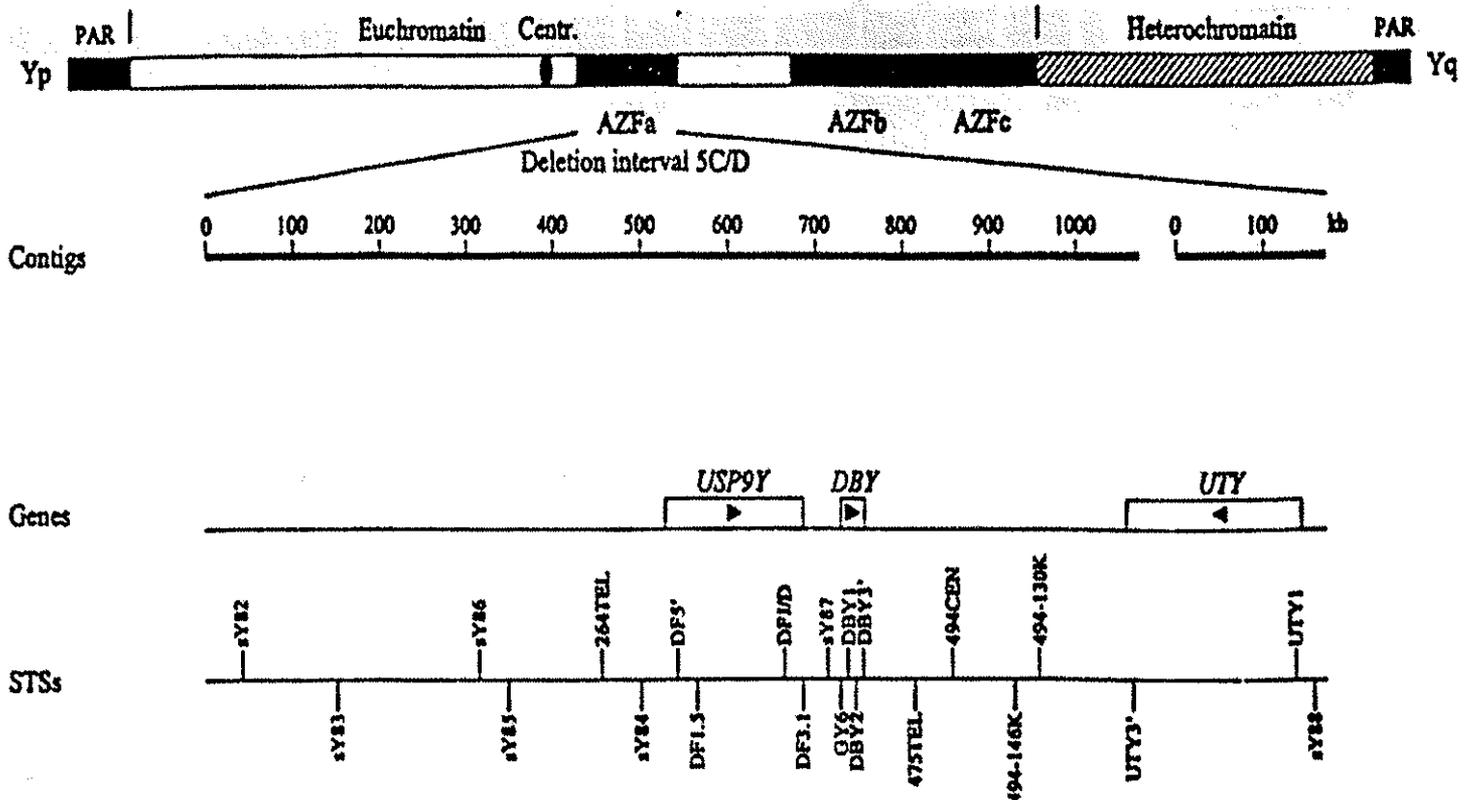


Figure n°14 : carte physique de la région AZFa d'après C.Foresta [14]

Elle se différencie des deux autres régions AZF par son caractère non répétitif.

USP9Y est un gène simple copie de 159 Kb comprenant 46 exons codant pour une hydrolase ubiquitine C-terminale d'expression ubiquitaire. [13]. Il partage 91 % d'homologie au niveau protéique avec son homologue sur le chromosome X *USP9X* (Xq11.4). *USP9Y* code pour une protéine très grande (plus de 2500 résidus). D'après l'étude de Vogt et al. [7] on y retrouve un motif IVDCLTEMY ayant une activité antigénique. Ce motif diffère d'un acide aminé par rapport à la protéine codée par *USP9X* (une cystéine en position 4 au lieu d'une sérine). Cette différence entraînerait des risques de rejets de greffes de moelle entre donneur masculin et receveur féminin.

DBY est un petit gène de 15,5 Kb comprenant 17 exons codants [15]. Il existe deux transcrits différents pour *DBY* : *DBY1* petit transcrit spécifique des testicules et *DBY2* grand transcrit ubiquitaire. La différence de longueur entre les deux transcrits se retrouve au niveau de l'extrémité 3'. *DBY* a un homologue sur le chromosome X (*DBX*) en Xp11.3 qui échappe à l'inactivation du X. *DBY* code pour des protéines *DDXY* appartenant à la famille des DEAD Box protéines (motif asparagine-glutamine-alanine-asparagine en commun) ARN-hélicases ATP dépendantes. [13]

UTY possède un homologue sur le chromosome X avec lequel il partage 86 % d'homologie au niveau protéique. Il existe trois isoformes différentes obtenues par épissage différentiel de l'ARN messager. Leur partie N-terminale est commune et contient un épitope du système antigénique HY impliqué dans les rejets de greffe de moelle avec donneur masculin et receveur féminin. D'après Vogt et al. [16] l'antigène HY dérivé de *UTY* serait un motif de dix acides aminés RESEEEESVSL et serait présenté par le système HLA-B60. Ce motif diffère de trois acides aminés par rapport à son homologue issu du X. D'après Warren et al. [17] cette activité antigénique serait portée par un octapeptide LPHNHTDL présenté par le système HLA-B8. *UTY* est largement exprimé dans l'organisme mais le niveau d'expression dépendrait du tissu concerné. L'étude de Lahn et co. rapporte que *UTY* est transcrit dans les globules blancs du sang périphérique et la rate, le thymus, la prostate, les testicules et le gros intestin [18]. Cependant l'expression d'*UTY* dans ces organes pourrait être due en partie à l'infiltration par des cellules hématopoïétiques.

AZFaT1 est un gène potentiel situé à proximité de *USP9Y*. Il semblerait qu'il soit spécifique de la lignée mâle. Un épissage alternatif entraîne la production de plusieurs transcrits différents, le plus grand contenant un exon de plus. Ce gène s'exprime notamment dans le cerveau, le muscle squelettique et les testicules [19].

β) AZFb

AZFb (figure n°15) est une région de 4,3 Mb localisée en Yq11 entre les sous-intervalles 5M et 6B . Elle contient des séquences répétées en palindromes ainsi que des séquences uniques [20]. On retrouve au niveau d'AZFb 23 gènes théoriquement fonctionnels parmi lesquels 13 sont spécifiques d'AZFb (*CYorf14*, *CYorf15A/B*, *EIF1AY*, *HSFY*, *PRY*, *RBM1*, *SMCY*, *TTY5*, *TTY6*, *TTY9*, *TTY10*, *TTY13* et *TTY14*), 3 ont des copies à proximité d'AZFb (*CDY2*, *RPS4Y2*, *XKRY*) et 7 sont des copies de gènes situés sur AZFc (*BPY2.1*, *CDY1.1*, *DAZ1*, *DAZ2*, *TTY3.1*, *TTY4.1*, *TTY17.1*). Nous décrivons ici plus précisément *RBM1*, *HSFY*, *PRY* et *EIF1AY*. AZFb et AZFc ne sont pas indépendantes l'une de l'autre : elles sont contiguës et présentent des zones de chevauchement [21].

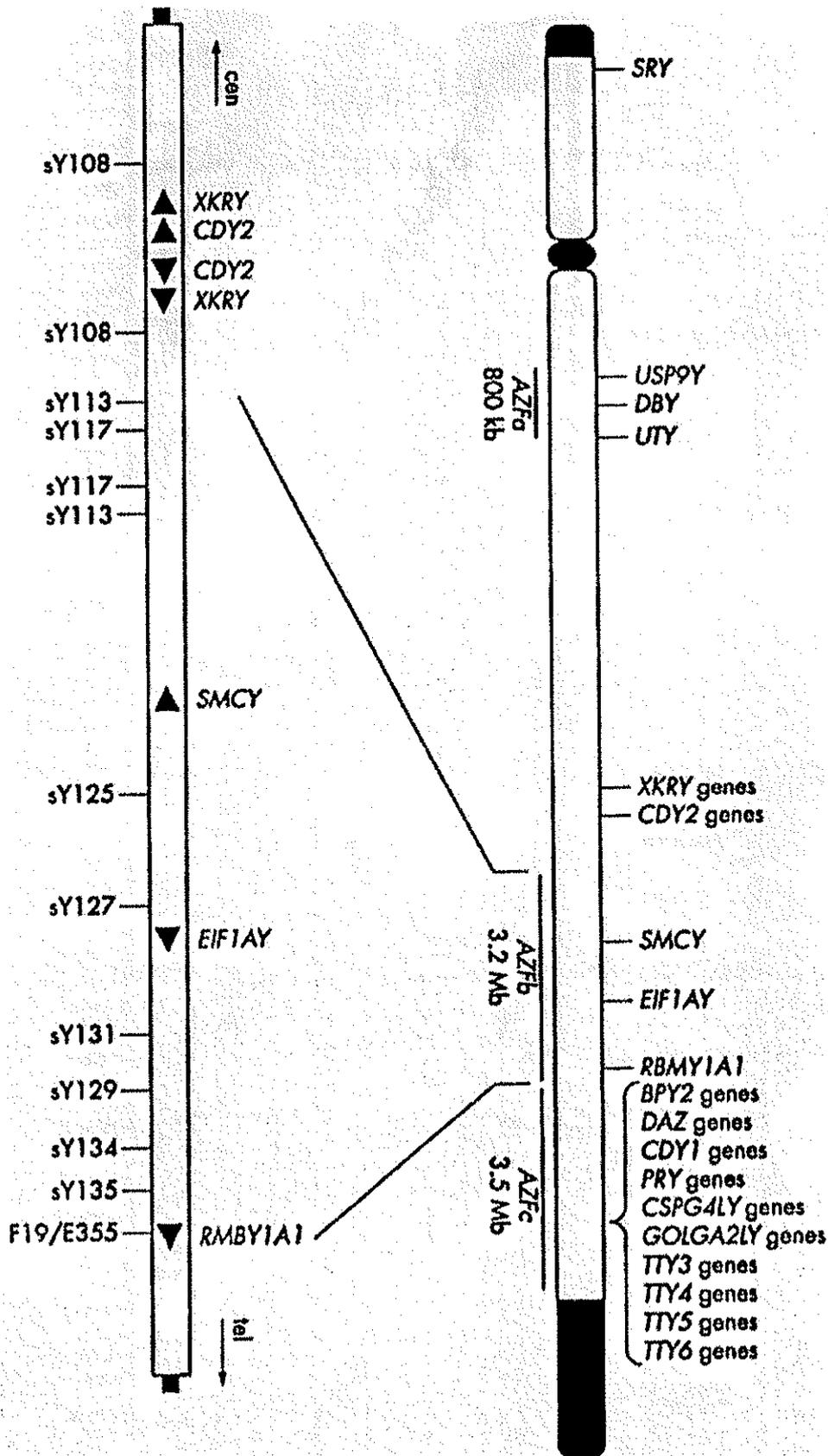


Figure n°15 : le chromosome Y et la région AZFb d'après Ferlin et al. [20]

*RBM*Y (RNA Binding Motif Y) (figure n°16) est une des plus anciennes familles de gènes présentes sur le chromosome Y des mammifères. On en retrouve un homologue sur le chromosome X (*RBM*X). Ils sont présents chez tous les mammifères [22, 23]. Il existe une version de *RBM*Y/X sur le chromosome 11 appelée *hnRNPG-T* (heterogenous nuclear RiboNucleoProtein G Testis-specific relative) dont on pense qu'elle pourrait prendre le relais lors de la méiose quand les chromosomes sexuels sont inactifs. Il est possible que *RBM*Y ait évolué à partir de *hnRNPG-T* par transposition sur le Y, amplification répétée et délétions [23, 24]. Les gènes *RBM*Y ont environ 67% d'homologie avec *hnRNPG* pseudogène localisé sur le chromosome 6.

Les gènes *RBM*Y appartiennent à la famille de gènes *RBM* caractérisée par le domaine hautement conservé RRN (RNA Recognition Motif) de 80 acides aminés situé dans la partie N-terminale. Il existe environ 30 gènes *RBM* répartis en six sous-familles (*RBM*I à *RBM*VI) [25] parmi lesquelles seule *RBM*I est transcrite activement et donne lieu à une production de protéines.

Six gènes de *RBM*I ont été identifiés sur le chromosome Y : 4 pseudogènes et deux gènes actifs [26]. *RBM*Y1 possède 12 exons : les exons 2 à 4 codent pour le motif RNP et les exons 7 à 10 codent chacun pour une « boîte SRGY » séquence de 37 acides aminés contenant principalement la sérine, l'arginine, la glycine et la tyrosine et notamment des dipeptides SR/RS. Suivant l'épissage, on obtiendra 3 ou 4 de ces boîtes. *RBM*Y2 code pour une protéine possédant un seul motif SRGY. *RBM*Y2 serait une version dégénérée de *RBM*Y1 ne possédant pas les exons 7 à 9 [27]. Les gènes *RBM*X, *hnRNPG* et *hnRNPG-T* ne possèdent qu'un seul motif SRGY.

Les protéines produites ne se retrouvent donc que dans le noyau des cellules germinales mâles où elles exerceraient un contrôle de l'épissage de l'ARN pré-messager [26]. En effet, elles interagissent avec des protéines comme SR related pre-RNA splicing factor et Tra-2 β qui sont impliquées dans la sélection des sites d'épissages de l'ARN pré-messager et avec des protéines de type STAR (Signal Transduced And RNA processing) comme SAM68 et T-STAR protéines nucléaires exprimées abondamment pendant la prophase méiotique [28]. *RBM*X est ubiquitaire et s'exprime dans toutes les cellules en division.

*RBM*Y semble appartenir à deux types de familles de gènes dits gènes répétés avec effet de dosage (gènes possédant de nombreuses copies presque identiques : l'organisme a besoin d'une grande quantité du produit de ces gènes par exemple

gènes des ribosomes ou des histones) et gènes répétés variants (gènes dérivant d'un ancêtre commun avec une homologie non complète comme les globines, les actines et les immunoglobulines) [29].

Malgré la présence de nombreuses copies de *RBM Y* en dehors de la région AZFb, il semblerait que, lorsque celle-ci est délétée, l'expression de *RBM Y* devienne nulle [24, 26]. Le nombre de copie de *RBM Y* nécessaire à une spermatogenèse correcte n'est pas connu.

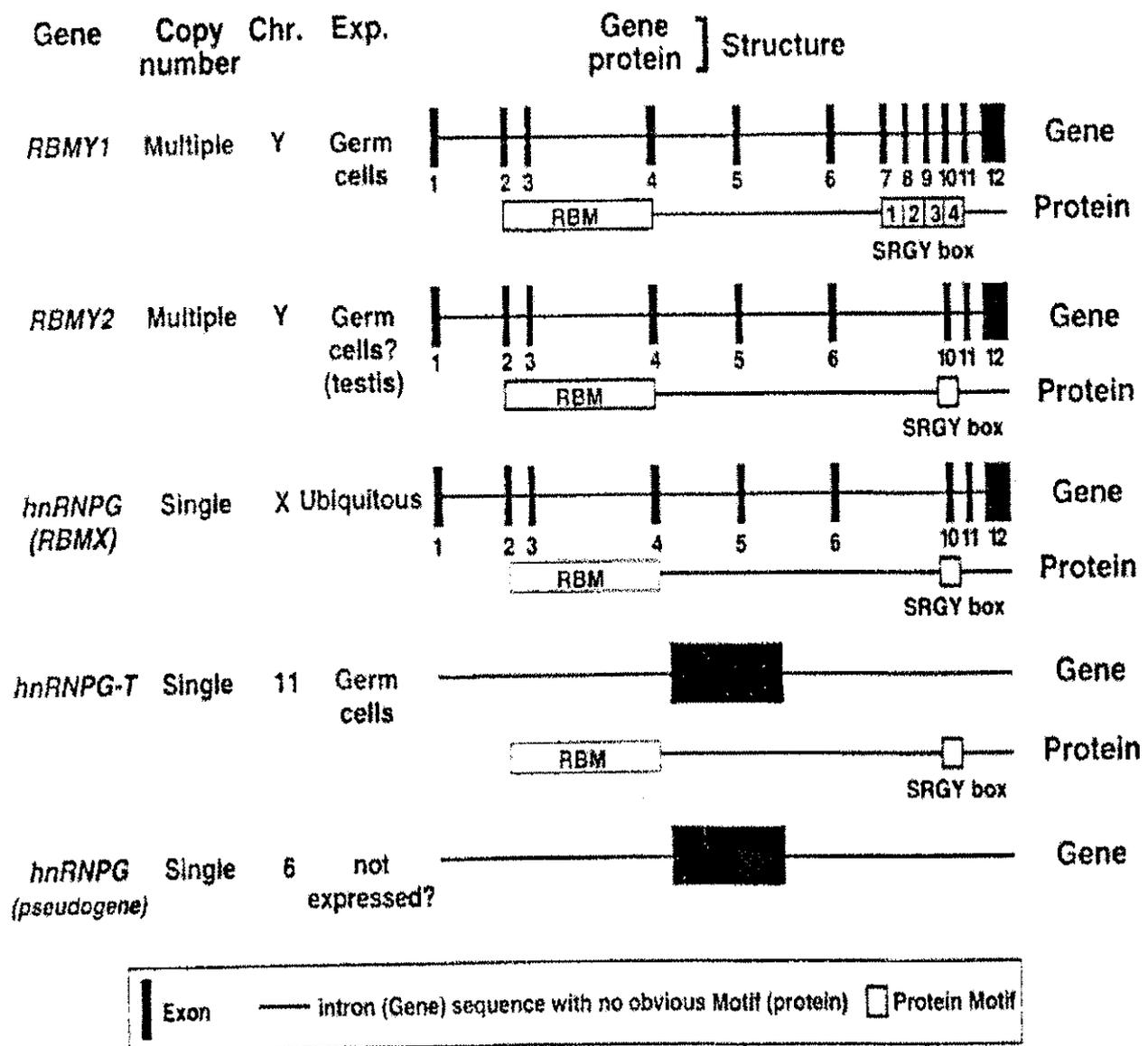


Figure n°16 : Propriétés et structure de la famille de gènes *RBM Y* et *hnRNPG* d'après D.J.Elliott [26]

PRY (PTP-BL related Y) est un gène de 25 Kb et 5 exons. Il existe de nombreuses copies de ce gène sur le chromosome Y. On ne retrouve que deux copies entières de *PRY* (*PRY1* et *PRY2*) au niveau de AZFb. *PRY* s'exprime dans le tissu testiculaire dans un nombre limité de spermatozoïdes et de spermatides. Il jouerait un rôle dans le phénomène de régulation par apoptose des spermatozoïdes et des spermatides. [30-32]

HSFY (Heat Shock transcription Factor, Y chromosom) appartient à la famille des gènes heat shock factor dont on a démontré l'implication dans la spermatogenèse chez l'animal et l'homme. C'est un gène de sept exons. L'épissage alternatif de ce gène génère trois transcrits différents et les protéines correspondantes. Chaque transcrit a en commun le domaine HSF. Il existe des pseudogènes de *HSFY* au niveau de AZFc et des séquences similaires à quelques-uns des exons au niveau du bras court du Y, au niveau du X et du 22. Un des transcrit est exprimés de façon ubiquitaire alors que les deux autres sont exclusivement retrouvés au niveau du testicule. [33]. Son expression serait limitée aux cellules de Sertoli et aux cellules de la lignée spermatique. Il a été mis en évidence une translocation de *HSFY* entre le cytoplasme et le noyau des cellules spermatiques durant la spermatogenèse. [34]

EIF1AY (Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y isoform) est localisé en Yq11.222 (5Q). Il n'existe qu'une seule copie de ce gène comprenant 7 exons. Il code pour une isoforme de eIF-1A, protéine de 144 acides aminés d'expression ubiquitaire permettant l'initiation de la traduction. Elle servirait au transport du complexe 43S. Des délétions de ce gène n'ont jusqu'à présent jamais été retrouvées chez des hommes infertiles. Il n'est donc pas considéré à l'heure actuelle comme responsable d'infertilité.

γ) AZFc

La région AZFc (figure n°17 et 18) se situe au niveau de la partie distale de la région NRY entre les sous-intervalles 6D et 6F et représente environ 3,5 Mb. Elle contient 8 familles de gènes. Sur celles-ci, seules les familles de gènes *CSPG4LY* et *GOLGA2LY* sont spécifiques de AZFc.

La structure d'AZFc a été publiée récemment par Kuroda-Kawaguchi et al. [12].

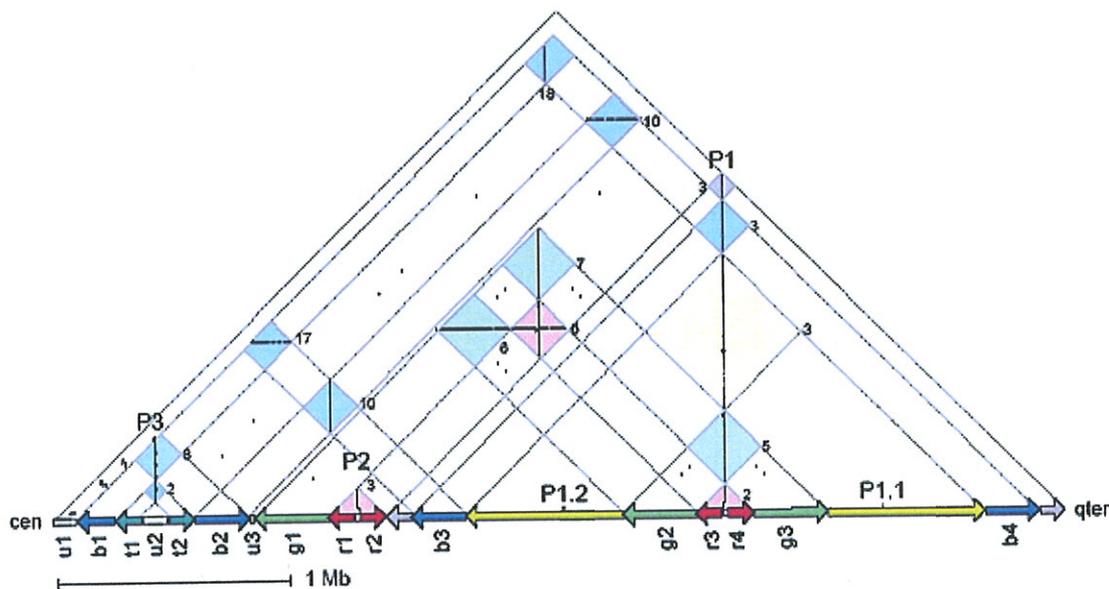


Figure n°17 : la région AZFc d'après Kuroda-Kawaguchi et al.[12]

Ce schéma montre une portion de 4,5 Mb du chromosome Y incluant AZFc (P1, P2 et jusqu'à l'amplicon b2 de P3). (Le terme amplicon doit ici être considéré comme une portion bien définie d'ADN ayant un caractère répétitif).

Les lignes diagonales grises marquent la limite de chaque amplicon

Les carrés de couleurs relient les amplicons (de la même couleur) ayant une séquence presque identique (par exemple g1, g2 et g3 ou r1, r2, r3 et r4). Le chiffre situé à côté de ces carrés indique le nombre de substitutions par 10 Kb. (par exemple entre g1 et g2 on a 5 substitutions/10 kb).

Au niveau des carrés, une ligne horizontale montre que les deux amplicons reliés sont dans le même sens (g1 et g2, b2 et b4 ...) tandis qu'une ligne verticale montre

que leur séquence est inversée (g1 et g3, b2 et b3...). Une ligne verticale qui croise la ligne horizontale basale délimite un palindrome : P1, P2 et P3.

L'orientation générale du schéma est donnée : cen = centromère à gauche, qter = extrémité du bras long à droite.

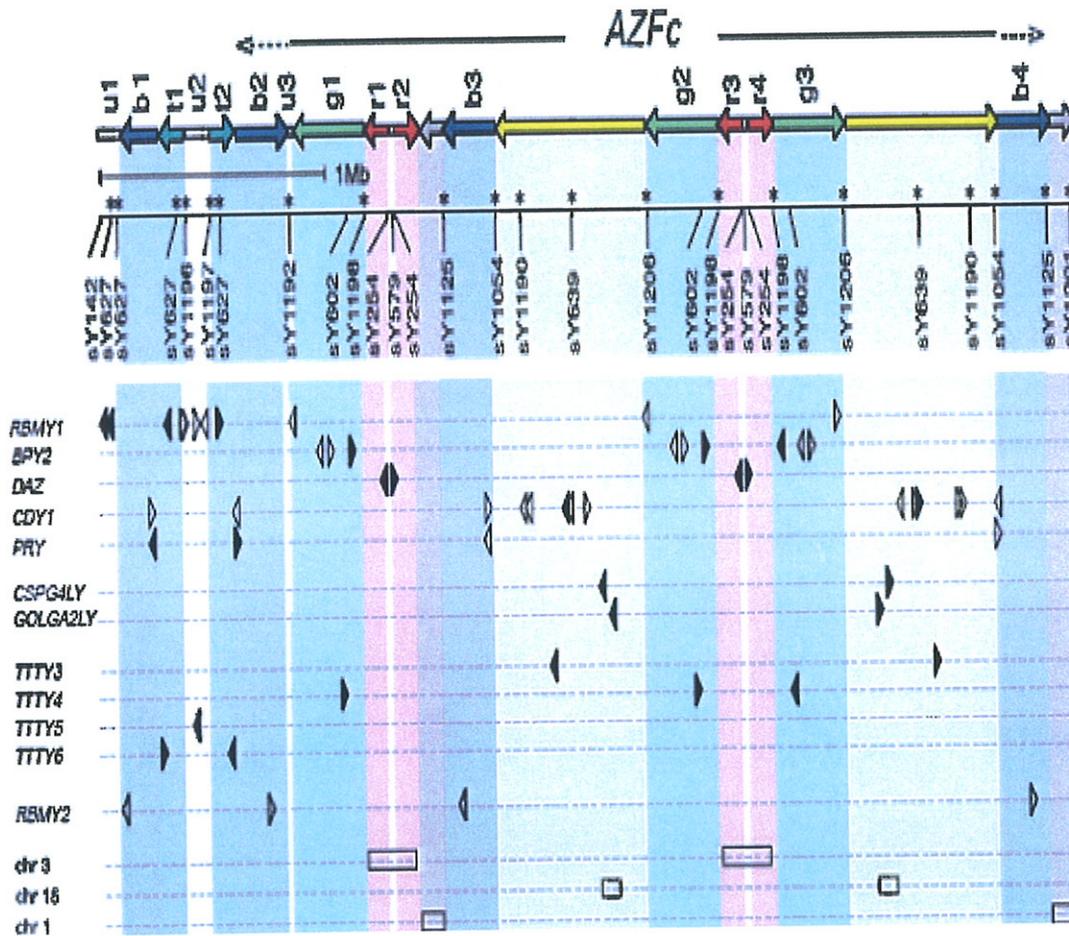


Figure n°18 : Localisation des gènes présents sur AZFc d'après Kuroda-Kawaguchi et al. [12]

On retrouve au niveau d'AZFc des copies de nombreux gènes déjà cités (*RBMY*, *CDY*, *PRY* ...) [35]. Les gènes les plus intéressants au niveau d'AZFc, dans le cadre du diagnostic d'infertilité, sont ceux de la famille de gènes DAZ (Deleted in Azoospermia).

DAZ

Cette famille comporte moins de dix gènes. Elle est caractérisée par la présence dans sa partie N-terminale d'un motif RNP/RRM et dans sa partie C-terminale par des répétitions en tandem d'un motif appelé DAZ de 24 acides aminés [36]. Elle comporte notamment :

Le gène *BOULE* et le gène *DAZL* (également appelé *DAZLA* ou *DAZL1*) situés sur des autosomes et constitués d'un seul motif DAZ.

Les gènes *DAZ* constitués de 7 à 24 répétitions du motif DAZ, situés au niveau d'AZFc. Le nombre de copies est variable dans la population humaine. [37]

BOULE est considéré comme l'ancêtre commun de cette famille de gènes et ses orthologues ont été identifiés chez la drosophile, *Caenorhabditis elegans* et la souris. *DAZL* ne se retrouve que chez les vertébrés [38]. Sa séquence est plus proche de *DAZ* que celle de *BOULE*. [36]

Les gènes *DAZ* ne se retrouvent qu'au niveau du génome des grands singes et de l'homme. L'apparition de *DAZ* sur le chromosome Y aurait eu lieu pendant l'évolution des primates par transposition d'un gène autosomique (*DAZL* sur le chromosome 3), réarrangement et amplification des exons puis amplification du gène modifié. [39] L'acquisition de gènes de fertilité autosomiques ferait partie du processus d'évolution du chromosome Y.

Ces gènes sont exprimés exclusivement dans les cellules germinales et codent pour des protéines de transport de l'ARN permettant une régulation des ARNm. *DAZ* et *DAZL* participent au développement des cellules primordiales et à la maturation des cellules germinales. *BOULE* ne joue un rôle que dans le déroulement de la méiose [38].

DAZL code pour une protéine que l'on retrouve surtout dans le cytoplasme des spermatocytes pachytènes [40] [41]. *DAZ* code pour différentes protéines possédant donc une région de 24 acides aminés retrouvée 7 à 24 fois suivant la constitution du gène. Ces protéines se retrouvent dans les spermatocytes pachytènes [42], les spermatides et la queue des spermatozoïdes. Elle permettrait la conservation et le transport des ARNm spécifiques du testicule. [43]

Yfm1 [44] est un microsatellite spécifique du chromosome Y. Il est retrouvé au niveau de trois locus dans AZFc à proximité des gènes *DAZ*. Le nombre de copies de *Yfm1* permet de définir quatre classes : A, A*, B et C, les classes A et A* ayant le moins grand nombre de copies. Leur utilité sera précisée plus bas.

BPY2 (testis Basic Protein, Y chromosom 2) est un gène de 21 kpb et constitué de 9 exons. Présent en simple copie, il est situé à peu près au même niveau que les gènes *DAZ* dans AZFc. [45]. Il s'exprime exclusivement dans les testicules.

CDY (ChromoDomain Y) est un gène d'expression exclusivement testiculaire présent en de multiples copies. Il code pour des protéines qui pourraient modifier l'ADN ou des protéines chromosomiques lors de la spermatogenèse [18]

3.2) Le reste du bras long

La région immédiatement proximale à l'hétérochromatine présente de nombreuses séquences répétées Y-spécifiques notamment plus de 40 copies de pY6H65.

La région d'hétérochromatine est située entre Yq11.2 et PAR2. Sa taille est très variable : elle peut aller de quelques bases à une longueur d'environ 30 Mb. Elle est composée exclusivement de séquences hautement répétées de type ADN satellite spécifique du chromosome Y humain :

DYZ1 [3,4 Kb, (TTCCA)*n*] est répétée environ 3000 fois.

DYZ2 (2,1 Kb) présente environ 2000 copies réparties de façon non uniforme.

Comme dans les autres chromosomes humains, l'hétérochromatine n'est pas exprimée dans les cellules. Elle jouerait éventuellement un rôle dans la formation de la vésicule sexuelle au cours de la méiose. Il a également été suggéré qu'elle joue

un rôle de tampon servant à « absorber » les mutations délétères afin de protéger la portion génique [46, 47]

Cette région est donc soumise à des variations de taille inter-individuelles et inter-populationnelles très importantes mais aucune variation phénotypique n'y a été rattachée.

III/ Les fonctions du chromosome Y

A) La détermination du sexe (figure n°20)

Depuis les années 60 et l'étude des cas d'anomalies chromosomiques, on sait que la détermination des testicules dépend de la présence du chromosome Y et ce quel que soit le nombre de chromosome X qui l'accompagnent. On a appelé TDF (Testis Determining Factor) le facteur codé par un gène du chromosome Y capable d'entraîner la différenciation des testicules à partir des gonades primitives.

A la fin des années 80, l'étude d'individus humains présentant un sexe phénotypique en discordance avec leur caryotype, a permis la mise en évidence du gène codant pour le TDF : des individus (46,XX) phénotypiquement masculins présentaient dans leur génome une séquence provenant du chromosome Y. Cette séquence codante fut baptisée SRY (Sex-determining Region of Y chromosome). Plusieurs critères font de lui un gène potentiel pour être le « TDF » :

- On le retrouve sur le chromosome Y de nombreuses espèces mammifères
- Des individus (46,XY) avec phénotype féminin présentent une mutation de ce gène.
- Il code pour une protéine pouvant se lier à l'ADN
- Son expression coïncide avec la période de détermination du sexe et se fait spécifiquement dans les cellules de la crête génitale masculine.
- La transgénèse de ce fragment chez une souris XX entraîne le développement de testicules.

1) SRY

Il code pour une protéine de 204 acides aminés capable de se lier à l'ADN bicaténaire grâce à son domaine HMG (High Mobility Group). Elle se lie spécifiquement à l'ADN au niveau d'une séquence 5'A/TAACAAA/T 3'. La fixation de cette protéine entraîne une courbure de l'ADN d'environ 70 à 80° dans la direction du

grand sillon ce qui permettrait le rapprochement puis l'interaction entre des facteurs de transcription et les gènes cibles de *SRY*. Ceci permet l'activation en cascade d'autres gènes jouant un rôle dans la détermination du sexe.

La différenciation gonadique a lieu chez l'homme entre la 5^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation. L'établissement du sexe phénotypique se fera ensuite grâce à l'action des hormones spécifiques sécrétées par la gonade différenciée. La mise en place du tractus génital se fait au cours de la vie foétale alors que les caractères sexuels secondaires ne sont acquis qu'à partir de la puberté.

Chez l'homme, *SRY* est transcrit dans les crêtes génitales au niveau des cellules de soutien. Ces cellules se différencient en cellules de Sertoli au niveau des cordons testiculaires. Celles-ci permettront ensuite la formation des cellules de Leydig dans le mésenchyme présent entre les cordons. Les cellules de Leydig produiront les hormones nécessaires à la différenciation des organes génitaux mâles internes et externes et les cellules de Sertoli synthétiseront l'AMH (hormone anti-müllérienne) permettant la régression du canal de Müller. *SRY* s'exprime également dans le testicule adulte au niveau des cellules germinales méiotiques et post-méiotiques.

Chez la femme, en l'absence de *SRY*, les cellules de soutien donnent des cellules folliculaires qui entourent les cellules germinales. Ces cellules germinales entrent en méiose directement et se transforment en ovogonies tandis que les cordons sexuels dégénèrent. Le gène *DAX1* permet d'inhiber les autres gènes impliqués dans la masculinisation. Les ovaires produisent des oestrogènes permettant l'acquisition des caractères sexuels féminins avec maintien et différenciation du canal de Müller et disparition du canal de Wolff.

Schéma récapitulatif du contrôle génétique des étapes de la différenciation sexuelle

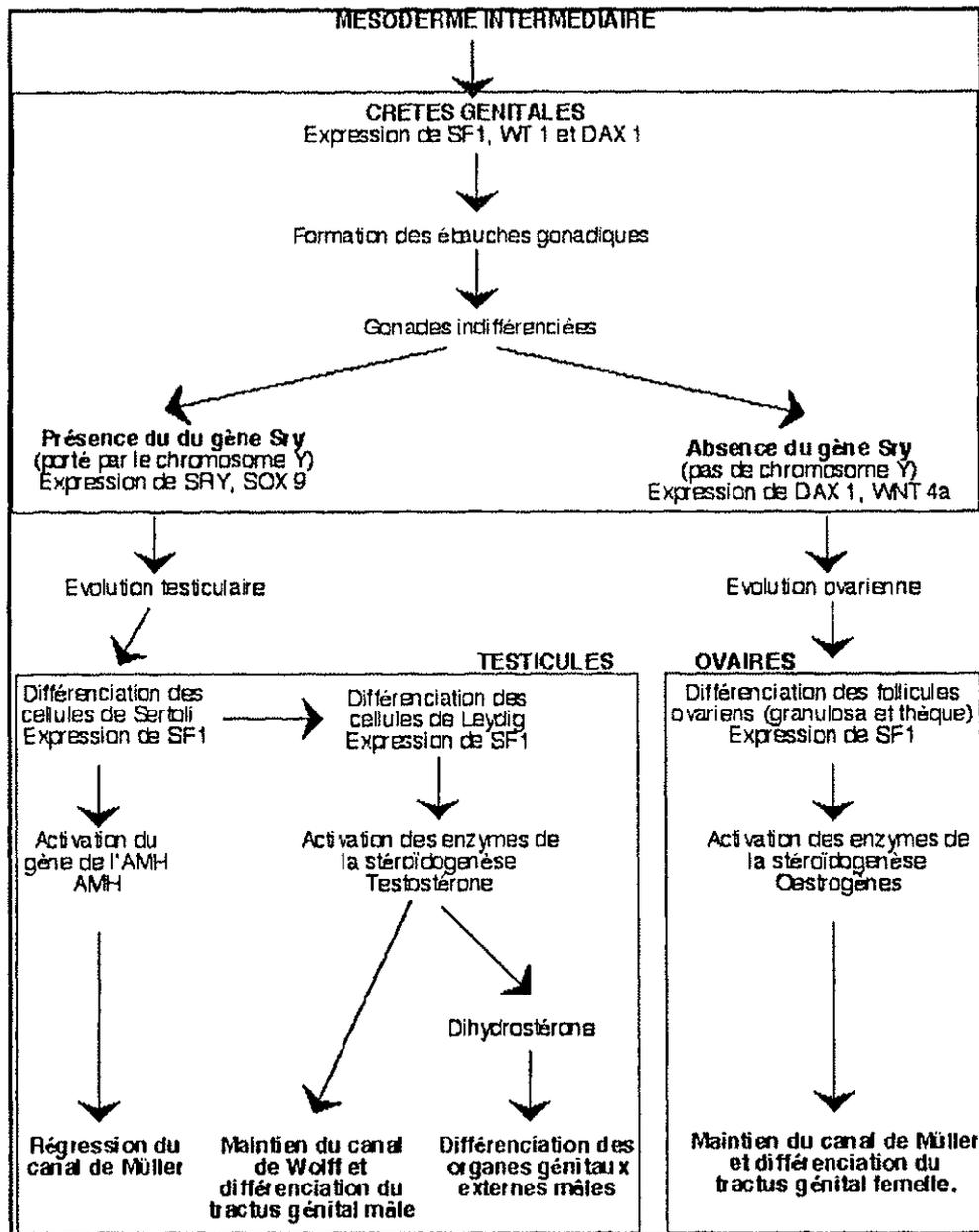


Figure n°19 : d'après G. Furelaud, N. Devos et A. Sabouret [48]

2) Les autres gènes de la cascade (figure n°19)

Cinq gènes impliqués dans la différenciation sexuelle ont été identifiés à ce jour en plus de *SRY*. Il s'agit de *WT1*, *SOX9*, *DAX1*, *SF1* et *AMH*.

→ WT1

WT1 est localisé sur le bras court du chromosome 11 (11p13.13), mesure 50 kb et comprend 10 exons. Il code pour différentes isoformes protéiques dont une est un facteur de transcription se liant à l'ADN par des domaines en doigts de zinc. On pense que *WT1* contrôle directement la transcription de *SRY* et qu'il est impliqué dans la transcription du gène de l'AMH.

Ce gène semble être nécessaire en double dose pour obtenir un développement normal du testicule. Au contraire un seul allèle normal est suffisant pour obtenir les ovaires. Il joue également un rôle dans le développement normal du rein.

On observe différents phénotypes liés aux mutations de *WT1* :

- Le syndrome de Denys-Drash associe insuffisance rénale aiguë, néphroblastome et dysgénésie gonadique avec ambiguïté génitale chez la plupart des individus XY touchés.

- Le syndrome de Frasier est caractérisé par une néphropathie d'évolution lente et une dysgénésie gonadique entraînant un phénotype complètement féminin chez les individus XY.

- Le syndrome WAGR (Wilms tumor-Aniridia-Genitourinary anomalies-mental Retardation) associant une prédisposition à la tumeur de Wilms, une aniridie totale ou partielle, un retard mental et des anomalies génitales allant de l'ambiguïté sexuelle à l'ectopie testiculaire avec anomalie urinaire.

→ SOX9

Les gènes codant pour des protéines possédant un domaine de fixation à l'ADN de type HMG sont rassemblés dans la famille SOX.

SOX9 se trouve sur le bras long du chromosome 17 (17q24) et code pour une protéine de 509 acides aminés dont le domaine HMG présente une forte homologie avec celui de *SRY*.

SOX9 permet l'activation de la transcription du gène de l'AMH.

Sa capacité à induire la différenciation sexuelle serait fonction de sa concentration :

- Chez l'homme normal (deux allèles), l'expression de *SRY* permet une surexpression du gène *SOX9* et donc une plus grande quantité de protéine

qui sera transportée dans le noyau. Chez la femme, la protéine reste localisée dans le cytoplasme puis est détruite.

- Un cas de duplication de *SOX9* entraînant la présence de trois allèles a été montré chez une personne 46,XX présentant un phénotype masculin.
- Au contraire, un individu 46,XY porteur d'une mutation hétérozygote de *SOX9* présentait un phénotype féminin.

Une mutation entraînant l'inactivation de *SOX9* est responsable de la dysplasie campomélique associant anomalies osseuses diffuses et anomalies gonadiques pour les trois quarts des patients de caryotype 46/XY.

→ *DAX1*

Ce gène est situé sur le bras court du chromosome X. Il code pour une protéine de 470 pb caractérisée par une partie C-terminale similaire aux domaines de liaison du ligand des récepteurs nucléaires et par une partie N-terminale capable de se lier à l'ADN.

DAX1 permet l'inhibition de *SF1*.

Les individus de caryotype 46XY ayant une duplication du bras court entraînant la présence de *DAX1* en double dose présentent un phénotype féminin avec dysgénésie gonadique. De plus, chez l'homme, des mutations de *DAX1* sont responsables d'hypogonadotrophie.

→ *SF1*

SF1 est localisé sur le bras long du chromosome 9. Il code pour une protéine appelée Steroidogenic factor 1. C'est un récepteur nucléaire régulant la transcription de nombreuses enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse des tissus surrénalien et gonadique. Il permet également la régulation de gènes d'hormones protéiques hypophysaires (LH et FSH) et testiculaires (AMH).

→ Gène de l'AMH

Il est localisé sur le bras court du chromosome 19.

L'AMH joue un rôle primordial dans la différenciation somatique et donc dans l'engagement du tractus génital vers la voie masculine ou féminine.

SOX9 et SF1 agissent en synergie pour initier l'expression du gène de l'AMH et l'action combinée de SF1 avec une des isoformes de WT1 permet l'activation de sa transcription. Au contraire DAX1 quand il est présent en double dose, inhibe l'action de SF1 sur le promoteur de ce gène.

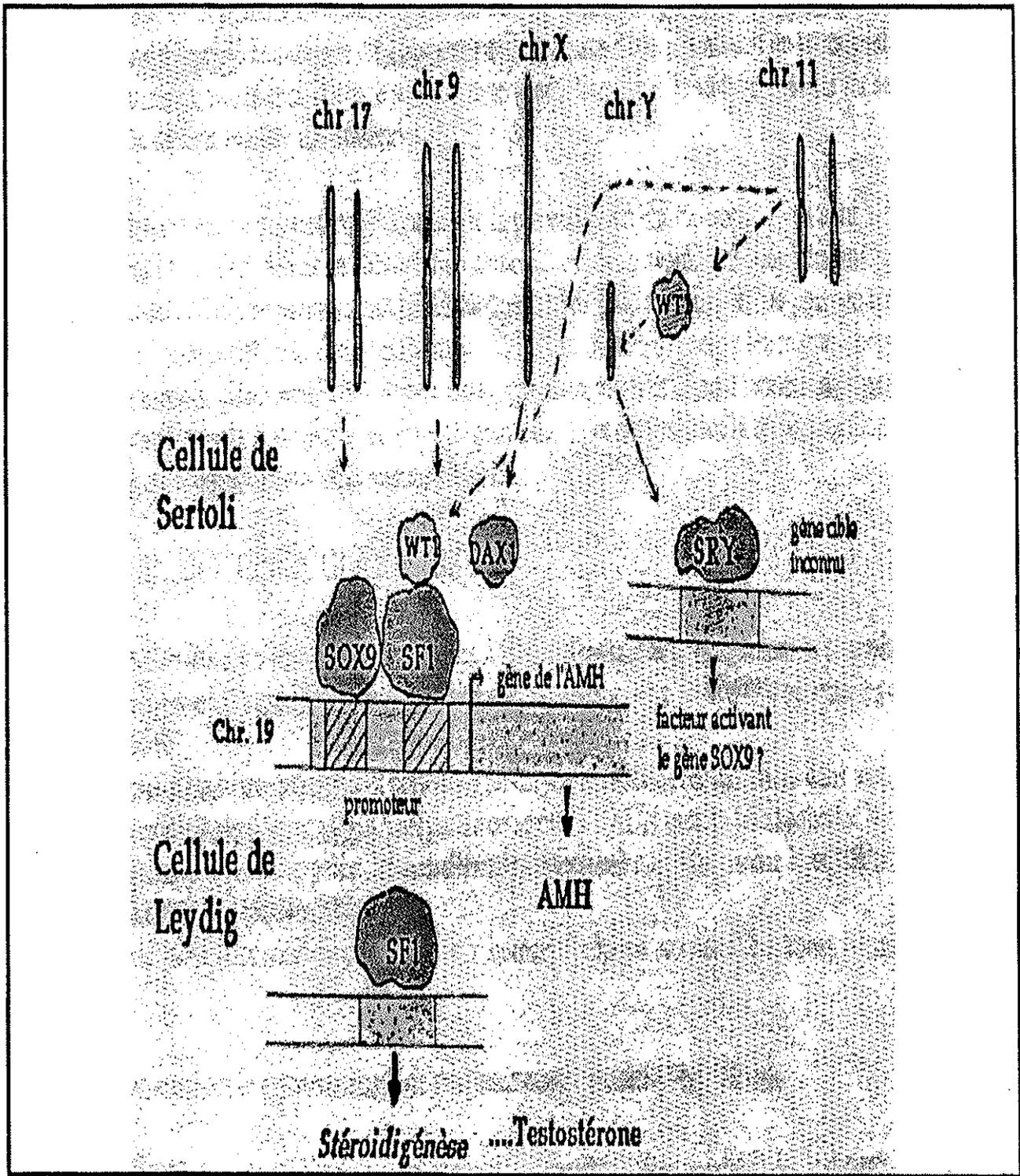


Figure n°20 : Schématisation de la cascade de déterminisme du sexe chez les mammifères d'après F.Jauzein [49]

B) La fertilité masculine

Le rôle du chromosome Y dans la mise en place des caractères masculins était présumé du fait de sa spécificité mâle. Il a été étayé récemment par la mise en évidence d'anomalie de structure chromosomique puis de délétions chez des individus infertiles.

L'implication des gènes du chromosome Y dans la fertilité masculine sera rediscutée au chapitre « chromosome Y et infertilité ».

C) La croissance staturale : l'effet anti-Turner

Les anomalies de la stature sont relativement communes dans l'espèce humaine (incidence de 3%) et sont associées à divers syndromes cliniques. Le contrôle de la croissance est en effet soumis à différents facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux.

En dehors des causes de malnutrition, les anomalies de la croissance ont pu être rattachées à un défaut de l'axe GH (Growth Hormone)-IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) chez environ 1% des sujets atteints. Des mutations du gène du récepteur à la GH ont été rapportées chez des sujets atteints de nanisme [50]

Plusieurs gènes autosomiques sont impliqués dans les anomalies de la croissance : *LHX3* situé sur le chromosome 9 [51] et *LHX4* sur le 1 [52]

L'influence d'un ou de plusieurs gènes situés sur le chromosome Y a été suggérée du fait du dimorphisme sexuel dans la taille adulte et par la comparaison des tailles avec des patients présentant un chromosome Y surnuméraire [53].

Plusieurs pistes ont été explorées à ce jour :

→ Le syndrome de Turner est associé au caryotype 45X,(-X). Il est caractérisé notamment par un retard de croissance majeur dans un contexte polymalformatif le plus souvent modéré. C'est la seule monosomie viable identifiée à ce jour dans l'espèce humaine. Le syndrome de Turner serait dû à une haploinsuffisance liée à un ou plusieurs gènes échappant au mécanisme d'inactivation sur le chromosome X et présentant une copie fonctionnelle sur le Y.

Chez ces patientes l'absence du Y et d'un X les prive de la présence en double dose de ces gènes essentiels à la stature entre autre [54]. Plusieurs gènes sont candidats pour ce rôle :

- *SHOX* (localisé dans PAR1) : les équipes de Ellison et de Rao [55] ont montré que ce gène était délétée chez des patients atteints de retard de croissance idiopathique sévères. De plus, il a été montré que des anomalies géniques concernant *SHOX* étaient associées à la dyschondrostéose de Leri-Weill et dans la dysplasie mésomélique de Langer. [56] [57, 58]

Récemment, l'équipe de Borie a mis en évidence, chez un jeune garçon atteint d'un retard isolé de croissance, une délétion du gène *SHOX* dans un cadre de réarrangement entre les chromosomes Y et 22 [59]

- *RPS4Y*, *ZFY* et *UTY* sont également des candidats plausibles.

→ La détection de délétions terminales du chromosome Y chez des patients présentant une petite taille et une infertilité [60] a permis de localiser une région de Yq11 proche du centromère qui pourrait contenir un gène impliqué dans la croissance staturale. Ce gène potentiel a été baptisé *GCY* (Growth-controlling region on the Y). Les travaux de Kirsch ont permis de le localiser à proximité de sY83 [61-63] entre les marqueurs *DYZ3* et *DYS11* [64]. Ce gène n'a pas encore été identifié formellement à ce jour. Plusieurs modèles ont été proposés et sont à l'étude [65].

4/ CHROMOSOME Y ET INFERTILITE

I/ Les causes de l'infertilité masculine

L'infertilité est définie par rapport à un couple donné. Elle est définie comme l'incapacité à concevoir après 12 mois de rapports réguliers en absence de contraceptifs [66]

La prévalence des couples infertiles dans les pays occidentaux est évaluée à 10-15% (WHO 1997). 20% des cas seraient dus à l'homme seul, 38% à la femme seule, 27% aux deux partenaires et 15% des cas restent d'origine indéterminée [67]. L'infertilité masculine a des causes multiples mais on ne peut les diagnostiquer que dans 50 à 60% des cas. Dans tous les cas où aucune pathologie expliquant cette infertilité ne peut être objectivée, on parle d'infertilité idiopathique.

Tableau 1 : Résumé des étiologies de l'infertilité masculine d'après K.McElreavey

Normospermie : spermatozoïdes > 20 millions/ml

Azoospermie : absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat

Oligozoospermie : spermatozoïdes < 20 millions/ml

Oligozoospermie sévère : spermatozoïdes < 5 millions/ml

Cryptozoospermie : spermatozoïdes < 1 million/ml

Aspermie : absence de sperme

Etiologies	Phénotype associé le plus fréquent
<p>Pré-testiculaire</p> <p>Endocrine (insuffisance gonadotrope)</p> <ul style="list-style-type: none"> - congénitale (syndrome de Kallman) - acquise (tumeur, post-traumatique...) <p>Troubles du coït</p> <ul style="list-style-type: none"> - dysfonction érectile - dysfonction éjaculatoire 	<p>azoospermie</p> <p>azoo/oligospermie</p> <p>aspermie</p> <p>aspermie</p>
<p>Post-testiculaire</p> <p>Obstructive</p> <ul style="list-style-type: none"> - épididymale (congénitale ou post-infectieuse) - déférentielle (génétique ou post-vasectomie) <p>Infection des glandes accessoires</p> <p>Immunologique (idiopathique ou secondaire)</p>	<p>azoo/cryptozoospermie</p> <p>azoo/cryptozoospermie</p> <p>oligozoospermie</p> <p>normo/oligozoospermie</p>
<p>Testiculaire</p> <p>Congénitale</p> <ul style="list-style-type: none"> - anorchie - cryptorchidisme <p>Génétique (anomalies chromosomiques)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Klinefelter et ses variantes - translocations, inversions - délétions du chromosome Y - anomalies monogéniques ? <p>Varicocèle</p> <p>Agents exogènes (médicaments, toxiques ...)</p> <p>Chimiothérapie, radiations ionisantes</p> <p>Torsion vasculaire, traumatisme, orchite</p>	<p>azoospermie</p> <p>azoo/oligospermie</p> <p>azoo/oligozoospermie sévère</p> <p>azoo/oligospermie</p> <p>azoo/oligozoospermie sévère</p> <p>azoo/oligozoospermie</p> <p>oligozoospermie</p> <p>oligo/azoospermie</p> <p>azoo/oligozoospermie sévère</p> <p>azoo/oligozoospermie</p>
<p>Idiopathique</p>	<p>azoo/oligozoospermie</p>

II/ Infertilité et anomalies caryotypiques

Les aberrations chromosomiques et mutations géniques sont les principales causes de perte foetale dans l'espèce humaine [68].

Les études cytogénétiques réalisées depuis une trentaine d'années ont permis de démontrer une relation entre anomalies chromosomiques (de structure et/ou de nombre) et infertilité et ce principalement chez l'homme [69]. On retrouve un nombre plus élevé d'anomalies du caryotype chez les patients infertiles ou subfertiles par rapport à la population normale. Les chiffres en Europe et aux Etats-Unis montrent que l'on retrouve chez les hommes consultants pour infertilité par rapport à la population générale [70] :

42 fois plus de Klinefelter (47,XXY)

4 fois plus de caryotypes 47,XYY

20 fois plus de personnes phénotypiquement masculines 46,XX

10 fois plus de caryotype 46,Xder(Y)

Une étude réalisée en Midi-Pyrénées (au sein du Centre de Stérilité Masculine, du CECOS et du service de génétique) sur 25 ans et englobant une très grande série d'hommes infertiles (n = 2651) a permis de donner une idée de la fréquence des anomalies gonosomiques et autosomiques en France. Cette fréquence était de 16,7% chez les hommes atteints d'azoospermie non obstructive, 9,7% chez les hommes oligospermes sévères (< 5 millions/ml), 4,3% chez les oligospermes modérés (5 à 10 millions/ml) et 0,5% chez les oligospermes légers (10 à 20 millions/ml). Les anomalies touchant les gonosomes sont plus fréquemment retrouvées chez les patients avec azoospermie non obstructive alors que les anomalies autosomales sont plus fréquentes chez les oligospermes sévères. Au final, le risque d'anomalies chromosomiques est 20 fois plus élevé chez les patients avec azoospermie non obstructive et oligospermie sévère que dans la population générale. Il en découle qu'une analyse caryotypique doit être conseillée chez les patients ayant une azoospermie non obstructive et les patients oligospermes sévères. Pour les oligospermes modérés, la fréquence des anomalies caryotypiques (4,7% pour une fréquence de 0,6% dans la population générale) n'est pas négligeable. Ce diagnostic doit donc pouvoir leur être proposé spécialement dans les cas familiaux de problèmes de fertilité[71].

Plusieurs anomalies chromosomiques sont susceptibles de provoquer un défaut de spermatogenèse :

Les translocations réciproques gonosomes/autosomes : en bloquant la formation de la vésicule sexuelle, la première méïose est bloquée au stade métaphase.

Les translocations entre autosomes

La présence de chromosomes acrocentriques ou en anneaux

Les délétions du chromosome Y : parfois visibles sur le caryotype

Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté l'existence de cas familiaux [72, 73].

III/ Les délétions du chromosome Y

A/ Origine des microdélétions

Mis à part quelques cas de transmission père/fils décrits pour AZFc, dans la très grande majorité des cas, ce sont des délétions *de novo* [74]. Elles pourraient être dues à une anomalie durant la méiose mâle ou bien à un défaut de formation des spermatogonies chez le fœtus (ce qui pourrait entraîner l'existence d'une mosaïque germinale) [75].

Les délétions pourraient être dues à des recombinaisons homologues illégitimes entre des séquences très semblables voire identiques disséminées dans le génome.

La région AZFa est entourée par deux séquences d'environ 10 kb identiques à 94% HER Vyq1 et HER Vyq2 toutes deux portions d'un rétrovirus [76, 77]. Si ces séquences s'associent lors de la méiose, AZFa sera délétée. La recombinaison peut se faire selon deux schémas différents produisant deux types principaux de délétions différant légèrement par leurs points de cassure. La délétion complète d'AZFa entraîne la perte d'une portion de 792 kb incluant *USP9Y* et *DBY*. Les délétions plus petites n'incluant que *USP9Y* ou *DBY* ont été décrites mais le mécanisme expliquant leur survenue n'est pas encore élucidé.

La délétion complète d'AZFb concerne un domaine de 6,2 Mb (contenant 32 gènes et unités transcriptionnelles). Elle est due à la recombinaison entre une séquence du palindrome P5 et une séquence homologue située dans la partie proximale du palindrome P1 [21].

AZFc est, elle, entourée par deux séquences de 229 kb identiques à 99,9% [12], b2 du palindrome P3 et b4 du palindrome P1. Ces deux séquences peuvent s'apparier pendant la méiose et entraîner une délétion de 3,5 Mb d'AZFc [12]. La zone de recombinaison étant plus étendue pour AZFc, les délétions d'AZFc sont plus fréquentes.

Les délétions incluant AZFb et AZFc peuvent être dues à deux types de recombinaisons (cf. figure n°21) : soit entre P5 et la partie distale de P1 (perte de 7,7 Mb), soit entre P4 et la partie distale de P1 (perte de 7 Mb) [21]. Il existe également un modèle de délétion concernant AZFb et une portion d'AZFc contenant deux copies de *DAZ*. Elle va de P5 à la portion proximale de P1 et couvre 6,2 Mb. Compte tenu de la formation répétitive et palindromique de cette région, d'autres types de recombinaisons pourraient se produire entraînant d'autres délétions.

Quoiqu'il en soit, les patients générant des gamètes porteurs d'une délétion la transmettront obligatoirement à leur descendance mâle. De plus, la présence de délétions au niveau du chromosome Y pourrait être responsable de la non-disjonction des chromosomes sexuels pendant les phases précoces du développement embryonnaire d'où la présence de spermatozoïdes anormaux XY [78] et le risque de donner naissance à des enfants atteints de Klinefelter (47,XXY).

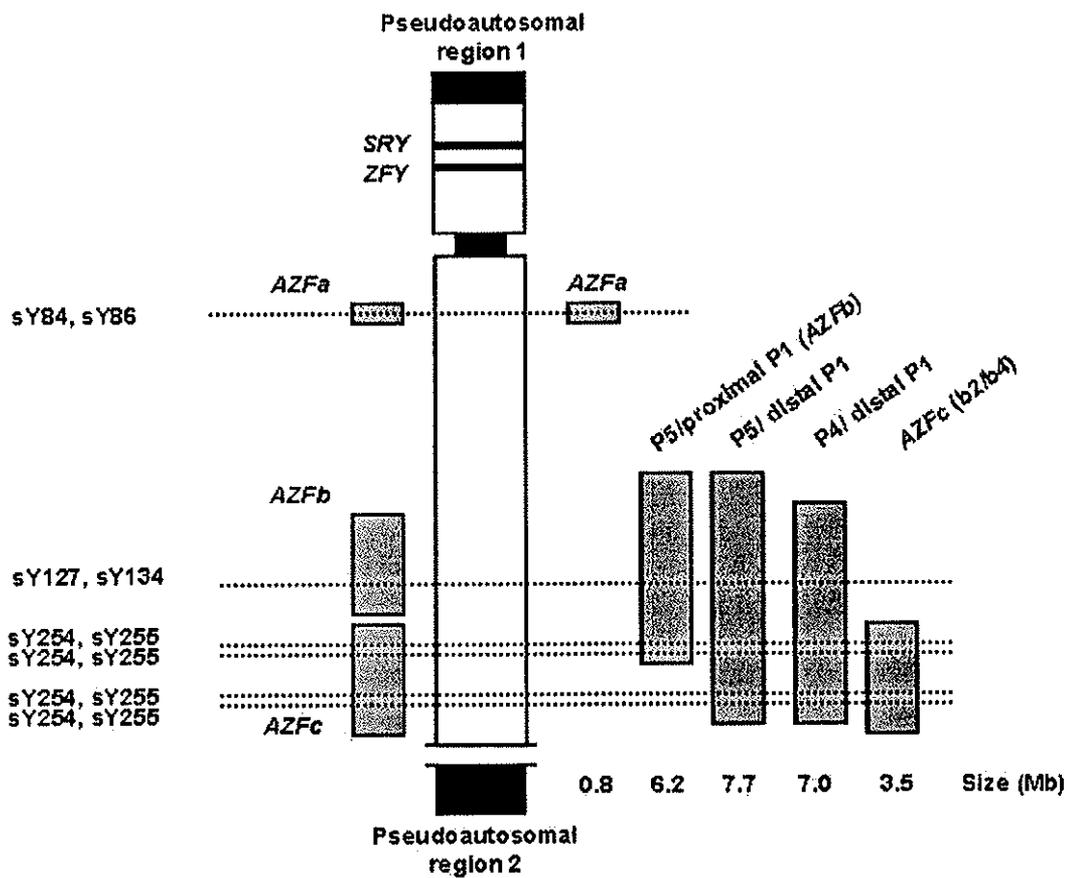


Figure n° 21 : Représentation schématique du chromosome Y et des modèles de délétions actuellement admis [79]

B/ Conséquences des délétions sur la spermatogenèse : lien entre génotype et phénotype.

Les délétions du bras long du chromosome Y sont quasi-constamment associées à un déficit de la spermatogenèse et après le syndrome de Klinefelter, elles sont la deuxième cause génétique la plus fréquente d'anomalies de la spermatogenèse.

Ces délétions sont retrouvées principalement chez les hommes azoospermes (66%) moins souvent chez les oligospermes sévères (28%).

Elles sont associées le plus souvent à une infertilité idiopathique mais dans certains cas elles peuvent « cohabiter » avec d'autres causes, connues, d'infertilité comme un varicocèle, une orchite ... [80]

A noter que des défauts monogéniques autosomaux responsables d'infertilité ont par ailleurs été identifiés :

- Des mutations des gènes des récepteurs des androgènes [81-84], de l'oestradiol, de la LH [85], de la FSH [86] et de l'AMH ont été décrites chez des hommes infertiles.
- Des mutations des gènes contrôlant le système paracrine ainsi que des mutations au niveau de protooncogènes impliqués dans le système de transduction seraient susceptibles de causer une infertilité [87]
- La mutation du gène *CFTR* se retrouve chez environ 80% des personnes atteintes d'azoospermie **obstructive** liée à l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents.

L'implication du chromosome Y était présupposée du fait de la corrélation entre infertilité et anomalies caryotypiques de ce chromosome. L'étude de Tiepolo et al. en 1976 qui montrait la présence de délétions macroscopiques au niveau du bras long du chromosome Y chez des hommes atteints d'azoospermie non obstructive [88] a été déterminante dans le déclenchement de la recherche des microdélétions du chromosome Y puisqu'elle a permis de poser l'hypothèse de l'existence d'une région indispensable à la spermatogenèse appelée AZF (Azoospermia Factor). Suite à cette publication et grâce à la mise au point de marqueurs génomiques du chromosome Y de nombreux travaux ont été menés afin de découvrir le ou les gènes contenus dans cette région, gènes ayant potentiellement un rôle dans le contrôle de la

spermatogénèse et pouvant donc éventuellement entraîner une infertilité chez des hommes par ailleurs normaux. Suite à l'étude de Vogt et al. il a été admis qu'il n'y avait pas une mais trois régions dites AZF [89] sur le bras long du chromosome Y dans la région Yq11. L'hypothèse d'une quatrième région AZFd a été évoquée [90] mais il est communément admis à l'heure actuelle que cette région n'existe pas [91]. La réalisation de la cartographie du chromosome Y ainsi que le grand nombre d'étude effectuées sur des séries d'hommes infertiles dans des régions très variables du globe ont permis de cerner l'implication des différentes régions dans les différents phénotypes d'infertilité :

AZFa est moins souvent délétée que les deux autres régions AZF. [92] [19] [93] [89] [94] [95]. Les délétions complètes d'AZFa seraient associées à un syndrome de « Sertoli Cell Only type I » (SCO) avec absence totale de cellules germinales [72, 77, 89, 96]. Les délétions partielles ne concernant que *USP9Y* ou *DBY* seraient, elles, associées à des phénotypes testiculaires variés [13, 97]. La délétion de *USP9Y* seule entraînerait un arrêt de maturation avec présence de quelques spermatozoïdes matures [92]. La présence de délétions de *USP9Y* et *DBY* donnerait un phénotype plus grave. *DBY* semble être plus souvent touché que *USP9Y* [15]. Certains auteurs montrent que plus la délétion est large, plus les chances d'atteintes sévères de la spermatogénèse sont élevées et plus les chances de retrouver des spermatozoïdes intra-testiculaires sont faibles [98]. Cela pose la question d'un phénomène multigénique (disparition de plusieurs gènes dans la délétion, interactions interrompues entre un gène présent et un gène délété) pour expliquer l'infertilité.

Les délétions de la région AZFb ainsi que les délétions concernant AZFbc semblent à l'heure actuelle être responsables d'une absence totale de spermatozoïdes dans les testicules [89] [99].

AZFc est plus souvent délétée que les deux autres régions AZF. Les phénotypes obtenus sont très divers allant d'une oligospermie plus ou moins sévère à l'azoospermie. *DAZ*, gène principal de la région AZFc, possède des homologues dans plusieurs autres espèces Boule chez la drosophile, *Dazl* chez la souris, *Xdazl* chez la grenouille et *daz-1* chez le vers. Chez toutes ces espèces le gène n'est présent qu'en une seule copie sur un autosome et possède un rôle dans la

spermatogénèse. L'implication de la famille de gènes *DAZ* dans la spermatogénèse a été mise en évidence par les expériences réalisées par l'équipe de Slee sur des souris transgéniques *Dazl*^{-/-}, souris présentant une déplétion sévère en cellules germinales et un arrêt de la méiose [100] : L'introduction du gène *DAZ* humain chez des embryons de ces souris *Dazl*^{-/-} montre une augmentation prononcée du nombre de cellules germinales et la survie des spermatogonies jusqu'au stade pachytène [101]. Il semblerait que plus le nombre de copies délétées de *DAZ* est grand, plus l'oligospermie est sévère (effet dosage) [102], [103] (Le nombre de copies de *DAZ* présentes au niveau du génome serait évaluable par la technique de spermHALO-FISH [104] utilisant la fluorescence *in situ* sur l'ADN des noyaux de spermatozoïdes décondensés). Ce rapport entre le nombre de copies de *DAZ* présentes et le phénotype d'infertilité plus ou moins grave n'est pas systématiquement valable. En effet, l'étude d'un cas de transmission familiale montre sept membres d'une même famille atteints de la même délétion touchant le nombre de copies de *DAZ* : quatre sont infertiles et présentent une spermatogénèse très perturbée, trois sont fertiles et normospermiques. Une étude portant sur les biopsies testiculaires de 17 patients porteurs d'une délétion d'*AZFc* montre que le phénotype observé est très variable mais ne semble pas altérer les fonctions des cellules de Sertoli [105]. Les cas de délétions portant sur *AZFa* et *AZFc* chez un même homme ont pour l'instant toujours été associés à une absence totale de spermatozoïdes [106] (cf. figure n° 22)

Le microsatellite *Yfm1*, très proche des gènes *DAZ*, est également délété chez certains patients azoospermes et oligospermes. Quatre classes ont été créées en fonction du nombre de copies de *Yfm1* : A, A*, B et C. A et A* sont les deux classes pour lesquelles le nombre de copies est le plus faible. Une autre classification utilise *Yfm1* ainsi que trois autres marqueurs (*SRY*, *DXYS5Y* et *YAP*) : elle permet de définir neuf haplotypes. L'haplotype II est caractérisé par les insertions *YAP* et une association constante aux classes A et A*. Il a des résultats de spermogrammes moins bons que la moyenne et présente une proportion plus élevée d'hommes azoospermes et oligospermes. Les classes A et A* seraient apparemment associées aux délétions des gènes *DAZ* expliquant ainsi leur association aux phénotypes d'infertilité ou d'hypofertilité. Ce marqueur pourrait donc être utile dans le diagnostic biologique des patients azoospermes et oligospermes. [44]

En 1999, Sun et al. mettaient en évidence, grâce au séquençage systématique de la région AZFa sur un groupe de 576 patients infertiles, la mutation *de novo* du gène USP9Y chez un patient azoosperme avec un arrêt de la spermatogenèse clairement démontré sur coupe histologique testiculaire [92]. Cette délétion de 4 bp entraînait la perte d'intégrité d'un exon et la production d'une protéine tronquée. C'est à ce jour la seule relation clairement établie entre la mutation d'un gène des régions AZF et une anomalie phénotypique entraînant une azoospermie.

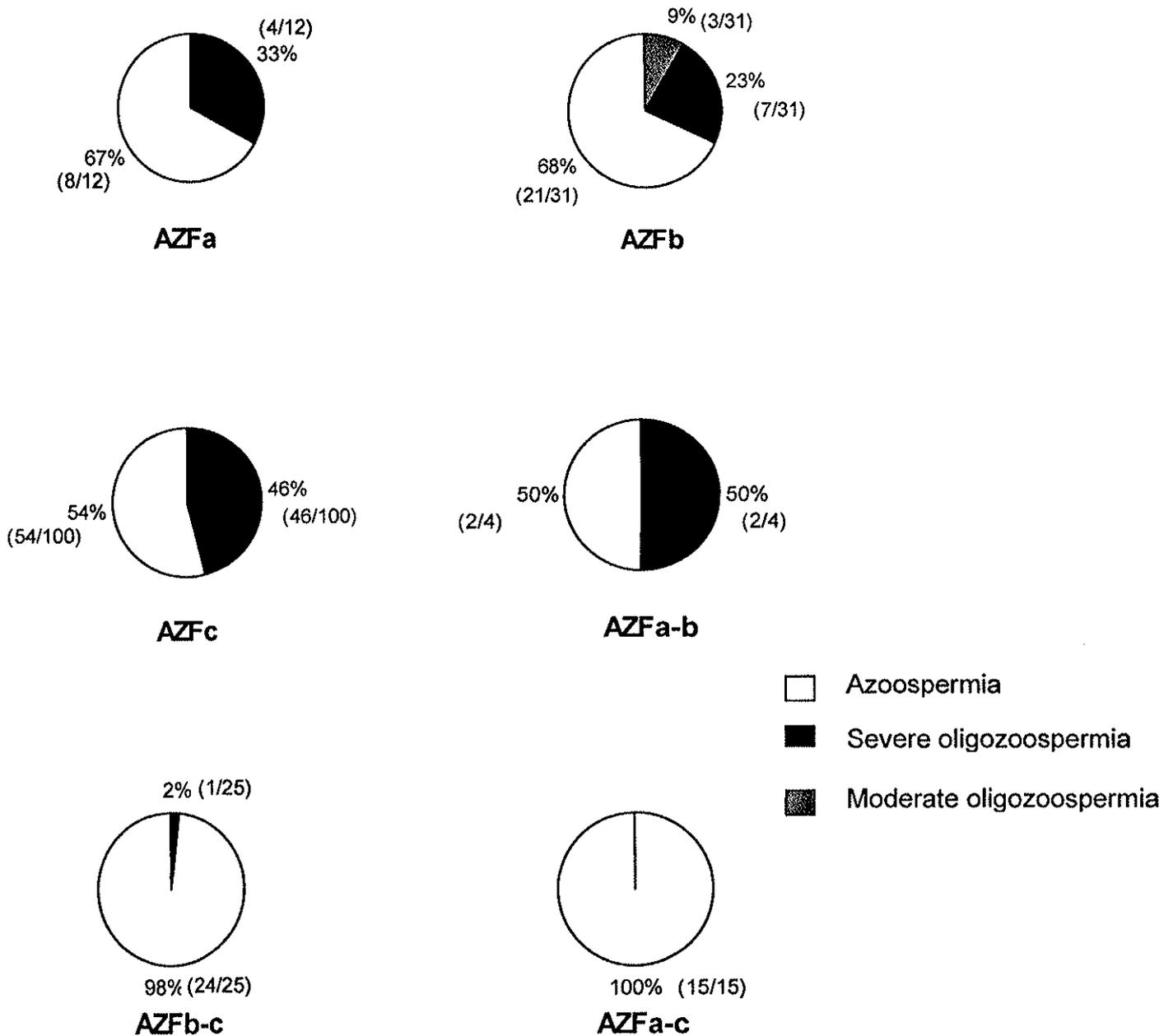
L'étude des microdélétions ne permet donc pas de prédire de façon stricte devant un patient infertile la probabilité de réussite d'un TESE (Testis Sperm Extraction) et d'une ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) [106] cependant il semble possible de conclure, au vu des résultats généraux, que les patients atteints d'une délétion complète d'AZFa et/ou AZFb ne présentent pas de spermatozoïdes matures au niveau testiculaire. Dans ces cas, la pratique d'une TESE est inutile. Pour les cas de délétions partielles avec présence de quelques spermatozoïdes matures, les délétions d'AZFa et AZFb pourraient être compatibles avec un résultat d'ICSI positif [107]. Dans les cas de délétions d'AZFc, il y aurait de forte chance d'obtenir des spermatozoïdes par TESE et donc la possibilité de tenter une ICSI [72, 108-113] avec des résultats comparables à ceux de patients sans délétions [114]. Une étude réalisée sur le niveau de transcription des gènes USP9Y, DBY, RBMY1 et DAZ chez des hommes infertiles montre qu'il existe une relation statistique entre l'atteinte de la spermatogenèse et le niveau transcriptionnel de DAZ et RBMY1. Ce paramètre pourrait permettre de prédire les chances de succès d'une TESE [115]. Cette étude a également été réalisée sur des biopsies testiculaires d'hommes azoospermes : Les gènes RBMY et DAZ montrent également des niveaux d'expression abaissés voire nuls [116].

Une étude récente portant sur le comportement des chromosomes sexuels d'hommes porteurs de délétions de Yq11 lors de la méiose montre que la formation du dimère entre les chromosomes X et Y n'est pas altérée si la délétion touche AZFc seule mais qu'elle est affectée dans les cas de délétions AZFbc [117].

Les conséquences des microdélétions du chromosome Y portent donc sur la spermatogenèse. Il semblerait au contraire qu'elles n'entraînent pas d'altération de la

fertilisation de l'ovule par le spermatozoïde ni d'altération du développement de l'embryon [74] [118] et que les résultats d'ICSI réalisées chez des couples dans lesquels l'homme est azoo/oligosperme avec microdélétions du chromosome Y sont comparables à ceux réalisés chez des couples sans anomalies détectées [119] [114].

Figure n°22 : schémas de distribution des délétions (complètes et partielles) des régions AZF en fonction du phénotype : calculs basés sur 20 études réalisées entre 1995 et 1999 [106]



C/ Epidémiologie

Etude des données publiées jusqu'à ce jour :

L'incidence des délétions varie beaucoup d'une étude à l'autre du fait des différences entre les populations étudiées (proportion d'azoospermes et d'oligospermes plus ou moins sévères) et les techniques utilisées (choix des amorces). Les calculs effectués sur ces études donnent (cf. tableaux à suivre) :

Sur 4862 sujets infertiles étudiés dans ces diverses études 2169 étaient azoospermes, 1286 oligospermes sévères (numération < 5 M/ml), 1208 oligospermes (numération < 20 M/ml) et 199 normospermes. Des délétions du chromosome Y ont été retrouvées chez 222 azoospermes soit 10,2%, 122 oligospermes sévères soit 9,5%, 52 oligospermes soit 4,3% et 2 normospermes soit 1%.

La répartition des délétions entre les différentes régions AZF a pu être étudiée sur 5756 cas d'infertilité : 394 cas de délétions ont été relevés dont 18 AZFa (4,5%), 55 AZFb (14%), 244 AZFc (62%), 11 AZFab (2,8%), 39 AZFbc (9,9%) 26 AZFabc (6,6%) et 1 AZFac (0,2%).

D'après l'institut de médecine reproductive de Münster, les délétions d'AZFc seraient les plus fréquentes (79%), suivies par les délétions d'AZFb (9%), d'AZFbc (6%) puis AZFa (3%) et AZFabc (3%) valeurs qui concordent avec celles que nous avons retrouvées (pour plus de détails sur les chiffres cf. tableau n°3).

L'étude du tableau n°2 montre que des délétions du chromosome Y peuvent être retrouvées chez des patients infertiles présentant par ailleurs une pathologie fortement impliquée dans l'infertilité comme un varicocèle, une cryptorchidie ou une cause obstructive cependant aucune de ces études n'a pu montrer une relation quelconque entre les microdélétions du chromosome Y et les pathologies citées.

D'après Quintana-Murci [120], la fréquence des délétions du chromosome Y dans la population mâle infertile serait de 0,06% (2% d'hommes infertiles dans la population générale dont 60 % ont une infertilité idiopathique. 5% de ceux-ci ont des microdélétions). Néanmoins, il est plus communément admis qu'un homme sur 6000 porterait une délétion du chromosome Y entraînant une infertilité . C'est une des fréquences les plus élevées en génétique humaine.

A ce jour, aucune relation n'a pu être établie entre la fréquence des délétions et l'origine ethnique du sujet.

L'âge de début de l'altération de la spermatogenèse dépend du phénotype mais dans certains cas on note une aggravation avec l'âge [96].

On ne connaît pas encore l'influence éventuelle de l'environnement sur ces pathologies.

Tableau n°2 : Etude comparative hommes avec infertilité idiopathique versus hommes fertiles

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de délétions
		A	O	Autres		
R.Reijo 1995 [1]	83	89			90 fertiles	12 A
L.Stuppia 1996 [2]	13	19	14		10 fertiles 5 femmes	4 A 2 O
Y.Nakahori 1996 [3]	15 dans interv.6 8 ailleurs	135	18 < 7 M/ml			20
R.Reijo 1996 [4]	118		35 OS			2 OS
PH.Vogt 1996 [5]	76	370 ?			200	7A et 6O
Qureshi 1996 [6]	23	51	47	2 N	80 fertiles	8
Kent-First 1996 [7]	85	3	19	10 N	200	20 et 1N
SK.Girardi 1997 [8]	35	108	20 < 1 M/ml 12 < 5 M/ml 10 < 20 M/ml	10 N	6 fertiles 2 femmes	7A, 2 <1 et 1 <5 M/ml

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de délétions
		A	O	Autres		
Van Der Ven 1997 [9]	30	13	158 < 20 M : ml	33 > 20 M/ml + As ou T	50	20
JL.Pryor 1997 [10]	85	26	30 OS 42 O	102 N	200	6A, 3OS, 4O et 1N. 4 témoins
L.Stuppia 1997 [11]	27		50 < 20 M/ml		10	70
M.Simoni 1997 [12]	SY84, sY143, sY254, sY255	74	62 < 1 M/ml 32 < 5 M/ml		86 fertiles	5
JP.Mulhall 1997 [13]	DAZ	83				6A
C.foresta 1997 [14]	15	16	22		10	6A et 5O
Kremer 1997 [15]	8	19	111	34 N	100 fertiles	70
Oiiva 1998 [16]	SY84, sY143, sY254 + 12 STS si délétion	50	136			8 A et 2 O

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de délétions
		A	O	Autres		
L.Stuppia 1998 [17]	27	58	68 < 20 M/ml		20 dont 7 pères de patients	6A et 10O 1 père soit 5%
Grimaldi 1998 [18]	18 STS + SRY	60	7 < 1 M/ml			4A et 10S
J.Fagerli 1999 [19]	17	4	10	24 N tous crypto opérée	3O 9N tous fertiles	0%
MC.Martinez 2000 [20]	9	57	71 < 2 M/ml			8A et 10S
Cram 2000 [21]	17 STS + BPY1, XKRY, RBM1, BPY2, DAZ			86 homme 99 fils par ICSI		7%
Le Bourhis 2000 [22]	10 STS + SRY et DAZ	95	86 < 3 M/ml	163 retenus		2A et 7O
Lin 2000 [23]	27	94				11 A
Moro 2000 [24]			40 < 5 M/ml 80 10 à 20 M/ml			7 OS

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de délétions
		A	O	Autres		
Osterlund 2000 [25]	13	139	53 < 5 M/ml			4 A
Yao 2001[26]	18	50	16	13 OS 210		3A, 1OS et 4O
Krausz 2001 [27]	14 STS + 6 gènes	27	74 < 5 M/ml 25 < 20 M/ml	12 > 20 M/ml	100 fertiles 107 militaires	6A et 3OS
Tzschach 2001 [28]		33	64 < 5 M/ml			0%
JY.Tse 2002 [29]	(HK : Hong Kong S : Shangai	61 HK 100 S		139 HK 154 S		5A HK / 6A S 5OS HK / 0 OS S
YM.Lin 2002 [30]	DFFRY, DBY, DAZ, RBM1, CDY1, BPY2 et 24 STS	120	60 OS		100	14A 5OS
SR.Babu 2002 [31]	SY84, sY127, sY254	10	10		10	1A et 2O
Peterlin 2002 [32]	42 STS + 16 gènes	92		134 OAT	125 fertiles	8 A et 2 OAT
Shimizu 2002 [33]	16	29				3 A

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de déletions
		A	O	Autres		
Bor 2002 [34]	25			400 phéno inconnu		2% A 0,6% O
Fu 2002 [35]	SY84, sY143, sY254 et USP9Y	73	28 OS		60 fertiles	9 A et 4 OS
Ioulianos 2002 [36]	16	32	48 < 2 M/ml		50 fertiles	4A
Krausz 2001 [27]	14 STS + 6 gènes	27	74 < 5 M/ml 25 < 20 M/ml	12 > 20 M/ml	100 fertiles 107 militaires	6A et 3OS
Dada 2003 [37]	SY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255			83	25 fertiles	7A et 1O
Quilter 2003 [38]	12	40	27 < 5 M/ml 20 5 à 20 M/ml	16 As		3A
Gruber 2003 [39]	18	33	145 OS			0%
El Awadi 2004 [40]	11 + SRY	20	13			3A et 1O

Auteur / année	Amorces utilisées	Population infertile étudiée			Population témoin	Résultats : Présence de délétions
		A	O	Autres		
Sargin 2004 [41]		47	13			2
Krausz 2001 [27]	14 STS + 6 gènes	27	74 < 5 M/ml 25 < 20 M/ml	12 > 20 M/ml	100 fertiles 107 militaires	6A et 3OS
Dada 2003 [37]	SY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255			83	25 fertiles	7A et 1O
Quilter 2003 [38]	12	40	27 < 5 M/ml 20 5 à 20 M/ml	16 As		3A
Gruber 2003 [39]	18	33	145 OS			0%
El Awadi 2004 [40]	11 + SRY	20	13			3A et 1O
Sargin 2004 [41]		47	13			2

→ Tableau n°3 : Etudes comparatives entre les infertilités idiopathiques et les infertilités associées à une pathologie pouvant en être la cause :

Auteur/année	Population avec infertilité idiopathique	Population avec infertilité autre	Marqueurs utilisés	Résultats
H.Najmabadi 1996 [42]	50A 10 O	16 fertiles 15 pathologies du X	26	10 A + 1 O aucun témoin
M.Vereb 1997 [43]	43A 28 < 1 M/ml 87 < 20 M/ml	9 abs. Déférents 1 mâle XX 55 pères	DAZ et SRY	5A
C.Foresta 1999 [44]	1/ 40 < 5 M/ml avec cryptorchidie 2/ 20 10 à 20M/ml avec cryptorchidie 3/ 110 < 5 M/ml idiopathiques 4/ 20 10 à 20M/ml idiopathiques	5/ 50 < 5 M/ml avec cause connue autre 6/ 100 N fertiles	31	1 : 27,5% 3 : 25,4% 2, 4, 5 et 6 : 0%
J.Fagerli 1999 [19]	4 A 10 O 24 N tous crypto opérée	3O 9N tous fertiles	17	0 %
Krausz 1999 [45]	1/ 46 A idiopathiques 2/ 85 A avec cause connue	50	21 + SRY	1/ 9 soit 19% 2/ 5 sur 72 soit 7%

Auteur/année	Population avec infertilité idiopathique	Population avec infertilité autre	Marqueurs utilisés	Résultats
A. Ferlin 1999 [46]	1/ 55 A SCO 2/ 85 < 5 M/ml 3/ 20 < 10 M/ml 4/ 20 < 20 M/ml	5/ 50 < 20 M/ml avec causes connues 6/ 30 A obstructives 7/ 100 N	38	1/ 34,5% 2/ 24,7% autres : 0%
Tse 2000 [47]	14 A obstructives 35 A non obstructive 9 < 1 M/ml	46	SY84, sY86, sY127, sY132, sY254, sY255	3A non obstr. 1A obstr.
Van Landuyt 2000 [48]	7A idiopathiques 29C idiopathiques 4C + varicocèle 17C + cryptorchidie 50 O idiopathiques 21 O origine connue	1 homme fertile et 1 femme pour chaque PCR	27	4 2 2 0 1 0
A.Friel 2001 [49]	39 A 7 < 20 M/ml 10 < 20 + As	50N 11 obstructions 2 pb hormonaux 8 mutation ΔF508 1 infertilité secondaire	20	2A

Auteur/année	Population avec infertilité idiopathique	Population avec infertilité autre	Marqueurs utilisés	Résultats
Fujisawa 2001 [50]	33 SCO 10 arrêts de maturation 11 hyospermato.		28	9 3 2
Kato 2001 [51]	24 A fonctionnelles 20 A obstructives 33 < 0,1 M/ml 30 < 1 M/ml 50 < 10 M/ml	30 fertiles > 20 M/ml		1 1 5 4 1
Maurer 2001 [52]	228 dont : 89 A non obstruct. 139 avec FSH haute		SY254, sY84, sY143, sY147, sY149, sY130	19 dont 13A et 6 O
Kunej 2003	36A 350 19N Tous cryptorchides		41 STS + 16 gènes	2A
Rao 2004 [53]	57 varicocèles dont : 5A, 15OS, 120 et 25 OAT 194 idiopathiques : 99A, 26OS, 37O et 32OAT		18	5,26% dont 1A, 1OS et 1O 3,6% dont 4A, 2O et 1OAT

Liste des abréviations utilisées dans les tableaux n°2 et 3

A = azoosperme

O = oligosperme

OS = oligospermes sévère

C = cryptospermie

T = tératospermie

As = asthénospermie

Population étudiée	Délétions par catégories cliniques						Nombre de cas délétés sur							
	Azoosperme		Oligosperme sévère		Oligosperme		Normosperme		AZFa	AZFb	AZFc	AZFa+b	AZFb+c	AZFa+b+c
30	1/3	2/27												
46	2/39		0/7					1	1					
33	4/19	2/14												
38	0/4		0/10	0/24										
153	17/135	3/18						2		16	2			
60	10/50		1/10					3	1	12		2		1
180	14/120	5/60							1	4		4		
128	8/57	1/71						1	4	2	1			
200	6/26	3/30	4/42	1/102				1	4	2	1			
158	7/106	3/32	0/10	0/10					3	4		2		1
20	1/10		2/10						1	2				
164	0/19		7/111	0/34						7				
67	4/60	1/7						1		4				
33	3/20		1/13					2	1	3				
194	5/104	1/41	3/49											
181	2/95	7/86							3	6				
44	3/35	1/9								4				
83	7		1						1	4	3			
1470	13		6					1	2	15			1	
89	12/89									9			2	1
186	8/50		2/136							9			1	
228	13/		6/					1	2	15			1	
50	3/16	1/13	4/21							8				
35		2/35								2				
32	0/3		2/19	1/10					2				1	
158	5/43	0/28	0/87							5				
50		7/50								7				
38	6/16		5/22						1	6			3	
126	6/58		10/68						3	11			2	
150		39/150						2	9	15	1		4	8

180	19/55	21/85	0/40		2	5	17	3	2	10
131	14/131				1	7	6			
181	2/95	7/86				3	6			
94	11/94					1	8		2	
120		7/40	0/80			1	5	1		
192	4/139	0/53							4	
126	6/27	3/74	0/25				9			
20	1/10		2/10			1	2			
226	8/92		2/134		1		5		2	2
29	3/29						3			
101	9/73	4/28					12		1	
80	4/32	0/48				1	1		2	
90	2/36		0/35	0/19			1			1
30	1/3		2/27				1			
87	3/40	0/27	0/20			1			2	2
33	4/19		2/14		18	55	244	11	39	26
171	0/13		2/158							
150	4/71	2/29	1/50							
178	0/33	0/145								

4862 222/2169 122/1268 52/1208 2/199
10,2% 9,5% 4,3% 1%

Tableau n°3 : reprise des études mentionnées dans les tableaux n°1 et n°2
Les lignes en rouge n'ont pas été incluses dans le calcul de la fréquence de microdélétions de chaque région AZF.
Les lignes en vert n'ont pas été incluses dans le calcul de la fréquence des différents phénotypes d'infertilité.

1. Reijo, R., et al., *Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene*. Nat Genet, 1995. **10**(4): p. 383-93.
2. Stuppia, L., et al., *Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia*. Cytogenet Cell Genet, 1996. **72**(2-3): p. 155-8.
3. Nakahori, Y., et al., *The Y chromosome region essential for spermatogenesis*. Horm Res, 1996. **46 Suppl 1**: p. 20-3.
4. Reijo, R., et al., *Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome*. Lancet, 1996. **347**(9011): p. 1290-3.
5. Vogt, P.H., et al., *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 933-43.
6. Qureshi, S.J., et al., *Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(10): p. 775-9.
7. Kent-First, M.G., et al., *The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(12): p. 943-50.
8. Girardi, S.K., A. Mielnik, and P.N. Schlegel, *Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men*. Hum Reprod, 1997. **12**(8): p. 1635-41.
9. van der Ven, K., et al., *Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(8): p. 699-704.
10. Pryor, J.L., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med, 1997. **336**(8): p. 534-9.
11. Stuppia, L., et al., *Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existence of an oligozoospermia critical region outside the DAZ gene*. J Med Genet, 1997. **34**(11): p. 881-3.
12. Simoni, M., et al., *Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia*. Fertil Steril, 1997. **67**(3): p. 542-7.
13. Mulhall, J.P., et al., *Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1997. **12**(3): p. 503-8.
14. Foresta, C., et al., *Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(4): p. 1075-80.
15. Kremer, J.A., et al., *Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic*. Hum Reprod, 1997. **12**(4): p. 687-91.

16. Oliva, R., et al., *Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1998. **70**(3): p. 506-10.
17. Stuppia, L., et al., *A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11*. Hum Genet, 1998. **102**(5): p. 566-70.
18. Grimaldi, P., et al., *Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(12): p. 1116-21.
19. Fagerli, J., et al., *Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azoospermia or oligospermia*. Fertil Steril, 1999. **71**(4): p. 697-700.
20. Martinez, M.C., et al., *Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients*. J Androl, 2000. **21**(5): p. 651-5.
21. Cram, D.S., et al., *Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions*. Fertil Steril, 2000. **74**(5): p. 909-15.
22. Le Bourhis, C., et al., *Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(8): p. 688-93.
23. Lin, Y.M., et al., *Y-chromosome microdeletion and its effect on reproductive decisions in taiwanese patients presenting with nonobstructive azoospermia*. Urology, 2000. **56**(6): p. 1041-6.
24. Moro, E., et al., *Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **161**(1-2): p. 67-71.
25. Osterlund, C., et al., *Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre*. Int J Androl, 2000. **23**(4): p. 225-9.
26. Yao, G., G. Chen, and T. Pan, *Study of microdeletions in the Y chromosome of infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(11): p. 612-6.
27. Krausz, C., et al., *Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2638-42.
28. Tzschach, A., et al., *Absence of Yq microdeletions in infertile men*. Arch Androl, 2001. **47**(3): p. 167-71.
29. Tse, J.Y., et al., *A comparative study of Y chromosome microdeletions in infertile males from two Chinese populations*. J Assist Reprod Genet, 2002. **19**(8): p. 376-83.
30. Lin, Y.M., et al., *Gene-based screening for Y chromosome deletions in Taiwanese men presenting with spermatogenic failure*. Fertil Steril, 2002. **77**(5): p. 897-903.
31. Babu, S.R., et al., *PCR analysis of Yq microdeletions in infertile males, a study from South India*. Asian J Androl, 2002. **4**(4): p. 265-8.
32. Peterlin, B., et al., *Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men*. Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 17-24.
33. Shimizu, A., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of patients with idiopathic azoospermia*. Asian J Androl, 2002. **4**(2): p. 111-5.
34. Bor, P., et al., *Y-chromosome microdeletions and cytogenetic findings in unselected ICSI candidates at a Danish fertility clinic*. J Assist Reprod Genet, 2002. **19**(5): p. 224-31.

35. Fu, J., L. Li, and G. Lu, *Relationship between microdeletion on Y chromosome and patients with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia in the Chinese*. Chin Med J (Engl), 2002. **115**(1): p. 72-5.
36. Ioulianos, A., et al., *A nation-based population screening for azoospermia factor deletions in Greek-Cypriot patients with severe spermatogenic failure and normal fertile controls, using a specific study and experimental design*. Int J Androl, 2002. **25**(3): p. 153-8.
37. Dada, R., N.P. Gupta, and K. Kucheria, *Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia*. J Biosci, 2003. **28**(2): p. 163-8.
38. Quilter, C.R., et al., *Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males*. Fertil Steril, 2003. **79**(2): p. 301-7.
39. Gruber, C.J., et al., *Absence of microdeletions in the azoospermia-factor region of the Y-chromosome in Viennese men seeking assisted reproduction*. Wien Klin Wochenschr, 2003. **115**(23): p. 831-4.
40. El Awady, M.K., et al., *Molecular study on Y chromosome microdeletions in Egyptian males with idiopathic infertility*. Asian J Androl, 2004. **6**(1): p. 53-7.
41. Sargin, C.F., et al., *AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey*. Ann Genet, 2004. **47**(1): p. 61-8.
42. Najmabadi, H., et al., *Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(4): p. 1347-52.
43. Vereb, M., et al., *Absence of DAZ gene mutations in cases of non-obstructed azoospermia*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(1): p. 55-9.
44. Foresta, C., et al., *Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3660-5.
45. Krausz, C., et al., *Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(7): p. 1717-21.
46. Ferlin, A., et al., *Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY*. Hum Reprod, 1999. **14**(7): p. 1710-6.
47. Tse, J.Y., et al., *Deletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in Hong Kong Chinese men with severe male-factor infertility: controlled clinical study*. Hong Kong Med J, 2000. **6**(2): p. 143-6.
48. Van Landuyt, L., *Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population*. Molecular Human Reproduction, 2000. **6**(4): p. 291-297.
49. Friel, A., et al., *Molecular detection of Y chromosome microdeletions: an Irish study*. Int J Androl, 2001. **24**(1): p. 31-6.
50. Fujisawa, M., et al., *Y-chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia*. Fertil Steril, 2001. **76**(3): p. 491-5.
51. Kato, H., et al., *Screening for deletions in interval D16-22 of the Y chromosome in azoospermic and oligozoospermic Japanese men*. J Hum Genet, 2001. **46**(3): p. 110-4.

52. Maurer, B., et al., *Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience*. *Andrologia*, 2001. **33**(1): p. 27-33.
53. Rao, L., et al., *Chromosomal abnormalities and y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele and idiopathic infertility of South Indian origin*. *J Androl*, 2004. **25**(1): p. 147-53.

IV/ Conclusion : diagnostic d'une infertilité masculine

L'infertilité d'un couple se définit par l'absence de grossesse après 12 mois de rapports non protégés. En France, elle concernerait 20% des couples (15% hypofertiles et 5% stériles).

L'homme est seul en cause dans environ 20% des cas et les deux partenaires sont « incriminés » dans 40% des cas. Au total, l'homme est au moins partiellement en cause dans 60% des cas [67]

Le diagnostic d'une infertilité masculine comprend plusieurs séries d'examens cliniques et biologiques.

→ Diagnostic clinique

Interrogatoire :

- Antécédents personnels : infections uro-génitales, ectopies testiculaires, cryptorchidie, chirurgie inguinale...
- Habitudes sexuelles : fréquence des rapports, troubles de l'érection ou de l'éjaculation
- Existence d'une pathologie et/ou d'un traitement en cours
- Un épisode fébrile dans les trois mois précédents l'examen de sperme
- Facteurs de risque professionnels et exposition à des toxiques (notamment alcool , tabac et cannabis) et/ou à la chaleur
- La partenaire : âge, antécédents gynécologiques ...
- Durée d'infertilité (période pendant laquelle le couple a eu des rapports non protégés), existence d'une fertilité antérieure d'un des partenaire.

Examen clinique :

- Organes génitaux externes : taille et consistance des testicules, aspect des épидидymes, présence des déférents, présence d'un varicocèle, présence d'un hypospadias, taille du pénis, température scrotale.

- Toucher rectal (non systématique) : aspect de la prostate, présence de kystes.
- Imprégnation androgénique : aspect androïde ou gynoïde, pilosité, masse musculaire, gynécomastie, libido, qualité de l'érection.
- Perte olfactive (syndrome de Kallman-De Morsier), retard intellectuel.

→ Examens complémentaires :

■ Explorations échographiques et radiologiques

On peut être amené à pratiquer une radiologie de l'hypophyse, des échographies scrotales ou endorectales, un doppler vasculaire voire un IRM.

■ Les examens sanguins :

→ Le bilan hormonal FSH et inhibine, LH, testostérone et estradiol si signes d'hypoandrogénie, prolactine si impuissance.

→ Le caryotype : Il permet de rechercher les anomalies chromosomiques visibles en cytogénétique conventionnelle.

→ Les sérologies infectieuses : syphilis et chlamydia ainsi que VIH, VHB, VHC, HTLV.

→ Les analyses géniques : en cas d'agénésie congénitale des déférents, on recherche les mutations du gène CFTR.

→ La recherche des microdélétions du chromosome Y : Cette recherche est effectuée par la technique de PCR. La technique sera décrite dans le chapitre suivant.

Comme toute recherche concernant le génome humain (y compris le caryotype), elle est encadrée par le décret 2000-570 du 23 juin 2000 et l'arrêté du 2 mai 2001. La législation prévoit notamment que :

- L'analyse des caractéristiques génétiques ne peut être réalisée comme un examen de routine.
- Avant le test, le sujet doit avoir compris la nature de l'examen, la signification des résultats et les conséquences éventuelles en terme de suivi ou de traitement.

- L'information doit être donnée par un médecin qui a des compétences en génétique médicale. Elle doit être directe et orale pour permettre un dialogue puis consignée sur un document écrit.
- Le sujet doit avoir donné spécifiquement son consentement écrit avant la réalisation du test. Une fois testé, il peut refuser de connaître ses résultats et son droit de ne pas savoir doit toujours être respecté.
- L'annonce des résultats doit être faite directement au sujet par un médecin (le médecin prescripteur) qui, par sa compétence, peut expliquer la signification des résultats.
- Le secret médical doit être respecté vis-à-vis des tiers, y compris les autres membres de la famille. Ces derniers ne doivent pas être sollicités directement par le médecin. Si un sujet refuse de faire connaître à sa famille le risque révélé par le test génétique qu'il a subi, le médecin est dans l'impossibilité de contacter les apparentés. Il doit informer le sujet testé de sa responsabilité et tout faire pour le convaincre d'informer ses proches.
- Sauf cas très particulier, celui d'un bénéfice médical individuel direct, les enfants mineurs ne doivent pas être testés.

■ Les analyses des prélèvements de sperme

→ Le spermogramme :

Cet examen est la base de la démarche diagnostic biologique de l'infertilité masculine.

Il est effectué de préférence au laboratoire. Le recueil se fait par masturbation, à distance d'un épisode fébrile ou d'une infection et après trois à cinq jours d'abstinence sexuelle.

Le spermogramme doit être pratiqué par un laboratoire compétent. Il doit être répété avant d'affirmer l'existence d'une anomalie. On notera :

Volume de l'éjaculat :

Normales de 1,6 à 6,5 ml

Inférieur à 1,6 ml : hypospermie

Supérieur à 6,5 ml : hyperspermie

PH de l'éjaculat :

Normales : 7 à 8,3

Inférieur à 7 : acidité

Supérieur à 8,3 : alcalinité

Numération des spermatozoïdes :

Normales > ou égal à 20 millions/ml

5 à 20 millions/ml : oligospermie modérée

Inférieur à 5 millions/ml : oligospermie sévère voire extrême (cryptospermie)

Mobilité des spermatozoïdes (mobiles rapides et lents) à une heure :

Normales : supérieure ou égale à 40 %

De 20 à 40 % : asthénospermie modérée

En dessous de 20 % : asthénospermie sévère

Si 100 % des spermatozoïdes sont immobiles avec une vitalité normale : akinétopermie

Mobilité à quatre heures :

Normalement : chute légère des pourcentages.

Vitalité des spermatozoïdes :

Normales : supérieure ou égale à 60 %

En dessous de 60 % : nécrospermie

Présence de cellules rondes :

Normales : inférieure à 10 % de la numération des spermatozoïdes

Si le pourcentage est supérieur à 10, faire la numération des polynucléaires. Elle est significative quand elle est supérieure à un million/ml.

Présence d'amas gélatineux, d'agglutinats, d'hématies.

→ Le spermocytogramme

Il permet l'étude de la morphologie des spermatozoïdes. Il est réalisé sur au moins 100 spermatozoïdes.

Normales : supérieure à 30 % de formes normales

De 15 à 30 % : tératospermie modérée

Inférieure ou égale à 15 % : tératospermie sévère.

On évalue également l'index d'anomalies multiples (nombre total d'anomalies/nombre de spermatozoïdes anormaux) :

Normales : inférieur ou égal à 1,6

De 1,6 à 1,9 : IAM augmenté

Au-delà de 1,9 : IAM très augmenté

→ Le test post-coïtal

Il permet d'étudier l'aptitude des spermatozoïdes à pénétrer et à survivre dans le mucus cervical dans des conditions physiologiques.

Il doit être réalisé en période pré-ovulatoire après trois à cinq jours d'abstinence. Le prélèvement de glaire est effectué six à douze heures après le rapport.

On étudie la présence des spermatozoïdes au niveau du cul-de-sac vaginal, le nombre et la mobilité des spermatozoïdes au niveau du col.

Le test est considéré comme positif si on a au moins six spermatozoïdes à mobilité progressive par champ (au x40).

Le test est dit déficient pour un à cinq spermatozoïdes par champ ou en cas de spermatozoïdes peu mobiles voire immobiles.

Le test est négatif en cas d'absence de spermatozoïdes dans le mucus cervical. S'ils sont également absents au niveau du cul-de-sac vaginal, il faut penser à une azoospermie ou à un problème lors du coït.

Pour un test négatif ou déficient, sont évoqués :

Une mauvaise programmation du test par rapport au cycle de la femme.

Un problème au niveau du sperme

Un problème au niveau de la glaire

Un problème immunologique

→ Le test de compatibilité in vitro sperme/glaire

Il est pratiqué en général à la suite d'un TPC négatif. Il permet d'étudier de façon plus détaillée les interactions entre sperme et glaire puisque sont mis en contact le sperme du patient et le sperme d'un témoin avec la glaire de la patiente et la glaire de deux femmes témoins comme suit :

1/ Glaire patiente + sperme patient

2/ Sperme patient + glaires témoins (deux glaires sont utilisées afin de pallier à la dégradation éventuelle de l'une d'elles)

3/ Glaire patiente + sperme témoin

On étudie quatre paramètres : la progression, la densité de pénétration, la capacité de pénétration et la survie à quatre heures des spermatozoïdes.

Il sera alors possible de conclure à une origine masculine du problème (1 et 2 négatifs), féminine (1 et 3 négatifs) ou mixte (1, 2 et 3 négatifs). Si les trois préparations donnent de bons résultats le test est non informatif.

→ Les dosages biochimiques

On dose :

Origine	Composé	Normes par éjaculât
Epididyme	L-carnitine	425 à 2000 nmol
	Glycérophosphocholine	1,9 à 13,6 µmol
	αglucosidase	34 à 165 mU
Canal déférent	Acylcarnitine	200 à 1500 nmol
Vésicules séminales	Fructose	16 à 105 µmol
	Choline	30 à 170 µmol
Prostate	Citrate	35 à 165 µmol
	Zinc	2,5 à 12,6 µmol

Les marqueurs ne sont pas spécifiques à 100 %. Les plus spécifiques sont le citrate et le fructose (98%).

Le délai d'abstinence doit être de trois à cinq jours. Pour une durée moindre les valeurs sont minorées, pour une durée plus longue, elles sont majorées.

→ La culture

On recherche la présence de pathogènes tels que Mycoplasma, Ureaplasma, Corynebacterium seminale, Escherichia coli, Proteus. La spermoculture est alors considérée comme positive pour plus de 10³ UFC/ml. Pour des saprophytes non pathogènes habituellement, la culture est considérée comme positive pour plus de 10⁵ UFC/ml.

→ Recherche d'une immunisation anti-spermatozoïdes

Ce test utilise des billes couvertes d'anticorps anti-immunoglobulines. Elles permettent de numérer les spermatozoïdes porteurs d'anticorps et de préciser le site de fixation de ces anticorps. Le test est positif si plus de 10% des spermatozoïdes sont porteurs d'anticorps et franchement pathologique au-dessus de 50%.

→ Analyse automatisée du mouvement des spermatozoïdes

Cet examen permet une analyse objective et rapide d'une centaine de trajectoires. On obtient ainsi le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, la vitesse linéaire et curvilinéaire, l'amplitude du débattement latéral de la tête ...

→ Autres tests : étude de la fonction acrosomique, étude de la maturité nucléaire par la coloration au bleu d'aniline, étude de la fragmentation de l'ADN (test TUNEL et COMET) ou de la chromatine (SCSA), microscopie électronique ... Ces tests ne sont pas utilisés en routine actuellement.

→ Interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats est complexe et intègre de nombreux paramètres. Une interprétation complète et fine de tous les paramètres étudiés n'est pas indiquées ici. Nous nous limiterons à l'étude des cas impliquant une recherche de délétions du chromosome Y (figure n°23).

Nous avons vu précédemment que l'incidence des délétions du chromosome Y était la plus élevée chez les hommes azoospermes et oligospermes sévères. Cette population est donc à risque et devrait alors être étudiée systématiquement pour ce paramètre même en cas de pathologies associées types varicocèle puisque les deux atteintes peuvent être concomitantes.

Dans le cas des hommes infertiles oligospermes « modérés » (entre 5 et 20 M/ml) voire normospermes l'indication de la recherche de microdélétions est à discuter au cas par cas. Elle ne semble pas indiquée cette fois-ci dans le cas de patients présentant une pathologie pouvant expliquer leur hypofertilité, mais peut être tentée dans les cas où aucune étiologie n'a pu être mise en évidence.

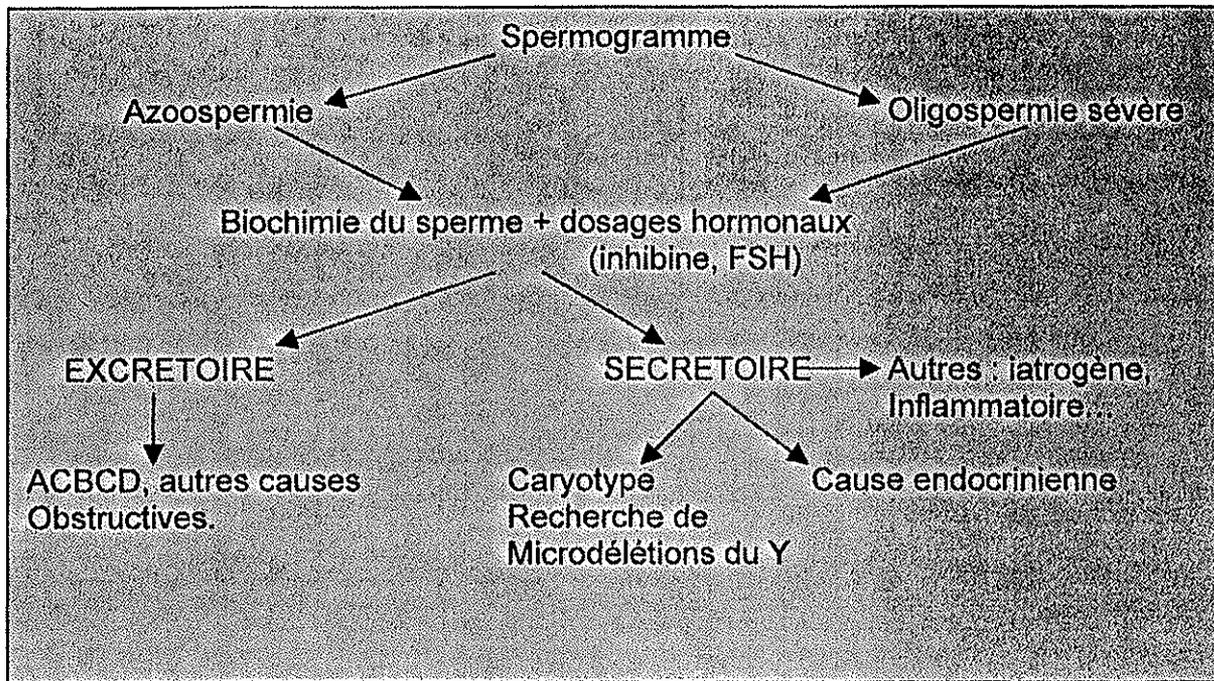


Figure n°23 : arbre décisionnel impliquant la recherche des délétions du chromosome Y

Les résultats de cette recherche vont avoir des implications multiples :

Intérêt étiologique

Le résultat de la recherche permettra parfois d'éviter un traitement inutile chirurgical ou médicamenteux voire des techniques de diagnostic invasives (biopsie testiculaire par exemple). Ainsi les patients azoospermes candidats pour une ICSI devraient pouvoir bénéficier d'une recherche de microdélétions puisque la pratique d'une extraction testiculaire n'est pas recommandée pour les patients porteurs de délétions complètes d'AZFa, AZFb ou AZFbc.

Intérêt pronostic

Les garçons nés de pères porteurs d'une délétion du chromosome Y seront eux-aussi porteurs de cette même délétion [72, 109-111, 121-123], sauf dans les cas apparemment beaucoup plus rares de mosaïques germinales [98]. Ils risquent d'être ou de devenir infertiles à leur tour. L'altération de la spermatogenèse entraînée par cette délétion pouvant être évolutive avec l'âge [124], ils devraient être pris en charge précocement (mais après la puberté) afin de prévoir une éventuelle cryoconservation de sperme à titre préventif [96].

Intérêt pour le conseil génétique

Pour cette même raison, devant tout couple en attente de FIV ou d'ICSI, il semble nécessaire de pratiquer une recherche de microdélétions du chromosome Y chez le père afin de pouvoir donner à ce couple un conseil adapté sur les résultats possibles de l'ICSI [113], sur les risques de transmission d'un Y délété à un enfant de sexe masculin ou, le chromosome Y pouvant disparaître au cours de la méiose, sur les risques de donner naissance à un enfant porteur du syndrome de Turner [75, 98, 125]. Il faut noter qu'à l'heure actuelle, 17 garçons et 18 filles seulement sont nés de pères porteurs d'une microdélétion du Y après ICSI. Ces enfants sont phénotypiquement normaux et aucun cas d'ambiguïté sexuelle ou de syndrome de Turner n'a été rapporté [72, 108-113]

A côté de l'aspect personnel du couple, pratiquer des schémas TESE + ICSI pour tous les hommes azoospermes ou oligospermes sévères aura pour conséquence une augmentation de la prévalence du phénotype d'infertilité dans la population masculine générale [126].

5/ INTERET DE LA PCR MULTIPLEX ET APPLICATION AU LABORATOIRE DU CECOS

I) La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de biologie moléculaire permettant l'obtention d'un très grand nombre de copies (plusieurs millions) d'une portion choisie d'ADN. Elle permet donc de travailler à partir d'une quantité infime d'acide nucléique.

A/ Principe

La PCR est basée sur la capacité des ADN polymérases à synthétiser un brin complémentaire à partir d'un ADN servant de matrice.

L'unité de base d'une réaction de PCR est le cycle de dénaturation-hybridation-élongation (figure n°24). La répétition de ce même cycle un nombre de fois donnée permettra l'obtention d'un fragment spécifique (car limité par des amorces choisies) en plusieurs millions de copies. A l'heure actuelle, cette réaction se fait dans un seul tube en quelques heures.

Une réaction de PCR nécessite :

- Un fragment d'ADN (génomique, plasmidique, complémentaire). Pour un meilleur résultat, il est bon de partir d'ADN correctement purifié (ni protéines ni ARN) ce qui diminue les amplifications parasites et permet un très bon rendement. Il est cependant possible d'obtenir une amplification correcte avec un ADN non purifié. La quantité d'ADN utilisée ne doit pas être trop importante (10 à 100 ng pour un volume réactionnel de 20 µl) car elle peut entraîner la formation de traces (smear) sur le gel d'électrophorèse.
- Deux amorces oligonucléotidiques (20 à 25 nucléotides) correspondant chacune à une des extrémités 3' des brins à amplifier. Leur température de dénaturation (Tm) doit être au moins 5°C au-dessus de la température

d'hybridation. Plus celle-ci est élevée, plus la réplication est spécifique. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des températures d'hybridation entre 55 et 70 °C et une concentration en amorce entre 0,1 et 0,2 μM. Plusieurs critères sont indispensables lors du choix d'un couple d'amorce :

- Leur séquence doit être exactement complémentaire du brin à amplifier sans misappariement.

- Les amorces ne doivent pas correspondre à des séquences génomiques répétées.

- La séquence ne doit pas permettre la formation de boucles ou d'hybrides sur l'amorce elle-même (auto-complémentarité) ou entre les deux amorces (complémentarité) ce qui peut entraîner la formation de produits de PCR non spécifiques comme les dimères d'amorces.

- La composition en bases doit être le plus équilibrée possible (GC% proche de 50%).

- Les températures de fusion des deux amorces doivent être suffisamment élevées (au minimum 55°C°) et pas trop différentes l'une de l'autre (5°C maximum).

- La partie 3' des amorces doit être instable c'est-à-dire avoir une entropie ΔG supérieure à -9 kcal/mol pour limiter le risque d'hybridations non spécifiques.

- Des désoxyribonucléotides libres « dNTP » (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) à une concentration comprise entre 20 et 200 μM, les concentrations de chacun étant équivalentes même si l'ADN à amplifier a une proportion de bases non équilibrée. Plus la concentration en dNTP est élevée, plus on a d'amplifications parasites et plus l'enzyme fait des erreurs de réplication. Ce taux d'erreur est également augmenté par une concentration déséquilibrée des quatre oligonucléotides.

- Une ADN polymérase thermorésistante comme la Taq polymérase. Pour 50 μl de réaction, il n'est pas nécessaire de mettre plus d'une unité d'enzyme. 0,2 à 0,5 unité est généralement suffisant. Une trop grande

quantité d'enzyme peut donner des bandes parasites voire une inhibition de la réaction. La Taq ADN polymérase est inhibée par l'hème, le DMSO, l'héparine, le SDS, le sarkosyl, le bleu de bromophénol, les DNAses, le phénol, les polyamines. Certains milieux biologiques contiennent des inhibiteurs dont on ne connaît pas la nature (urines, LCR, sperme).

- Du chlorure de magnésium nécessaire à la réaction de réplication ainsi que pour stabiliser les nucléotides. Cependant plus la concentration en chlorure de magnésium augmente, moins la fixation des amorces est spécifique. La concentration optimale ne peut donc être trouvée que par tâtonnements. Cette concentration doit être adaptée en fonction de la présence de chélateurs du magnésium comme l'EDTA (servant à inhiber les DNAses) et des dNTPs.
- Un tampon permettant l'obtention d'un pH et d'une force ionique donnés. Généralement on utilise du Tris-HCl à des concentrations entre 10 et 50 mM pour un pH entre 8,3 et 8,8. La température d'hybridation des acides nucléiques est fonction de la concentration en sels : plus la concentration augmente, plus l'hybridation est facile et plus l'hybride est stable. Cependant, une concentration plus élevée en sels entraîne également une inhibition de l'enzyme. Il faut donc trouver un compromis entre ces deux propriétés. En pratique, on utilise du KCl 50 mM.
- Autres composants possibles : on peut utiliser du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'empêcher la formation de structures secondaires tout en sachant que ce produit inhibe fortement la polymérase. Le formamide à faible concentration permet également de diminuer les amplifications parasites.

La réaction de PCR se décompose comme suit :

* Phase de dénaturation à 95°C : à cette température, les liaisons hydrogènes qui permettent la cohésion de la molécule d'ADN double brin sont détruites et les deux brins se séparent.

* Phase d'hybridation : la température d'hybridation est fonction de la longueur et de la composition en base des amorces. Elle varie en général entre 50 et 60°C. A cette température, les amorces vont se positionner en face de leurs séquences complémentaires respectives. A la fin de cette phase, chaque amorce est hybridée avec sa séquence complémentaire, une sur chaque brin en 3' de la partie à amplifier.

* Phase d'élongation : en principe, elle a lieu à 72°C. L'ADN polymérase amplifie chaque portion à partir des amorces dans le sens 5' vers 3'. On obtient ainsi une séquence exactement complémentaire du brin recopié. Cette enzyme étant thermostable, il n'est pas nécessaire d'en rajouter à chaque cycle.

A la fin du premier cycle, on obtient deux fragments d'ADN double-brin dont un des brins est limité par l'amorce. Au cycle suivant, après dénaturation, on obtiendra quatre matrices : les deux brins de départ ainsi que deux brins limités à une extrémité chacun par une des amorces. A la fin de ce cycle, on aura donc quatre molécules d'ADN double-brin : les deux même qu'à la fin du cycle précédent et deux molécules composées d'un brin de la longueur recherchée et d'un brin dit long (limité juste à une extrémité). Au fur et à mesure des cycles, les molécules d'ADN doubles brins correspondant à la cible vont augmenter de façon exponentielle (le nombre de matrice doublant à chaque cycle) alors que les molécules « hybrides » vont augmenter de façon linéaire et donc devenir quantité négligeable.

Différents automates permettent d'obtenir ces cycles de température avec une précision de 0,5 à 1 °C. Ils sont programmables et permettent d'obtenir une amplification complète du fragment d'intérêt en quelques heures.

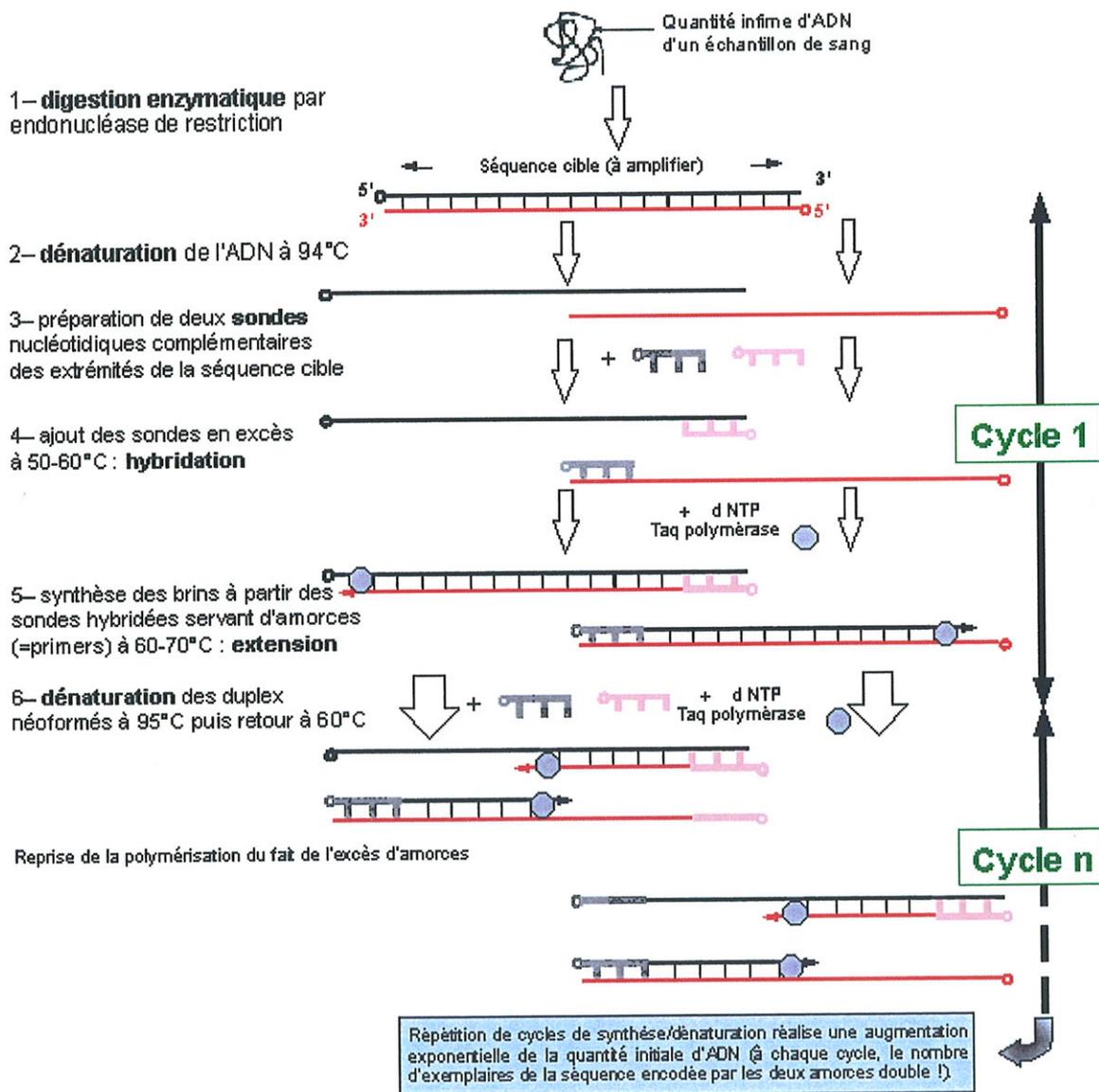


Figure n°24 : la théorie de la PCR d'après l'institut national de la recherche pédagogique

A la fin de chaque cycle, la quantité d'ADN est multiplié par deux (amplification exponentielle). En théorie, à la fin de la PCR, on obtient 2^n exemplaires du segment à amplifier. En pratique, le rendement de la PCR n'est pas de 100% mais de 70 à 80%. On obtient une quantité $Q_n = Q_0 \times 1,8^n$ (avec Q_n la quantité de matériel obtenu, Q_0 la quantité de matériel au départ, n le nombre de cycle et un rendement de 80%).

B/ Limites

La taille du fragment à amplifier est limitée (de 100 pb à 2 ou 3 Kb). L'amplification d'un fragment trop grand entraîne des interférences du type formation de structures secondaires, réappariement des fragments néosynthétisés entre eux En pratique, jusqu'à 1,5 kb l'amplification ne pose pas de problème. Pour des tailles supérieures, il faut chercher d'autres conditions expérimentales adaptées.

Les amorces sont obtenues par synthèse chimique. Il faut donc connaître la séquence de la région à amplifier ou tout au moins de ses bornes. Cet écueil est contournable grâce au clonage. On insère la portion inconnue dans un vecteur connu à une place donnée. On connaît ainsi les séquences flanquant le point d'insertion. Il est alors possible d'obtenir des amorces correspondant à ces séquences et d'amplifier une portion plus grande contenant la séquence inconnue.

Le nombre initial de copies de la cible peut être très faible en théorie. Dans la pratique, pour des quantités de départ très basses, mieux vaut faire deux PCR consécutives qu'augmenter le nombre de cycle.

Un nombre de cycle trop important conduit à un épuisement des produits (dNTP, amorces...), à l'apparition de sous-produits ayant un pouvoir inhibiteur (pyrophosphates), au risque d'apparition de bandes parasites, à la compétition entre amorces et fragments d'ADN amplifiés Le taux d'amplification diminue et le rendement devient médiocre.

C/ Les principaux problèmes rencontrés

① La contamination

L'ADN amplifié formant facilement des aérosols très dispersibles, les risques de contamination entre deux PCR sont très importants et conduisent à l'obtention de faux positifs. Ce problème est objectivé grâce à l'utilisation de blancs réactifs à chaque PCR (puits sans ADN). Pour essayer de minimiser ce problème, les laboratoires faisant de la biologie moléculaire sont équipés de plusieurs pièces séparées permettant de préparer l'amplification et de révéler les produits de cette amplification en des lieux différents. Le matériel alloué à une pièce doit impérativement rester dans celle-ci. Il est également recommandé d'aliqoter les réactifs en petits volumes dès leur réception, d'utiliser des cônes de prélèvement munis de coton protecteur ou de piston afin que le corps de la pipette ne soit jamais en contact avec les produits et enfin de distribuer l'ADN en dernier dans le mix.

Afin de limiter voire d'empêcher ces contaminations, plusieurs systèmes ont été mis au point :

* Destruction de l'ADN contaminant avant introduction de la cible :

Le mélange réactionnel sans ADN peut être traité par les rayonnements UV à 254/300 nm. Ce traitement provoque la création de liaisons covalentes entre les résidus de thymine et casse les brins. On a donc destruction de toute trace d'ADN contaminant avant introduction de l'ADN à amplifier. Cependant ce traitement n'est vraiment efficace que sur les brins de plus de 300 bp. De plus, les dNTPs absorbent fortement les rayons UV ce qui réduit l'efficacité de ce traitement.

Il est également possible d'utiliser des endonucléases. Celles-ci détruisent l'ADN double brin présent dans le milieu et sont ensuite détruites par la chaleur avant adjonction de l'ADN et de la Taq polymérase. Dans des conditions opératoires strictes, les amorces ne sont pas altérées significativement cependant l'efficacité de ce procédé est controversée.

*** Modification des amplicons afin de les différencier de la cible :**

Le but de ces techniques est soit de détruire les amplicons de façon sélective sans toucher à la cible soit de les rendre inamplifiables après la PCR.

① Exonucléase

Cette technique fait appel à l'exonucléase isolée du phage T7 qui a la capacité de digérer l'ADN double brin à partir de chaque extrémité en ne digérant que le brin 5'→3'. L'enzyme s'arrête donc approximativement au milieu du fragment d'ADN attaqué quand chacun de ses brins a été digéré pour moitié et qu'il ne reste plus que deux portions simple brin. La digestion de l'amplicon aboutit à la formation de deux ADN simple brin portant chacun un des sites de fixation d'amorce et donc à l'impossibilité pour celui-ci d'être réamplifié ultérieurement. Au contraire, la séquence à amplifier sur l'ADN cible n'est généralement pas située au milieu de celui-ci. La digestion de cet ADN laissera au moins un ADN double brin comportant un site de fixation d'amorce et la séquence complémentaire où se fixe la deuxième amorce. La séquence cible est préservée. L'exonucléase peut être ajoutée dans le mélange réactionnel : elle est active à 37°C et est détruite lors de la phase de dénaturation du premier cycle. L'intégrité des amplicons néosynthétisés est donc préservée.

② Système d'UTP/UNG : stérilisation pré-PCR

Ce système permet de limiter voire de supprimer ces contaminations : lors de l'incubation, le dTTP est remplacé par du dUTP (sans effet sur l'amplification). La cible amplifiée est donc différente dans sa composition par rapport à la cible non amplifiée. Lors de la PCR suivante, les échantillons sont traités par de l'uracyl-N-glucosylase qui détruit tout ADN contenant U à la place de T et venant d'une amplification antérieure. Cette enzyme, thermosensible, est automatiquement détruite lors de la première dénaturation de l'ADN permettant donc l'amplification d'une nouvelle cible avec du dUTP. Cette méthode permet également la destruction des amplicons issus d'hybridations non spécifiques à basse température avant que

le mélange réactionnel ne soit porté aux hautes températures des cycles de PCR. Il faut cependant noter que ce système n'est valable que pour des produits de PCR de plus de 100 bp.

③ Isopsoralène : stérilisation post-PCR

Cette méthode consiste à fixer une molécule d'isopsoralène de façon covalente à l'ADN néoformé grâce à l'action des UV. Ce produit est ajouté au mélange avant la PCR puisqu'il ne diminue pas l'efficacité de celle-ci. Une fois la PCR terminée, le tube est exposé à un rayonnement UV long (300-400 nm) : l'isopsoralène se fixe sur un résidu pyrimidique d'un des deux brins sans former de liaisons covalentes entre ceux-ci et sans provoquer de cassures. L'isopsoralène ainsi fixé empêchera la progression de la polymérase et donc l'amplification du brin. Ce système n'est également pas valable pour les brins de petites tailles.

④ Incorporation de ribose dans les amorces

On utilise ici des amorces contenant du ribose à la place du désoxyribose. Ceci n'empêche pas l'hybridation des amorces ni la réaction de PCR. A la fin des réactions d'amplification, les liaisons aux riboses sont détruites par chauffage en milieu alcalin (95°C, NaOH 1M) : l'ADN amplifié est cassé au niveau des amorces ce qui empêche une amplification exponentielle des amplicons lors d'une PCR suivante.

⑤ Hydroxylamine

Il est possible de rajouter de l'hydroxylamine en post-PCR : elle forme des liaisons covalentes avec les résidus cytosine les rendant incapables de former des liaisons hydrogènes avec les résidus guanine ce qui empêche toute amplification ultérieure. Ce système peut être appliqué pour les amplicons de petite taille.

② Le manque de fidélité de la Taq polymérase

La Taq polymérase ne possède pas d'activité de correction des épreuves. Elle produit donc une quantité d'erreurs non négligeable (une pour 10^4 nucléotides). Lorsque la séquence du produit amplifié joue un rôle dans l'analyse, ces erreurs peuvent fausser le résultat.

③ Les amplifications parasites

Les amorces étant relativement courtes, il est toujours possible qu'elles s'hybrident à la mauvaise place. On estime que seulement 1 % des amorces s'hybride à la bonne place, le reste se fixant aléatoirement et de manière non spécifique. Normalement, les amplifications résultants de ces fixations restent linéaires et ne sont donc pas détectables par simple coloration. Pour que celles-ci soit détectables, il faut que les deux amorces se fixent en regard l'une de l'autre à une distance suffisamment faible. Afin d'éviter ces amplifications parasites, il faut augmenter la stringence de la réaction ici en augmentant la température progressivement jusqu'à ce que les bandes disparaissent. Il est également possible d'utiliser le formamide à faible concentration. En cas d'amplification non spécifique « persistante », on peut utiliser :

- La technique de PCR emboîtée : une deuxième amplification est faite en utilisant des amorces se fixant à l'intérieur de la séquence précédemment amplifiée. Ces amorces ne pourront pas se fixer au niveau des cibles parasites. On obtient ainsi une amplification plus spécifique ainsi qu'un meilleur taux d'amplification.

- La PCR *hot start* : dans une PCR classique, les composants sont ajoutés à température ambiante, température à laquelle des hybridations non spécifiques et des amplifications parasites peuvent se produire avant le début des cycles de PCR. Dans le cas de la *hot start*, un des composants essentiels n'est pas ajouté au moment de la préparation du mix. Le tube contenant le mélange déficient est mis à chauffer à une température supérieure à la température optimale de fonctionnement de l'enzyme (vers 80°C). A ce moment, le composant manquant est rajouté et la PCR peut débuter à chaud. Il est également possible d'utiliser une *hot start polymerase* encapsulée dans une bille de paraffine (TaqBead™ de Proméga) la bille fond à 60°C ce qui permet de relarguer l'enzyme dans le milieu réactionnel au commencement des cycles de PCR et à chaud. Enfin, il existe une Taq polymérase active à 72°C mais inactive à température ambiante (AmpliTaq Gold™ de Roche

Diagnostics). Pour la rendre active, il faut chauffer le milieu 10 minutes à 94°C, température à laquelle tous les dimères d'acides nucléiques se dénaturent y compris les non spécifiques.

- La Taq-Start™ Antibody (Clontech Laboratories) : la Taq-Start™ est un anticorps anti-Taq polymérase qui se fixe sur l'enzyme à température ambiante et neutralise son action. Quand la température atteint 70°C, l'affinité antigène-anticorps diminue fortement et la Taq polymérase retrouve son activité à une température où les hybridations non spécifiques ont été éliminées. La Taq-Start™ est généralement utilisée volume à volume avec la Taq polymérase. Il est à noter que le DMSO et la formamide inhibe l'action de la Taq-Start™.

D/ Exploitation des produits amplifiés par PCR

Le produit amplifié est une cible pure disponible en théorie en grande quantité. Ce produit pourra faire l'objet de différents procédés d'analyses (dot blot, séquençage, électrophorèse ...)

II) Les recommandations de l'EAA (European Academy of Andrology)

La recherche des microdélétions du chromosome Y par PCR peut se faire sur l'ADN obtenu à partir des lymphocytes du sang périphérique. Les amorces utilisées peuvent être des amorces spécifiques de la région à amplifier ou bien des STS (Sequence Tagged Site) séquences anonymes spécifiques du chromosome Y, l'un ne présentant pas d'avantage net par rapport à l'autre.

Dans la littérature, la fréquence annoncée des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles varie, du fait des différentes techniques utilisées et des biais de sélection, de 1 à 55,5% ! Devant de telles variations l'EAA a décidé de mettre en place des recommandations afin d'unifier les techniques utilisées et réduire ainsi ces écarts. Ces recommandations décrivent principalement la nature et le nombre de STS à utiliser, les contrôles minimums à instaurer, la technique PCR à choisir [127, 128]. Elles doivent permettre l'obtention d'un test précis, exact, fiable,

facile à réaliser, reproductible, rapide et autant que possible peu coûteux. Une nouvelle version du guide de recommandation doit être publiée sous peu.

Critères indispensables pour le choix d'un STS :

- Région unique et non polymorphe dans la population caucasienne
- Région connue pour être délétée spécifiquement chez l'homme infertile
- Cette région peut correspondre à un gène d'AZF ou à une région anonyme.

Ainsi, il faut éviter : sY16, sY55, sY75, sY109, sY112, sY132, sY164, sY138, sY153, sY155, sY169 et sY272, séquences répétées au niveau du chromosome Y.

Contrôles à réaliser à chaque PCR :

- Témoin positif = homme normospermique de fertilité connue : permet de vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel et de contrôler la sensibilité et la spécificité.
- Témoin négatif = femme : contrôle de la spécificité et de contamination
- Blanc réactif sans ADN : contrôle de contamination
- Contrôle de qualité interne = gène SRY et ZFY (présent chez la femme) : contrôle de la réaction d'amplification.

Le mode opératoire recommandé

L'EAA recommande l'utilisation d'une PCR multiplex (i.e. plus d'un couple d'amorces par réaction). Le criblage des STS (figure n°25) se fait en deux étapes : une étape de détection et une étape de confirmation.

⇒ Premier screening : on utilise deux STS par région AZF à couvrir et un contrôle interne SRY ou ZFY.

AZFa : sY84 et sY86. L'absence simultanée de ces deux STS permet d'affirmer une délétion complète d'AZFa avec une probabilité proche de 100%.

AZFb : sY127 et sY134 situés dans la partie médiane et distale. Une absence conjointe de ces deux STS est associée dans la majorité des cas à une délétion complète d'AZFb.

AZFc : sY254 et sY255 tous les deux spécifiques des gènes DAZ. L'absence de ces deux marqueurs signe une délétion complète d'AZFc et donc la disparition de toutes les copies de DAZ. L'absence d'un seul de ces marqueurs est impossible et doit être considérée comme une erreur de manipulation.

Deux réactions multiplex seront nécessaires pour ce premier criblage. L'utilisation de deux STS par région AZF permet d'éviter des erreurs d'interprétation éventuellement dues à des problèmes sur un des primers utilisés [129].

⇒ Deuxième screening : il est utilisé lorsqu'une délétion est détectée au premier. Il permet de définir avec plus de précision le point de cassure de la délétion et donc de faire la différence entre délétion complète et partielle.

AZFa : frontière proximale sY82 (+) et sY83(-), frontière distale sY87(-) et sY88(+).

Si un seul des STS est absent à la première détermination (sY84 ou sY86), il faudra étudier la région AZFa plus en détails avec une recherche spécifique des gènes USP9Y et DBY.

AZFb : frontière proximale sY135(+) et sY114(-), frontière distale SY142(-) et sY152(+).

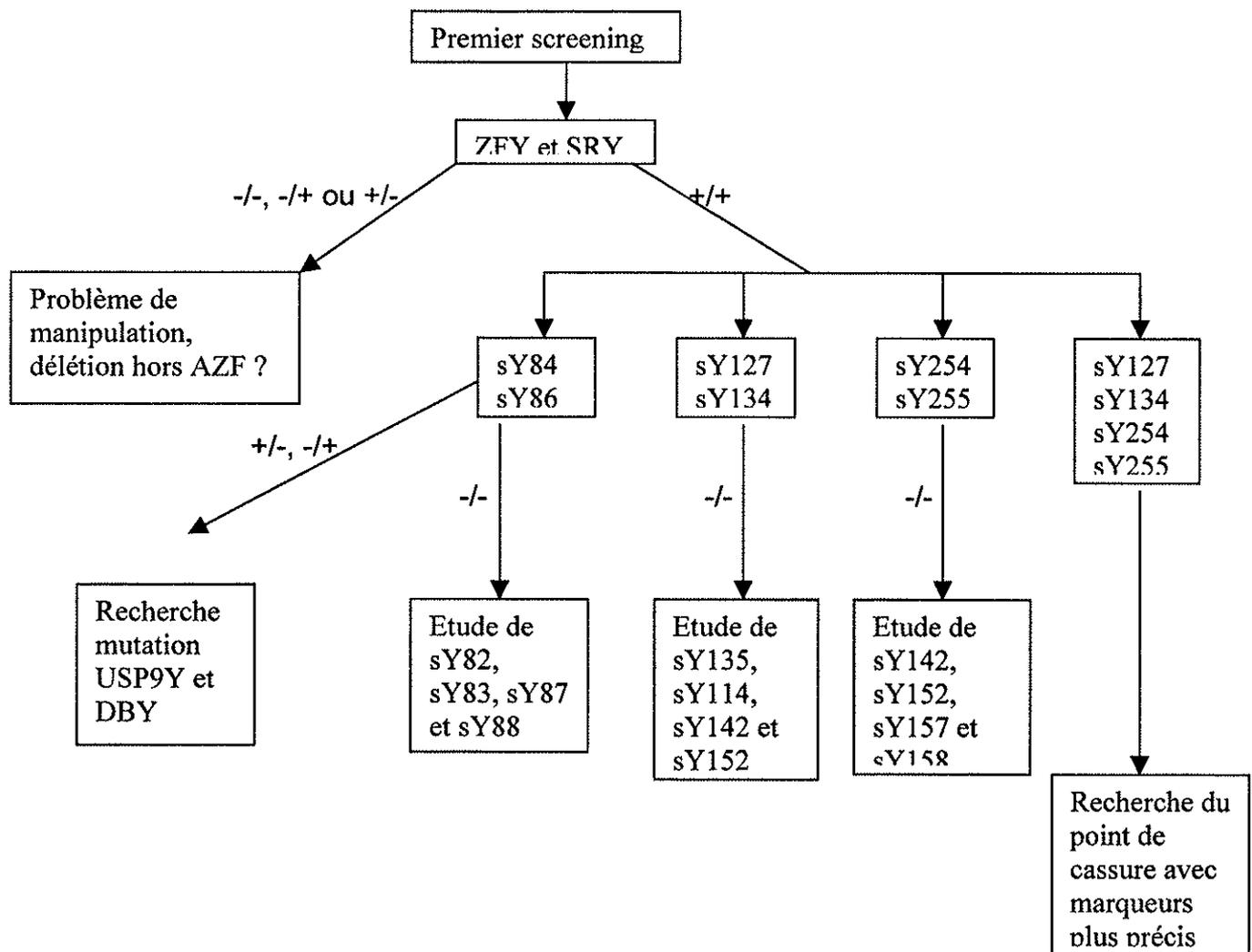
Il est possible de déterminer plus précisément le point de cassure en utilisant les primers décrits par Repping [21]. On peut ainsi déterminer si la délétion correspond au bloc P5/P1 proximal qui concerne également deux copies de DAZ.

AZFc : frontière proximale sY142(+) et sY152(-), frontière distale sY157(-) et sY158(+).

Des délétions partielles n'incluant qu'une ou deux copies de DAZ sont possibles mais leur détermination est encore du domaine de la recherche [130].

AZFbc : la délétion complète d'AZFb et d'AZFc est indiquée par l'absence des quatre marqueurs sY127, sY134, sY254 et sY255. Pour savoir si la délétion correspond au bloc P5/P1 distal ou P4/P1 distal il faut utiliser des marqueurs plus précis [21]. Cette précision ne se fait pas encore en routine.

(+) indique que le locus doit être présent et (-) que le locus doit être absent lorsqu'il s'agit d'une délétion complète de la région correspondante.



Interprétation des résultats, conduite à tenir :

Si un résultat est ambigu ou qu'une erreur de manipulation est suspectée, la PCR multiplex doit être répétée.

Si une réaction multiplex ne marche pas avec un échantillon particulier, celui-ci devra être traité en simplex pour chaque primer.

Si une délétion est présente sur deux multiplex consécutive, elle est confirmée mais si ces deux multiplex donnent des résultats discordants, tous les primers devront être testés en simplex avec une température d'hybridation inférieure sur l'échantillon concerné.

Cette technique permet de détecter plus de 95% des microdélétions et est donc suffisante pour les manipulations de routine.

Limites à noter : la PCR sur lymphocytes ne permettant pas de détecter une mosaïque germinale, une sous-estimation des délétions est possible. De plus, on ne recherche pas les délétions en dehors des régions AZF telles qu'elles ont été définies par Vogt et al. [89].

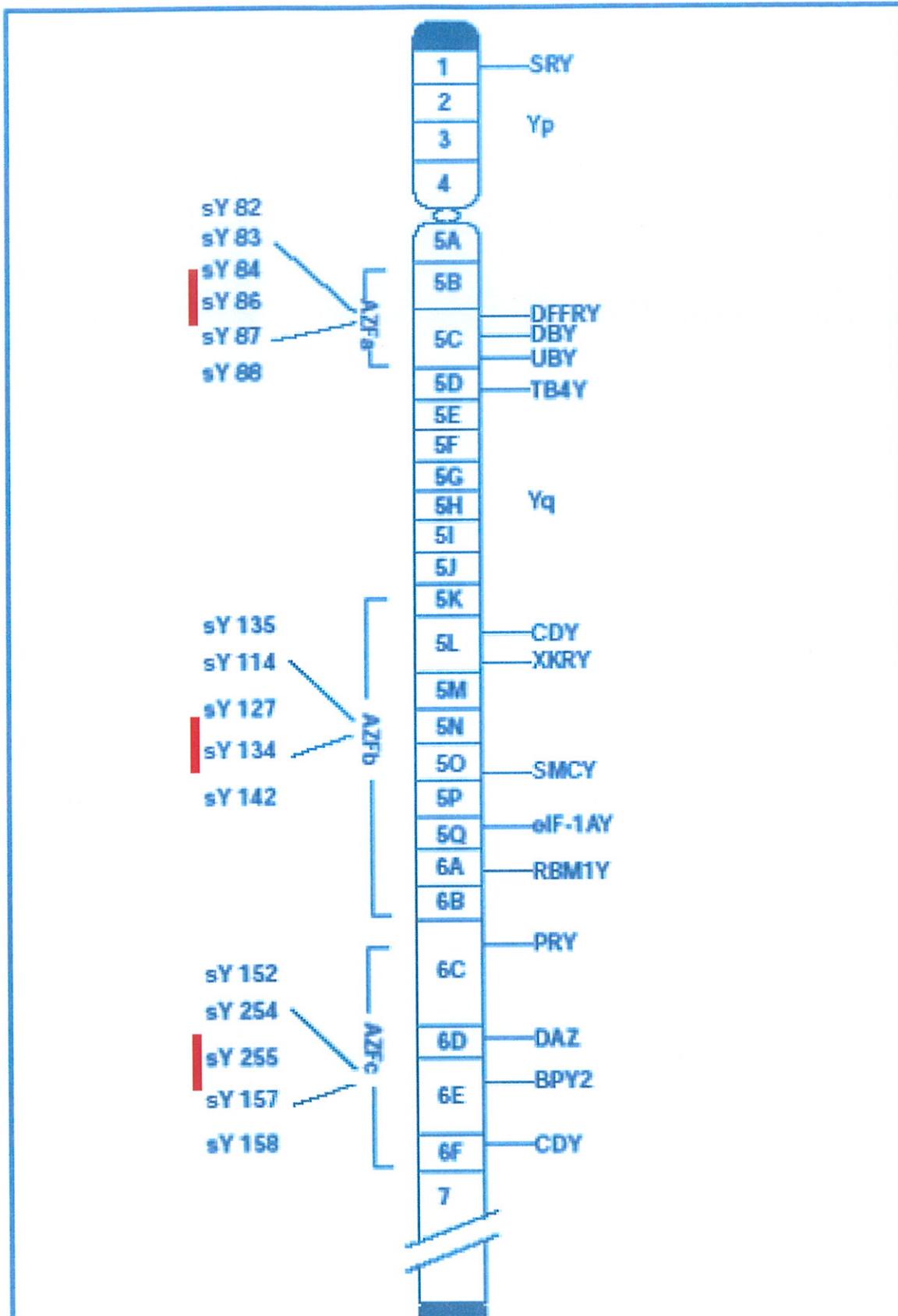


Figure n°25 : plan du chromosome Y et localisation des STS d'après K.McElreavey et al. Les amorces signalées en rouge sont utilisées pour le premier screening. Les autres (hormis sY135) sont utilisées pour le second screening.

Exemple de protocole de PCR (utilisé à l'institut de Münster)

Premier screening :

Réaction A :

SRY et ZFY

sY254 (AZFc)

sY84 (AZFa)

sY127 (AZFb)

Réaction B :

SRY et ZFY

sY255 (AZFc)

sY86 (AZFa)

sY134 (AZFb)

Le mix est préparé comme suit:

Avec le kit Quiagen Multiplex PCR

Pour un volume de 50 µl :

- 25 µl de Multiplex PCR MasterMix 2x Quiagen (contenant la Taq polymérase HotStar, le tampon à 6mM de MgCl₂ et les dNTP)
- 5 µl de la solution de primers 10x à 2 µM pour chaque
- 1 µg d'ADN
- Eau distillée pour compléter à 50 µl

Le programme d'amplification est (sur thermocycleur Hybaid Touch Down) :

15 minutes de dénaturation initiale à 95°C

35 cycles : dénaturation 30 secondes à 94°C

hybridation 90 secondes à 57°C

élongation 60 secondes à 72°C

10 minutes d'élongation terminale

Refroidissement à 4°C

Les produits obtenus (30 µl) sont analysés sur gel d'agarose à 2% plus 0,5% de DNA Agar en TBE 1x. La migration s'effectue à 25 V durant toute une nuit.

Un contrôle de qualité externe réalisée par M. Simoni en 1999 faisait état d'un taux d'erreur de 5%. Elle recommandait l'instauration d'un contrôle de qualité externe régulier afin de contrôler les performances des différents laboratoires [131].

III) Mise au point de la technique au laboratoire du CECOS de Toulouse

La recherche des microdélétions du chromosome Y a débutée au sein du laboratoire du CECOS Midi-Pyrénées-laboratoire de spermologie aux alentours de l'année 1996 après la parution des articles de Ma [132], Reijo [133] et Vollrath [134]. Une technique de PCR simplex fut alors mise au point utilisant 12 STS couvrant les régions AZFa, AZFb et AZFc. Le laboratoire pu donc présenter ses résultats portant sur 260 patients infertiles (une des plus grandes séries de l'époque) au congrès d'urologie de Dallas en 1999 [135].

La majorité des marqueurs étant étudiés par PCR simplex, cette recherche était très coûteuse en temps. De plus, les marqueurs utilisés, bien que souvent retrouvés dans les études publiées, ne faisaient pas l'objet d'un consensus et étaient donc sujets à controverse.

C'est dans ce contexte international flou que l'EAA a décidé de poser les bases d'une standardisation dans le diagnostic des microdélétions du chromosome Y chez l'homme infertile.

Basé sur les recommandations de l'EAA et les conseils éclairés et bienvenus du Dr Siefer-Aknin (CECOS de Saint-Etienne), notre travail a eu pour objectif la mise en place au laboratoire de spermologie de Toulouse de technique de PCR multiplex utilisant les marqueurs génomiques consensuels pour l'étude étiologique de l'infertilité masculine.

Il existe à l'heure actuelle des kits commercialisés permettant ce diagnostic mais leur fiabilité a été mis en cause et leur coût par analyse dépasse largement celui de la technique « maison » (plus de dix fois plus) [91].

A/ Matériel et méthodes

Les techniques sont détaillées en annexes.

Obtention des acides nucléiques

L'ADN utilisé pour la détection des microdélétions peut être obtenu à partir des leucocytes du sang périphérique prélevé au pli du coude sur anticoagulant (EDTA). Il est également possible d'obtenir de l'ADN à partir des cellules jugales obtenues par écouvillonnage de la face interne des joues. Cet ADN est parfaitement extractible et analysable. L'obtention est simple, rapide, indolore et mieux tolérée qu'une prise de sang [91].

L'extraction de l'ADN est réalisée manuellement par une technique utilisant un solvant non organique (éthanol absolu à froid) en milieu salin (acétate d'ammonium). Le résultat de l'extraction peut être contrôlé par mesure de la quantité d'ADN présent par spectrophotométrie. Cette méthode permet également d'évaluer la qualité de l'extraction grâce au rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (1,8 pour l'ADN).

Recherche des microdélétions

La détection des microdélétions du chromosome Y est donc réalisée en deux étapes, détection puis confirmation. Le premier criblage comporte deux réactions quadruplex :

Mix 1 : SRY + sY84 + sY134 + sY255

Mix 2 : ZFY + sY86 + sY127 + sY254

Le second criblage comporte cinq PCR : trois en duplex, une en triplex et une en simplex.

Mix 3 : sY135 et sY88

Mix 4 : sY82 et sY152

Mix 5 : sY83 et sY142 et sY87

Mix 6 : sY157 et sY158

Mix 7 : sY114

Les mix sont préparés dans la pièce « propre » n°1, pièce qui ne doit pas être contaminée par des acides nucléiques extraits ou amplifiés. Chaque mix est adapté en fonction du nombre de couple d'amorce qu'il contient et du design de ces amorces. Le mélange est réalisé dans la glace pilée ou avec tout autre dispositif adapté permettant de travailler à basse température principalement au moment de l'ajout de la Taq polymérase.

L'ADN extrait est ensuite rajouté dans la pièce n°2.

L'amplification est réalisée sur thermocycleur Perkin-Elmer. Le programme choisi est adapté à chacun des différents mix.

Après amplification, les tubes sont transférés dans le laboratoire n°3 (sans être ouverts !!) où ils sont stockés à +4°C.

Visualisation des résultats

La réaction est contrôlée par migration sur gel d'agarose à 2% en TBE 1X contenant environ 0,04% de bromure d'éthidium. Les produits sont déposés à raison de 15 à 20 µl selon la taille des puits. La migration se fait entre 100 et 120 V selon la cuve utilisée. La durée de migration est fonction de la taille du gel et du nombre de rangées de puits par gel. La présence des bandes et leur taille sont évaluées visuellement sur rampe à UV.

B/ Résultats

Les résultats obtenus pour chaque mix sont présentés ci-dessous. Pour chacun, deux ou trois témoins masculins ont été étudiés ainsi qu'un ou deux témoins féminins et un blanc réactif. Le mix trois n'a pu être montré ici du fait de l'absence de photo suffisamment bonne pour être scannée.

Une représentation des résultats attendus est donnée en annexes à côté de l'échelle de poids moléculaire utilisée comme référence de taille pour chacune des réactions.

MIX 1 et 2 : deux PCR quadruplex

MIX 1 : SRY (472 bp), sY84 (320 bp), sY134 (301 bp) et sY255 (126 bp)

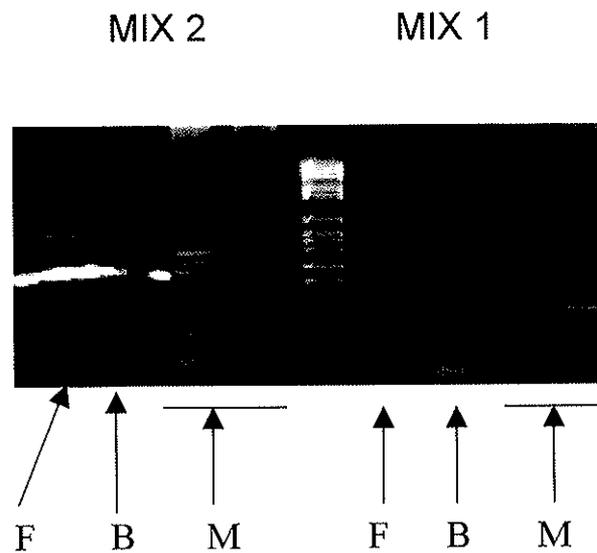
MIX 2 : ZFY (495 bp), sY254 (380 bp), sY86 (326 bp) et sY127 (274 bp)

ZFY possède une copie (ZFX) sur le chromosome X. La bande correspondant à ZFY est donc présente sur le témoin féminin.

F = témoin féminin

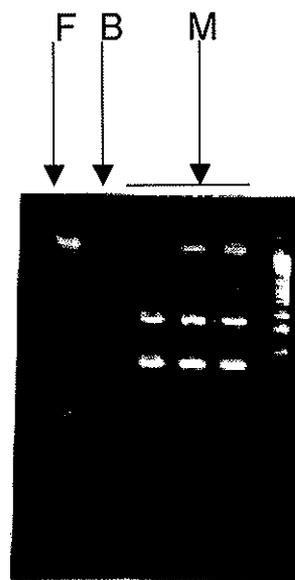
B = blanc

M = témoin masculin



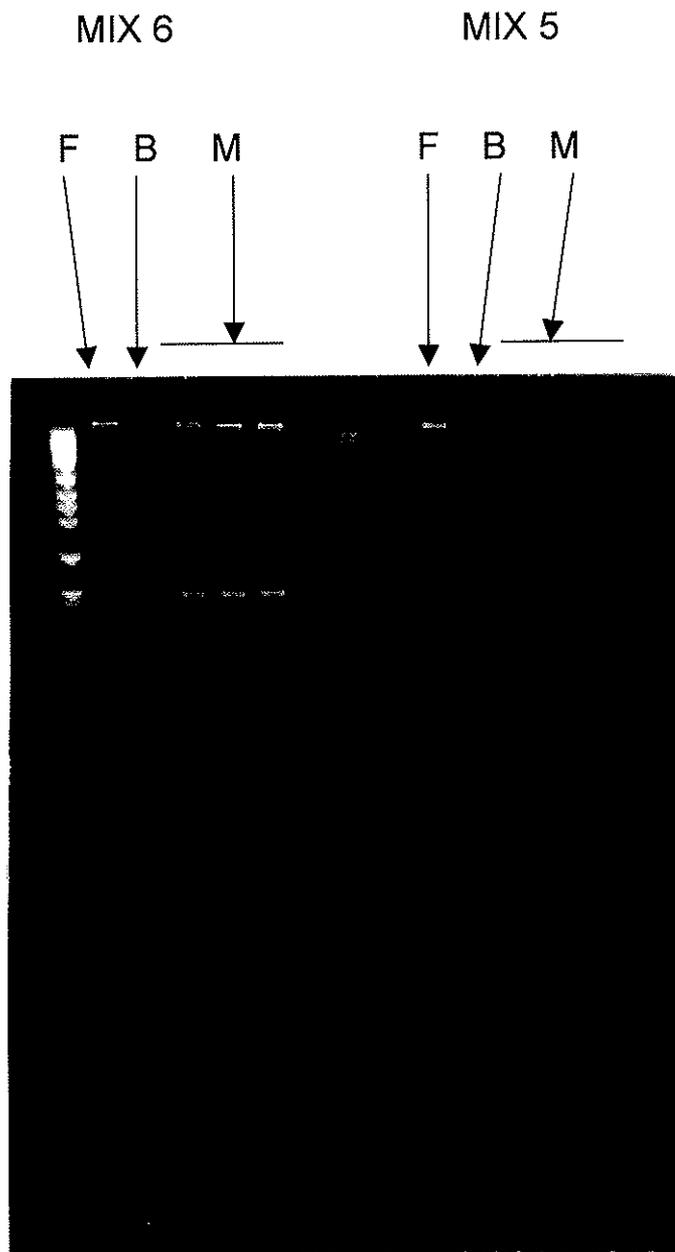
MIX 4 : PCR duplex

MIX 4 : sY82 (264 bp) et sY152 (125 bp)



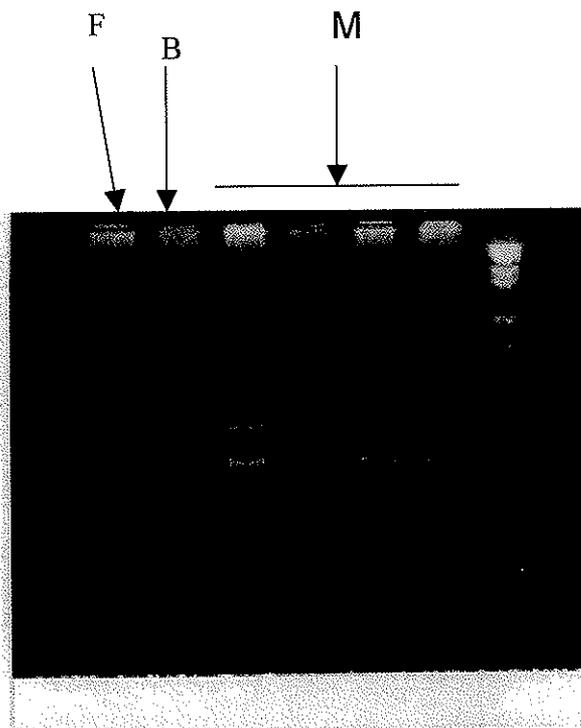
MIX 5 et 6 en triplex

MIX 5 : sY83 (277 bp), sY87 (252 bp) et sY142 (196 bp)
MIX 6 : sY87 (252 bp), sY157 (286 bp) et sY158 (231 bp)



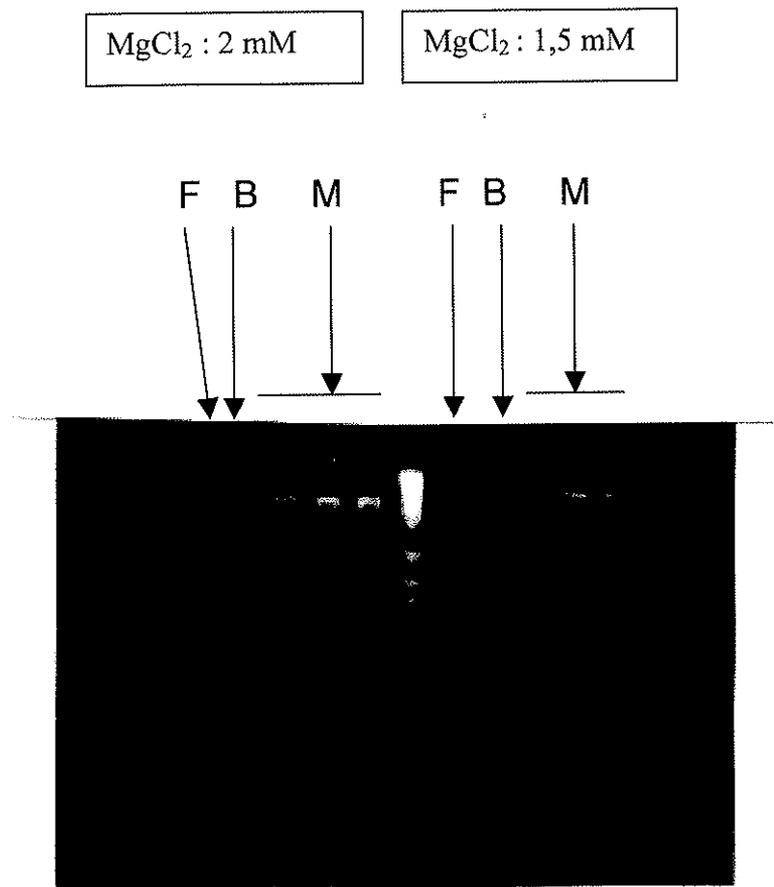
MIX 6 EN DUPLEX

MIX 6 : sY157 (286 bp) et sY158 (231 bp)



MIX 7 : PCR simplex

MIX 7 : sY114 (1450 bp)



C/ Discussion

La recherche des microdélétions du chromosome Y est maintenant communément admise comme partie intégrante du diagnostic de l'infertilité sécrétoire idiopathique de l'homme. Cette recherche peut être effectuée par différentes méthodes : FISH [136], PCR en temps réel [137] et PCR multiplex. Devant la variabilité des résultats rendus, l'EAA a décidé d'édicter un guide de recommandation concernant la technique à utiliser. La technique de PCR multiplex a été choisie pour sa simplicité, sa rapidité et sa précision. La technique de PCR en temps réel ne concerne pour l'instant que le gène DAZ, elle ne peut donc pas être utilisée pour un diagnostic complet. Il faut également noter que la technique de PCR multiplex peut être couplée à une technique de détection par électrophorèse capillaire. La grande sensibilité de celle-ci permet une diminution du nombre de cycles d'amplification et de la prise d'essai d'ADN [138]. Cette technique n'est pour l'instant pas recommandée en routine.

La technique décrite dans le guide de l'EAA doit être adaptée à chaque laboratoire en fonction du matériel et des réactifs dont il dispose.

La mise au point des techniques a été compliquée en premier lieu par un changement inévitable de locaux après le transfert des services entourant la maternité de l'hôpital La Grave à l'hôpital Paule De Viguier. Le nouveau laboratoire de biologie moléculaire du CECOS répond aux recommandations de la discipline en ce qui concerne le nombre de pièces minimum requises et leur séparation.

Les techniques mises au point ont également dû être entièrement repensées suite au changement intempestif de fournisseur au mois de janvier 2004. Les réactifs jusqu'alors livrés par Roche (tampon Perkin-Elmer GeneAmp® à 15mM de MgCl₂, polymérase Perkin-Elmer AmpliTaq®), Sigma (Chlorure de magnésium 1M) ou Q-biogène (amorces) ont été pris en charge par Invitrogen d'où une adaptation nécessaire des quantités notamment de tampon et de chlorure de magnésium. Il est difficile d'évaluer exactement le temps nécessaire à ces mises au point compte tenu de la disponibilité variable dont je disposais lors des stages d'internat dans d'autres disciplines. Il a fallu en tout environ 75 PCR pour obtenir les résultats actuels.

Sachant qu'une réaction de PCR demande en moyenne une demi-journée, il aurait fallu à un personnel temps plein 37,5 jours de manipulations.

Durant la mise au point en elle-même, trois problèmes majeur ont été rencontrés : une absence totale d'amplification, la présence de bandes non spécifiques et l'absence de certaines bandes.

❶ Absence totale de bandes

Pendant les deux premiers mois de manipulation, une dizaine de préparations n'a pas été amplifiée. La révélation sur gel des réactions montrait la présence d'ADN et des primers. Les programmes enregistrés sur le thermocycleur étaient conformes. Le problème survenant de façon aléatoire pour des témoins identiques, la présence d'inhibiteurs de PCR a été écartée. La Taq polymérase a été testée sur des PCR simplex qui ont donné un résultat normal. Le problème s'étant réglé de lui-même sans qu'aucune explications n'ait été trouvée il a été transitoirement mis de côté. Dernièrement, plusieurs manipulations différentes effectuées par deux personnes différentes n'ont pas été amplifiées à nouveau. Le thermocycleur va être testé afin de s'assurer de sa capacité à effectuer correctement les programmes enregistrés.

❷ Présence de bandes non spécifiques

Durant la mise au point des différents mélanges réactionnels, la présence de bandes non spécifiques au niveau des témoins masculins et féminins a été constatée pour chaque « mix ». Elle a nécessité l'adaptation des proportions de chaque constituant du mélange en fonction du nombre d'amorces utilisées, la réalisation d'une gamme de chlorure de magnésium et la recherche d'une température d'hybridation optimale.

❸ L'absence d'une bande particulière

Durant la mise au point du mix n°5, la bande correspondant à sY87 n'était pas amplifiée malgré les diverses adaptations mentionnées ci-dessus. Après un certain nombre d'essais infructueux, l'amplification a été réalisée avec un ancien couple d'amorces utilisé pour les PCR simplex et gardé au laboratoire. La bande sY87 était

nettement visible. La réalisation de ce mix a donc été grandement ralentie par la livraison d'un couple d'amorce défectueux.

Il apparaît donc à travers les différents problèmes rencontrés lors de cette mise au point, la nécessité d'instaurer un guide strict et clair à travers le GBEA du laboratoire. Il devra mentionner les procédures et modes opératoires concernant le traitement préalable de l'échantillon, sa conservation avant et après analyse, l'appareillage utilisé, la réalisation de l'analyse, les règles de validation, la transmission des résultats et l'hygiène et la sécurité du laboratoire.

Le numéro de lot de chacun des consommables utilisé devra être mentionné sur la feuille de paillasse de la technique afin de pouvoir détecter toute défaillance due au fournisseur. Il semble évident, au vu du temps passé à l'adaptation de ces techniques, que les changements de fournisseurs décidés de façon unilatérale sont préjudiciables au bon fonctionnement du laboratoire et au rendu de résultats corrects.

Il semblerait également utile, afin d'effectuer les manipulations le plus efficacement possible, de doter le laboratoire d'un système de production de glace pilée pour remplacer le système actuel moins performant et trop « contaminable ». Le sens de circulation dans le laboratoire de biologie moléculaire doit également être signalisé de façon plus claire pour tout le personnel. Enfin, le personnel affecté au nettoyage du laboratoire devrait être formé afin d'éviter des erreurs dans le transport du matériel souillé.

Il faut noter que le laboratoire de biologie moléculaire du CECOS est utilisé pour des manipulations autres que les recherches de délétions ce qui impose certaines adaptations au niveau rangement et partage de l'espace disponible.

IV) Résultats obtenus

Les résultats obtenus sont d'ores et déjà utilisés en routine au laboratoire du CECOS de Toulouse. Plusieurs séries de patients ont été testées avec les deux PCR de dépistage. A l'heure actuelle, 177 patients ont été testés. 156 ne présentent pas de délétions, 21 montrent des délétions touchant les différents marqueurs. Les délétions de ces patients doivent dans un premier temps être contrôlées par PCR simplex avant d'entreprendre le deuxième screening.

6/ CONCLUSION

Ce travail de thèse avait pour but tout d'abord de montrer l'implication des microdélétions du chromosome Y dans l'infertilité masculine et donc l'intérêt de la détection de ces microdélétions lors de la prise en charge des hommes infertiles puis de mettre au point une technique de PCR multiplex permettant de réaliser cette recherche aussi précisément mais plus rapidement qu'avec la PCR simplex.

L'implication des microdélétions du chromosome Y dans les troubles de la spermatogenèse a été démontrée par de nombreux auteurs dans des études multiples. La réalisation de cette recherche lors de la prise en charge de l'homme infertile n'est donc pas remise en cause.

Cependant, les chiffres obtenus lors de ces études sont très variables du fait des différences entre les groupes étudiés et les protocoles choisis pour la réalisation des PCR. C'est pour cette raison que l'Académie Européenne d'Andrologie (EAA) a décidé de mettre en place des recommandations visant à harmoniser la réalisation de cette recherche.

Suivant ces recommandations et les conseils du Docteur Siefer (CECOS de Saint-Etienne), nous avons tenté d'adapter cette technique au sein du laboratoire de spermologie du CECOS de Toulouse. Suite au déménagement du laboratoire pendant les manipulations, au changement inopiné de fournisseur, à la livraison d'amorces défectueuses et à des soucis de matériel, la mise au point a été fortement retardée et souffre encore du manque d'une étude de reproductibilité sur des séries plus grandes. La mise au point devra donc être poursuivie notamment pour le deuxième screening.

Enfin, dans le cadre de cette mise au point, le laboratoire de spermologie du CECOS va étendre son GBEA au laboratoire de biologie moléculaire afin de permettre une pratique standardisée des techniques de PCR.

BIBLIOGRAPHIE

1. Czyba, J. and A. Montella, *Biologie de la Reproduction humaine*. Vol. 1. 1993: Sauramps medical. 300.
2. Foresta, C., E. Moro, and A. Ferlin, *Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 226-39.
3. Kvaloy, K., F. Galvagni, and W.R. Brown, *The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes*. *Hum. Mol. Genet*, 1994. **3**: p. 771-778.
4. Li, L. and D.H. Hamer, *Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region*. *Hum. Mol. Genet*, 1995. **4**: p. 2013-2016.
5. Ciccodicola, A., et al., *Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(3): p. 395-401.
6. Charchar, F.J., et al., *Complex events in the evolution of the human pseudoautosomal region 2 (PAR2)*. *genome Research*, 2003. **13**: p. 281-286.
7. Vogt, M.H., et al., *DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in bone marrow graft rejection*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 1100-5.
8. Wang, W., et al., *Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein*. *Science*, 1995. **269**(5230): p. 1588-90.
9. Skaletsky, H., et al., *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes*. *Nature*, 2003. **423**(6942): p. 825-37.
10. Tsuchiya, K., et al., *Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome*. *Am J Hum Genet*, 1995. **57**(6): p. 1400-7.
11. Salo, P., et al., *Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. **14**(3): p. 210-4.
12. Kuroda-Kawaguchi, T., et al., *The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men*. *Nat Genet*, 2001. **29**(3): p. 279-86.
13. Foresta, C., A. Ferlin, and E. Moro, *Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(8): p. 1161-9.
14. Foresta, C., et al., *Role of the AZFa candidate genes in male infertility*. *J Endocrinol Invest*, 2000. **23**(10): p. 646-51.
15. Huynh, T., R. Mollard, and A. Trounson, *Selected genetic factors associated with male infertility*. *Hum Reprod Update*, 2002. **8**(2): p. 183-98.
16. Vogt, M.H., et al., *UTY gene codes for an HLA-B60-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in stem cell graft rejection: characterization of the critical polymorphic amino acid residues for T-cell recognition*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3126-32.
17. Warren, E.H., et al., *The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y antigen*. *J Immunol*, 2000. **164**(5): p. 2807-14.
18. Lahn, B.T. and D.C. Page, *Functional coherence of the human Y chromosome*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 675-80.
19. Sargent, C.A., et al., *The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences*. *J Med Genet*, 1999. **36**(9): p. 670-7.

20. Ferlin, A., et al., *The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men.* J Med Genet, 2003. **40**(1): p. 18-24.
21. Repping, S., et al., *Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure.* Am J Hum Genet, 2002. **71**(4): p. 906-22.
22. Elliott, D. *The role of RBMY/RBMX/hnRNPG-T genes in spermatogenesis.* in *Congres Genetics of Male Infertility: from Research to Clinic.* 2003. Florence.
23. Delbridge, M.L., et al., *A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome.* Nat Genet, 1997. **15**: p. 131-136.
24. Chai, N.N., et al., *Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal hnRNPG gene.* Genomics, 1998. **49**: p. 283-289.
25. Chai, N.N., E.C. Salido, and P.H. Yen, *Multiple functional copies of the RBM gene family, a spermatogenesis candidate on the human Y chromosome.* Genomics, 1997. **45**(2): p. 355-61.
26. Elliott, D.J., *RBMY genes and AZFb deletions.* J Endocrinol Invest, 2000. **23**(10): p. 652-8.
27. Yen, P., et al., *Characterization of several YRRM genes in deletion interval 6 of the human Y chromosome.* Am J Hum Genet, 1995. **57**: p. A154.
28. Venables, J.P., et al., *RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(5): p. 685-94.
29. Prosser, J., et al., *Degeneracy in human multicopy RBM (YRRM), a candidate spermatogenesis gene.* Mamm Genome, 1996. **7**(11): p. 835-42.
30. Stuppia, L., et al., *Characterization of novel genes in AZF regions.* J Endocrinol Invest, 2000. **23**(10): p. 659-63.
31. Stouffs, K., et al., *Characterization of the genomic organization, localization and expression of four PRY genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4).* Mol Hum Reprod, 2001. **7**(7): p. 603-10.
32. Stouffs, K., et al., *Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis.* Mol Hum Reprod, 2004. **10**(1): p. 15-21.
33. Tessari, A., et al., *Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis.* Mol Hum Reprod, 2004. **10**(4): p. 253-258.
34. Shinka, T., et al., *Molecular Characterization of Heat Shock-like Factor Encoded on the Human Y Chromosome, and Implications for Male Infertility.* Biol Reprod, 2004.
35. Vogt, P.H. *Polymorphic structure of the DAZ gene family in AZFc and its function in spermatogenesis.* in *Genetics of Male Infertility: from Research to Clinic.* 2003. Florence.
36. Seboun, E., et al., *Gene sequence, localization, and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene.* Genomics, 1997. **41**(2): p. 227-35.
37. Yen, P.H., N.N. Chai, and E.C. Salido, *The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions.* Mamm Genome, 1997. **8**(10): p. 756-9.
38. Yen, P. *Putative biological functions of the DAZ family.* in *Genetics of Male Infertility: from Research to Clinic.* 2003. Florence.

39. Saxena, R., et al., *The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned*. *Nat Genet*, 1996. **14**(3): p. 292-9.
40. Niederberger, C., et al., *In situ hybridization shows that Dazla expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis*. *Mamm Genome*, 1997. **8**(4): p. 277-8.
41. Brekhman, V., et al., *The DAZL1 gene is expressed in human male and female embryonic gonads before meiosis*. *Mol Hum Reprod*, 2000. **6**(5): p. 465-8.
42. Dorfman, D.M., D.R. Genest, and R.A. Reijo Pera, *Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(10): p. 2531-6.
43. Habermann, B., et al., *DAZ (Deleted in AZoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(2): p. 363-9.
44. Ewis, A.A., et al., *Microdeletions of a Y-specific marker, Yfm1, and implications for a role in spermatogenesis*. *J Hum Genet*, 2002. **47**(5): p. 257-61.
45. Stuppia, L., et al., *Genomic organization, physical mapping, and involvement in Yq microdeletions of the VCY2 (BPY 2) gene*. *Genomics*, 2001. **72**(2): p. 153-7.
46. Doolittle, W.F. and C. Sapienza, *Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution*. *Nature*, 1980. **284**(5757): p. 601-3.
47. Orgel, L.E. and F.H. Crick, *Selfish DNA: the ultimate parasite*. *Nature*, 1980. **284**(5757): p. 604-7.
48. Furelaud, G., N. Devos, and A. Sabouret, *La mise en place de l'appareil génital disponible sur www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/sexegene/3genes.htm*.
49. Jauzein, F., *Les gènes de la détermination sexuelle chez les mammifères*.
50. Amselem, S., et al., *Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(15): p. 989-95.
51. Netchine, I., et al., *Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency*. *Nat Genet*, 2000. **25**(2): p. 182-6.
52. Machinis, K., et al., *Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4*. *Am J Hum Genet*, 2001. **69**(5): p. 961-8.
53. de la Chapelle, A., *Analytic review: nature and origin of males with XX sex chromosomes*. *Am J Hum Genet*, 1972. **24**(1): p. 71-105.
54. Zinn, A.R. and J.L. Ross, *Turner syndrome and haploinsufficiency*. *Curr Opin Genet Dev*, 1998. **8**(3): p. 322-7.
55. Rao, E., et al., *Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome*. *Nat Genet*, 1997. **16**(1): p. 54-63.
56. Belin, V., et al., *SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome)*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 67-9.
57. Cormier-Daire, V., et al., *SHOX gene mutations and deletions in dyschondrosteosis or Leri-Weill syndrome*. *Acta Paediatr Suppl*, 1999. **88**(433): p. 55-9.
58. Shears, D.J., et al., *Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 70-3.
59. Borie, C., et al., *Translocation (Y;22) resulting in the loss of SHOX and isolated short stature*. *Am J Med Genet*, 2004. **125A**(2): p. 186-90.
60. Buhler, E.M., *A synopsis of the human Y chromosome*. *Hum Genet*, 1980. **55**(2): p. 145-75.
61. Kirsch, S., et al., *The definition of the Y chromosome growth-control gene (GCY) critical region: relevance of terminal and interstitial deletions*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002. **15 Suppl 5**: p. 1295-300.

62. Kirsch, S., et al., *Localisation of the Y chromosome stature gene to a 700 kb interval in close proximity to the centromere*. J Med Genet, 2002. **39**(7): p. 507-13.
63. Tzancheva, M., et al., *Two male patients with ring Y: definition of an interval in Yq contributing to Turner syndrome*. J Med Genet, 1999. **36**(7): p. 549-53.
64. Kirsch, S., et al., *FISH deletion mapping defines a single location for the Y chromosome stature gene, GCY*. J Med Genet, 2000. **37**(8): p. 593-9.
65. Kirsch, S., et al., *Molecular and evolutionary analysis of the growth-controlling region on the human Y chromosome*. Hum Genet, 2004. **114**(2): p. 173-81.
66. Krausz, C. and G. Forti, *Clinical aspects of male infertility*. Results Probl Cell Differ, 2000. **28**: p. 1-21.
67. Thonneau, P., et al., *Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989)*. Hum Reprod, 1991. **6**(6): p. 811-6.
68. Chard, T., *Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles*. Baillieres Clin Obstet Gynaecol, 1991. **5**(1): p. 179-89.
69. Peschka, B., et al., *Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(9): p. 2257-63.
70. Patrice Clément, M.N., François Vialard et al., *Intérêt des nouveaux examens de génétique et de cytogénétique en médecine de la reproduction, in Journées de techniques avancées en gynécologie-obstétrique, AMP, périnatalogie et pédiatrie*. 2002.
71. Vincent, M., et al., *Cytogenetic Investigations of Infertile Men With Low Sperm Counts: A 25-Year Experience*. J Androl, 2001: p. 18-22.
72. Kleiman, S.E., et al., *Three-generation evaluation of Y-chromosome microdeletion*. J Androl, 1999. **20**(3): p. 394-8.
73. Chang, P.L., M.V. Sauer, and S. Brown, *Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2689-94.
74. McElreavey, K., et al., *[Male infertility and microdeletions of the Y chromosome]*. Gynecol Obstet Fertil, 2002. **30**(5): p. 405-12.
75. Siffroi, J.P., et al., *Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2559-62.
76. Blanco, P., et al., *Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism*. J Med Genet, 2000. **37**(10): p. 752-8.
77. Kamp, C., et al., *Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(17): p. 2563-72.
78. Oliva, R., et al., *Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1998. **70**(3): p. 506-10.
79. Simoni, M., *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004*. 2004.
80. Krausz, C., et al., *A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3606-12.
81. Lumbroso, S., et al., *A new mutation of the androgen receptor, P817A, causing partial androgen insensitivity syndrome: in vitro and structural analysis*. J Mol Endocrinol, 2004. **32**(3): p. 679-87.
82. Ochsenkuhn, R. and D.M. De Kretser, *The contributions of deficient androgen action in spermatogenic disorders*. Int J Androl, 2003. **26**(4): p. 195-201.
83. Yong, E.L., et al., *Genetics of male infertility: role of androgen receptor mutations and Y-microdeletions*. Ann Acad Med Singapore, 2000. **29**(3): p. 396-400.

84. Yong, E.L., C.J. Loy, and K.S. Sim, *Androgen receptor gene and male infertility*. Hum Reprod Update, 2003. 9(1): p. 1-7.
85. Martens, J.W., et al., *A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype*. Mol Endocrinol, 1998. 12(6): p. 775-84.
86. Song, G.J., et al., *Mutation screening of the FSH receptor gene in infertile men*. Mol Cells, 2001. 12(3): p. 292-7.
87. Prasanth, S.G. and S. Ali, *Expression of proto-oncogene c-kit receptor in rats (Rattus norvegicus) and identification of a mutant mRNA transcript implicated in spermatogenic failure*. DNA Cell Biol, 2003. 22(7): p. 447-56.
88. Tiepolo, L. and O. Zuffardi, *Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm*. Hum Genet, 1976. 34(2): p. 119-24.
89. Vogt, P.H., et al., *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. Hum Mol Genet, 1996. 5(7): p. 933-43.
90. Kent-First, M., et al., *Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection*. Mol Reprod Dev, 1999. 53(1): p. 27-41.
91. Akinin-Seifer, I., et al., *[A simple, low-cost and non-invasive method for screening Y microdeletions in infertile men]*. Gynecol Obstet Fertil, 2004. 32(1): p. 34-41.
92. Sun, C., et al., *An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y*. Nat Genet, 1999. 23(4): p. 429-32.
93. Pryor, J.L., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med, 1997. 336(8): p. 534-9.
94. Qureshi, S.J., et al., *Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men*. Mol Hum Reprod, 1996. 2(10): p. 775-9.
95. Brown, G.M., et al., *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, 1998. 7(1): p. 97-107.
96. Krausz, C., L. Quintana-Murci, and K. McElreavey, *Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis?* Hum Reprod, 2000. 15(7): p. 1431-4.
97. Ferlin, A., et al., *Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY*. Hum Reprod, 1999. 14(7): p. 1710-6.
98. Silber, S.J. and S. Repping, *Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome*. Hum Reprod Update, 2002. 8(3): p. 217-29.
99. Brandell, R.A., et al., *AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test*. Hum Reprod, 1998. 13(10): p. 2812-5.
100. Saunders, P.T., et al., *Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis*. Reproduction, 2003. 126(5): p. 589-97.
101. Slee, R., et al., *A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl null phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(14): p. 8040-5.
102. de Vries, J.W., et al., *Clinical relevance of partial AZFc deletions*. Fertil Steril, 2002. 78(6): p. 1209-14.
103. de Vries, J.W., et al., *Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men*. Fertil Steril, 2002. 77(1): p. 68-75.

104. Repping, S., et al., *The use of spermHALO-FISH to determine DAZ gene copy number*. Mol Hum Reprod, 2003. 9(4): p. 183-8.
105. Luetjens, C.M., et al., *Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation*. Hum Reprod, 2002. 17(9): p. 2258-66.
106. Foresta, C., E. Moro, and A. Ferlin, *Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods*. Hum Reprod, 2001. 16(8): p. 1543-7.
107. Zeyneloglu, H.B., et al., *Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI*. Hum Reprod, 2002. 17(7): p. 1833-6.
108. Mulhall, J.P., et al., *Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1997. 12(3): p. 503-8.
109. Kamischke, A., et al., *Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection: case report*. Hum Reprod, 1999. 14(9): p. 2320-2.
110. Cram, D.S., et al., *Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions*. Fertil Steril, 2000. 74(5): p. 909-15.
111. Oates, R.D., et al., *Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI*. Hum Reprod, 2002. 17(11): p. 2813-24.
112. Peterlin, B., et al., *Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men*. Hum Reprod, 2002. 17(1): p. 17-24.
113. van Golde, R.J., et al., *Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome*. Hum Reprod, 2001. 16(2): p. 289-92.
114. Choi, J.M., et al., *AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 2004. 81(2): p. 337-41.
115. Kuo, P.L., et al., *Transcriptional levels of four Y chromosome-linked AZF genes in azoospermic men and their association with successful sperm retrieval*. Urology, 2004. 63(1): p. 131-6; discussion 136.
116. Friel, A., et al., *A preliminary report on the implication of RT-PCR detection of DAZ, RBMY1, USP9Y and Protamine-2 mRNA in testicular biopsy samples from azoospermic men*. Int J Androl, 2002. 25(1): p. 59-64.
117. Yogev, L., et al., *Sex chromosome alignment at meiosis of azoospermic men with azoospermia factor microdeletion*. J Androl, 2004. 25(1): p. 110-6.
118. Silber, S.J., Page, D.C., Brown, L.G., Oates, R. *ICSI results with and without Y chromosomal deletions in men with severe oligozoospermia and azoospermia*. in 57th annual meeting of the ASRM. 2001. Orlando: Fertil. Steril.
119. Kihaille, P.E., et al., *Embryo outcome in Y-chromosome microdeleted infertile males after ICSI*. Mol Reprod Dev, 2004. 68(2): p. 176-81.
120. Quintana-Murci, L., et al., *The relationship between Y chromosome DNA haplotypes and Y chromosome deletions leading to male infertility*. Hum Genet, 2001. 108: p. 55-58.
121. Calogero, A.E., et al., *Spontaneous transmission from a father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene*. J Endocrinol Invest, 2002. 25(7): p. 631-4.
122. Gianotten, J., et al., *Partial DAZ deletions in a family with five infertile brothers*. Fertil Steril, 2003. 79 Suppl 3: p. 1652-5.

123. Page, D.C., S. Silber, and L.G. Brown, *Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility*. Hum Reprod, 1999. **14**(7): p. 1722-6.
124. Calogero, A.E., et al., *Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient: Case report*. Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 1845-8.
125. Patsalis, P.C., et al., *Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions*. Lancet, 2002. **360**(9341): p. 1222-4.
126. Silber, S.J., *The cure and proliferation of male infertility*. J Urol, 1998. **160**(6 Pt 1): p. 2072-3.
127. Simoni, M., *The EAA International Quality Control Programme for Y-Chromosomal microdeletions*. European Academy of Andrology. Int J Androl, 1998. **21**(6): p. 315-6.
128. Simoni, M., et al., *Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions*. Int J Androl, 1999. **22**(5): p. 292-9.
129. Thornhill, A.R., et al., *False-positive Y-microdeletion result for a fertile male caused by an alteration under a PCR primer*. Int J Androl, 2002. **25**(6): p. 352-7.
130. Ferlin, A., et al., *A novel approach for the analysis of DAZ gene copy number in severely idiopathic infertile men*. J Endocrinol Invest, 2002. **25**(1): p. RC1-3.
131. Simoni, M., *Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control*. Hum Reprod, 2001. **16**(3): p. 402-9.
132. Ma, K., et al., *A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1287-95.
133. Reijo, R., et al., *Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene*. Nat Genet, 1995. **10**(4): p. 383-93.
134. Vollrath, D., et al., *The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions*. Science, 1992. **258**(5079): p. 52-9.
135. Entezami, F., et al. *Y chromosome microdeletions in 260 infertile men*. in *94th annual meeting of American Urological Association*. 1999. Dallas.
136. Gole, L.A. and S.C. Ng, *FISH analysis of Y chromosome long arm deletions in subfertile men considering ICSI. A report of two cases*. J Reprod Med, 2002. **47**(6): p. 515-8.
137. Yu, C.Y., et al., *[Real-time fluorescent PCR for screening AZFc/DAZ microdeletions on the Y chromosome in male infertility patients]*. Zhonghua Nan Ke Xue, 2003. **9**(6): p. 436-8, 442.
138. Bor, P., et al., *A new approach for screening for Y microdeletions: capillary electrophoresis combined with fluorescent multiplex PCR*. J Assist Reprod Genet, 2003. **20**(1): p. 46-51.

ANNEXES

Laboratoire de spermologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 1/4

EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE LEUCOCYTES

But/Objet : Cette technique a pour but l'obtention de molécules d'ADN à partir des leucocytes du sang périphérique.

Elle est réalisée manuellement dans la pièce n°2 du laboratoire de biologie moléculaire avec toutes les précautions inhérentes.

Domaine d'application : Technicienne qualifiée en biologie moléculaire

EXTRACTION

Produits et matériel utilisés

TKM1 : à conserver à + 4°C
 10 mM Tris HCl pH 7,6
 10 mM KCL
 10 mM MgCl₂
 2 mM EDTA

TKM1 + NP₄O : à conserver à 4°C
 NP₄O 2,5 % en TKM1

Sarcosyl : à conserver à température ambiante
 20 % (Poids/Volume) en eau distillée

Protéinase K20 : à conserver à - 20°C aliquotée (20 mg/ml)

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermologie CECOS Midi-Pyrénées	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire			date d'effet
				page 2/4
<p>T₂₀E₅ : à conserver à + 4°C PH 8 20 mM TrisHCl 5 mM EDTA</p> <p>T₁₀E₁ : à conserver à + 4°C 10 mM TrisHCl 1 mM EDTA</p> <p>Ethanol absolu : à conserver à + 4°C</p> <p>NaCl : à conserver à + 4°C NaCl 5 M dans de l'eau pure stérilisée</p> <p>Tubes Falcon® 15 ml Tubes Eppendorf® 1,5 ml Pipettes 100 et 1000 µl et leurs embouts correspondants Pipettes graduées 2,5 et 10 ml Bain-marie Centrifugeuse</p> <p><u>Technique</u></p> <p>Allumer le bain-marie à 56°C Sortir TKM1, TKM1 + NP₄O, T₂₀E₅ et T₁₀E₁ du réfrigérateur Préparer un grand tube Falcon® par patient</p> <p><u>Lyse des hématies</u></p> <p>Mettre 5 ml de sang prélevé sur EDTA dans le tube 15 ml avec une pipette graduée Ajouter 5 ml de TKM1 + NP₄O Si le volume de sang disponible est inférieur à 5 ml, noter le volume obtenu sur la pipette et ajouter le même volume de TKM1 + NP₄O Agiter : le sang devient laqué Centrifuger 10 minutes à 2200 tours/min à température ambiante</p>				
Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 3/4

Lavage des leucocytes

Eliminer le surnageant

Laver le culot de globules blancs avec 5 ml de TKM1 en veillant à bien décoller le culot

Centrifuger 10 minutes à 2200 tours/min à température ambiante

Recommencer cette étape une fois

Lyse des leucocytes

Eliminer le surnageant

Ajouter 1 ml de T₂₀E₅ sur le culot propre

Agiter de façon à mettre les cellules en suspension

Ajouter 50 µl de sarcosyl 20 % et 20 µl de protéinase K20 (sortit du congélateur extemporanément)

Mettre au bain-marie à 55-57°C avec agitation pendant une heure : la solution obtenue doit être limpide.

Première précipitation

Ajouter dans le tube 0,5 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M et 3,2 ml d'éthanol absolu froid (à sortir du réfrigérateur au dernier moment)

Agiter par retournements lents : une « méduse » d'ADN se forme

Deuxième précipitation

Dans un deuxième tube Falcon®, mettre 1 ml de T₂₀E₅ et 40 µl de NaCl 5M

Ajouter dans ce deuxième tube la « méduse » d'ADN et laisser reprendre à température ambiante pendant environ une heure

Ajouter 2 ml d'éthanol absolu froid : la « méduse » se reforme

Hydratation de l'ADN

La « méduse » d'ADN est reprise dans 0,4 ml de T₁₀E₁ dans un tube Eppendorf de 1,5 ml

Ce tube est conservé à + 4°C

Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 4/4

DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT

Une fois dissous et avant conservation, la concentration en ADN doit être dosée par spectrophotométrie.

Produits et matériel utilisés

Spectrophotomètre GeneQuant II
Cellule de mesure de trajet optique égal à 10 mm
Microtubes Eppendorf®
Pipettes de 10 et 100 µl et leurs embouts adaptés
Solution de soude 0,1M
Tampon T₁₀E₁

Préparation de l'échantillon

Le dosage est réalisé sur une dilution au 11^{ème} de la solution d'ADN extrait : dans un microtube, mettre 70 µl de tampon T₁₀E₁ et 7 µl de la solution d'ADN

Utilisation du GeneQuantII®

Se reporter aux spécifications du fabricant et à la fiche GBEA n° XXX.

Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 1/9

PROTOCOLES DE REALISATION DES PCR MULTIPLEX

But/Objet : Ces protocoles permettent la préparation des mélanges pour PCR et leur amplification sur thermocycleur.

Domaine d'application : Technicienne qualifiée en biologie moléculaire

1/ Réactifs utilisés

Eau : molecular biology grade Eurobio GAUEAU00F01 500 ml

Tampon : 10X PCR Buffer MgCl₂ free Invitrogen y02028

dNTP : Qbiogène 100mM pH 7,5
dATP référence NTATP100
dCTP NTCTP100
dGTP NTGTP100
dTTP NTTTP100

Amorces : InVitrogen K3792G03 à G012, K3792H01, K3792H02 à H06 et K3792H09 pour le premier screening.
Qbiogène 30200013 – 1 à 20 pour le deuxième screening

MgCl₂ : solution à 50 mM InVitrogen 1 ml y02016

Taq polymérase : Invitrogen 5U/µl soit 500 U/tube cat n° 18038-026

Solution d'ADN : Les solutions d'ADN obtenues après extraction sont dissoutes en T₁₀E₁, dosées et stockées avant utilisation. En cas d'évaporation, diluer la solution avec de l'eau pure.

Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 2/9

Agarose : Resophor Agarose Eurobio High Resolution molecular biology grade 100g GEPAGA06 - 62

Bromure d'éthidium : Eurobio 0,7 mg/ml 5ml GEPBET02 - AE

Tampon TBE 10X : InVitrogen 1000 ml Cat 15581 - 044

L'eau est aliquotée dans des tubes eppendorf 1,5 ml et conservée au réfrigérateur ou au congélateur.

La solution de dNTP à **10 mM** est préparée à l'avance (100 µl de chaque dNTP avec 600 µl d'eau) et conservée au congélateur.

La solution de MgCl₂ **50 mM** est conservée au congélateur.

Les amorces sont préparées à **10 µM** : pour chaque amorces ajouter la quantité d'eau nécessaire en fonction de la quantité de matière sèche (cf. fiche produit). Elles sont conservées au congélateur.

Le tampon et la Taq polymérase sont conservés au congélateur.

La réaction de PCR se fait classiquement sur 500 ng d'ADN. Les protocoles utilisés dans ce cadre prévoient l'adjonction de 2,5 µl de solution d'ADN soit une concentration théorique nécessaire de 200 µg/ml. Pour des solutions plus concentrées, on redilue dans du T₁₀E₁. Pour des solutions moins concentrées, il est possible d'augmenter le volume de solution d'ADN utilisé en diminuant d'autant le volume d'eau du mix.

Le tampon TBE 10X est dilué au 10^{ème} dans de l'eau pure et conservé, pur et dilué, au réfrigérateur.

Le numéro de lot et la date de péremption des réactifs utilisés doivent être notés à chaque manipulation.

A noter : la présence d'héparine inhibe les réactions de PCR.

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 3/9

2/ Préparation des mix

La préparation est réalisée à +4°C. Le mélange des réactifs est réalisé dans la pièce propre n°1. L'ajout de l'ADN est fait dans la pièce n°2. Une fois le mélange réalisé, la phase d'amplification sur thermocycleur doit être réalisée immédiatement. A la fin du programme d'amplification, les échantillons doivent être analysés à la suite ou bien conservés à +4°C dans la pièce n°3.

1^{er} screening

Mix 1 (SRY, sY84, sY134 et sY255) et 2 (ZFY, sY86, sY127 et sY254) : PCR quadruplex

Tampon : 5 µl

dNTP : 1 µl

Amorces sens : 2,5 µl pour chaque

Amorces anti-sens : 2,5 µl pour chaque

Solution de MgCl₂ : qsp concentration finale de 2 mM pour le mix 1 et 5,5 mM pour le mix 2

Taq polymérase : 1,25 U

Solution d'ADN : qsp 250 ng d'ADN

Eau : qsp 50 µl

Programme d'amplification n°126

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale, activation Taq	95°C	15 minutes	
Dénaturation	94°C	30 secondes	35
Hybridation	60°C	45 secondes	
Amplification	72°C	90 secondes	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 4/9

2^{ème} screening

Mix 3 (sY88 et sY135) et 4 (sY82 et sY152) : PCR duplex

Tampon : 4 µl
dNTP : 0,8 µl
Amorces sens : 1,4 µl pour chaque
Amorces anti-sens : 1,4 µl pour chaque
Solution de MgCl₂ : qsp concentration finale de 1 mM
Taq polymérase : 1,25 U
Solution d'ADN : qsp 250 ng d'ADN
Eau : qsp 50 µl

Programme d'amplification n°124

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale, activation Taq	95°C	15 minutes	
Dénaturation	94°C	30 secondes	35
Hybridation	56°C	45 secondes	
Amplification	72°C	90 secondes	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Mix 5 (sY83, sY87 et sY142) : PCR triplex

Tampon : 5 µl
dNTP : 1 µl
Amorces sens : 2 µl pour chaque
Amorces anti-sens : 2 µl pour chaque
Solution de MgCl₂ : qsp concentration finale de 2,5 mM
Taq polymérase : 1,25 U
Solution d'ADN : qsp 250 ng d'ADN
Eau : qsp 50 µl

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 5/9

Programme d'amplification n°123

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale, activation Taq	95°C	15 minutes	
Dénaturation	94°C	30 secondes	35
Hybridation	58°C	45 secondes	
Amplification	72°C	90 secondes	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Mix 6 (sY157 et sY158) : PCR duplex

Tampon : 4 µl
dNTP : 0,8 µl
Amorces sens : 1,4 µl pour chaque
Amorces anti-sens : 1,4 µl pour chaque
Solution de MgCl2 : qsp concentration finale de 2,5 mM
Taq polymérase : 1,25 U
Solution d'ADN : qsp 250 ng d'ADN
Eau : qsp 50 µl

Programme d'amplification n°123

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 6/9

Mix 7 (sY114) : PCR simplex

Tampon : 3 µl
dNTP : 0,6 µl
Amorces sens : 0,3 µl pour chaque
Amorces anti-sens : 0,3 µl pour chaque
Solution de MgCl₂ : qsp concentration finale de 1,5 mM
Taq polymérase : 1,5 U
Solution d'ADN : qsp 250 ng d'ADN
Eau : qsp 50 µl

Programme d'amplification n°128

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale, activation Taq	95°C	15 minutes	
Dénaturation	94°C	30 secondes	35
Hybridation	52°C	45 secondes	
Amplification	72°C	90 secondes + 3 secondes à chaque cycle	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
		page 7/9

3/ Amorces

Les amorces utilisées sont :

Pour le premier criblage

STS	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille (bp)
SY84	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC	326
SY86	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT	320
SY127	TCTGTTGCTTGAAAAGAGGG	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
SY134	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTCAA	301
SY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	380
SY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCATGTGCAGCCAC	123
SRY	GAATATCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	470
ZFY	ACCRCGTACTGACTGTGATTACAC	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	495

Pour le second criblage

STS	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille (bp)
sY82	ATCCTGCCCTTCTGAATCTC	CAGTGTCCACTGATGGATGA	264
sY83	CTTGAATCAAAGAAGGCCCT	CAATTTGGTTTGGCTGACAT	277
sY87	TCTGTTGCTTGAAAAGAGGG	ACTGCAGGAAGAATCAGCTG	252
sY88	TTGTAATCCAAATACATGGGC	CACCCAGCCATTTGTTTTAC	123
sY114	TGCACTCATGGAGACAACAG	AACCAGGGTTTTCACTGAAA	1450
sY135	CATTTCCACATTATGATAATTATGC	ACCCAGAGAGTAGAAACAGTGC	253
sY142	AGCTTCTATTTCGAGGGCTTC	CTCTCTGCAATCCCTGACAT	196
sY152	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA	ACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125
sY157	CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CCTGCTGTCAGCAAGATACA	285
sY158	CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC	ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA	231

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 8/9

4/ Visualisation des bandes

La visualisation du résultat des amplifications est réalisée par migration sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET).

On prépare 12 heures avant la migration un gel d'agarose à 2%. La taille du gel est déterminée par le nombre de puits nécessaires : gel à 100 ml ou 300 ml.

Le bromure d'éthidium est incorporé dans le gel encore liquide juste avant qu'il ne soit coulé (vapeurs toxiques). La concentration finale doit être de 0,04% environ.

La migration se fait à 50 V pour les petits gels, 100 V pour les grands gels pendant une deux minimum pour les mix 1 à 6, trois heures minimum pour le mix 7. Le marqueurs de taille doit être suffisamment étiré afin que chaque bande témoin soit visible.

La lecture des bandes se fait sur la rampe à UV située à côté des bacs de migrations. Le gel est pris en photo systématiquement.

5/ Rendu du résultat

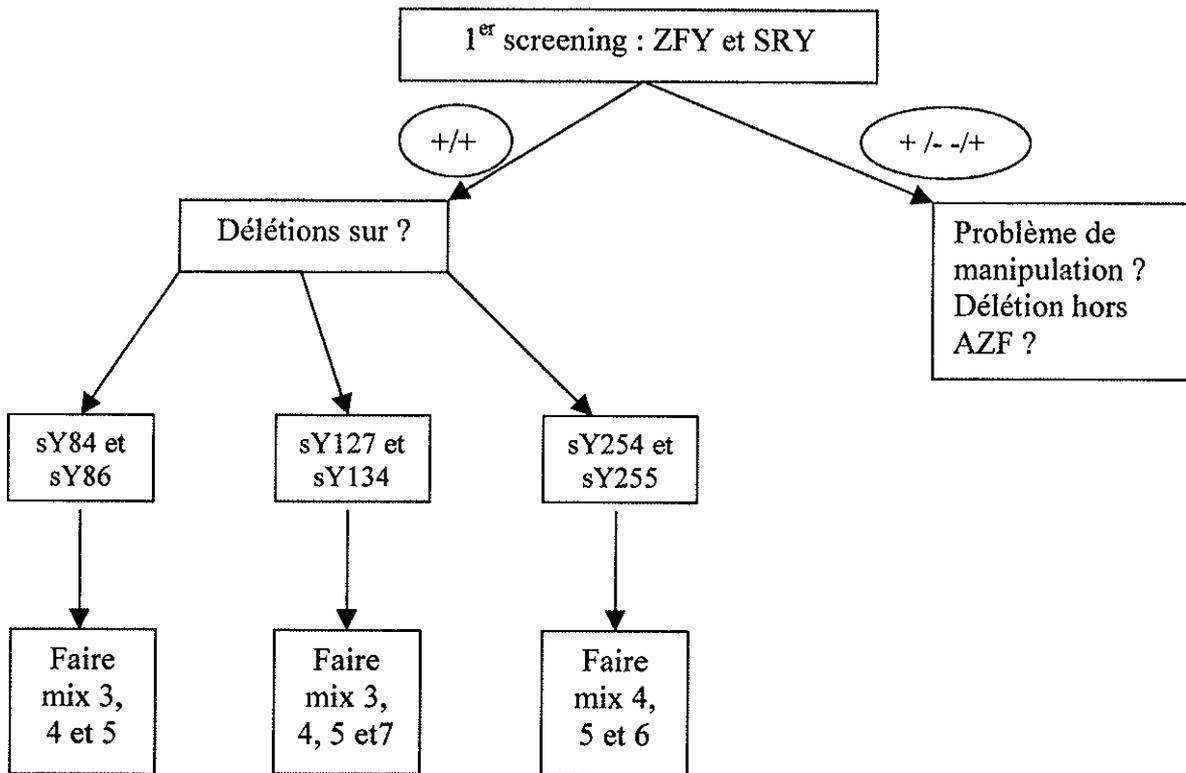
Doivent apparaître sur la feuille de paillasse : le nom de l'analyse, les amorces utilisées, la date des différentes étapes (extraction, amplification, migration), les réactifs utilisés (n° de lot, date de péremption), la photo du gel et le nom de la technicienne ayant pratiqué les manipulations.

Le résultat rendu au clinicien doit être clair et sans équivoque même pour un non-spécialiste. Il doit comporter : l'identification du laboratoire, la date d'exécution de l'analyse, l'identification complète du patient, la nature de l'échantillon traité, la technique utilisée, un compte rendu des résultats mentionnant les STS étudiés évitant l'utilisation de + et - (préférer présent/absent), l'interprétation du responsable du secteur et sa signature.

Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	Date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		
		page 9/9

6/ Interprétation des résultats – conduite à tenir



Délétion de sY83, sY84, sY86 et sY88 : délétion complète d'AZFa. Si sY84 ou sY86 est présent, il faudra étudier en détail les gènes USP9Y et DBY avec des marqueurs spéciaux.

Délétion de sY114, sY127, sY134 et sY142 : délétion complète d'AZFb.

Délétion de sY152, sY254, sY255 et sY157 : délétion complète d'AZFc.

Délétion de sY127, sY134, sY254 et sY255 : délétion complète d'AZFb et c.

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	Date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 1/3

PRECAUTIONS PARTICULIERES AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Il s'agit des précautions communes à tous les tests d'amplification (ADN ou ARN, manuelles ou automatisées).

1/ Organisation des locaux

L'espace de travail doit de répartir en deux zones bien délimitées au minimum, trois zones étant recommandées.

Les manipulations doivent se faire selon le principe de la marche en avant : elle commence au niveau de la zone dite propre (sans ADN), se poursuivent dans la zone de pré-amplification et se terminent dans la zone de post-amplification.

Zones	Préparations	Recommandations particulières
Zone propre	Reconstitution du mix et répartition dans les tubes PCR	Pièce particulière ou hotte à flux laminaire à l'intérieur de la zone de pré-amplification
Zone pré-amplification	Extraction Addition de l'ADN dans les tubes PCR	
Zone post-amplification	Amplification et détection Recueil des résultats	Aucun produit amplifié ne sort de cette zone

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 2/3

2/ Port de blouse et de gants

Des gants doivent être portés en permanence. Ils doivent absolument être changés lors du passage d'une zone à une autre et au moindre doute de souillure par de l'ADN.

Le port d'une blouse (ou surblouse) est obligatoire pour la réalisation du test d'amplification. Il est nécessaire d'utiliser des blouses différentes, une pour la zone propre, une pour la zone de pré-amplification et une autre pour la zone de post-amplification. En aucun cas une blouse déjà utilisée en zone de post-amplification ne doit retourner en zone de pré-amplification.

3/ Matériel utilisé

Le matériel utilisé est du matériel à usage unique autant que possible. Chaque zone doit avoir son propre matériel celui-ci devant impérativement rester dans la zone à laquelle il a été attribué. Il ne faut jamais transporter du matériel dans le sens inverse de la marche.

Il est obligatoire d'utiliser des pipettes à embouts à filtre ou à déplacement positif.

Il faut changer de cône entre chaque étape en évitant de passer au-dessus des autres tubes du portoir. Les cônes usagés doivent jetés immédiatement dans un container approprié. L'écoulement du réactif doit être effectué contre la paroi du tube pour éviter les éclaboussures.

L'utilisation de blocs chauffants secs est préférable à celle des bains-marie humides.

Version	préparée par :	approuvé par :	Date :	Signature
1	Marjolaine Héraud	Louis BUJAN		
Version remplacée		date de l'ancienne version		

Laboratoire de spermiologie	Référence GBEA III - Exécution des Analyses 1.2 § 9 - Protocole opératoire	date d'effet
CECOS Midi-Pyrénées		page 3/3

4/ Décontamination des surfaces

Les surfaces et l'équipement doivent être nettoyées après chaque manipulation avec une solution d'eau de javel à 3°, de la soude 0,1N ou bien de l'acide chlorhydrique 0,1N. Ce nettoyage doit être suivi d'un rinçage à l'eau si l'on veut limiter l'effet corrosif de ces produits.

Il est possible de préserver les surfaces en les recouvrant de papier (papier aluminium par exemple) lors de chaque manipulation, le papier étant jeté sitôt la manipulation terminée.

5/ Précautions de manipulation concernant le technicien

Tous les échantillons doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Toutes les manipulations doivent être réalisées avec précaution afin d'éviter la contamination des échantillons, des réactifs, des surfaces et du matériel.

Il convient d'éviter l'inhalation de vapeurs, l'ingestion et le contact de tout réactif (notamment le bromure d'éthidium) avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver soigneusement au savon et à l'eau et demander conseil à un médecin.

6/ Gestion des déchets propre à l'activité de biologie moléculaire

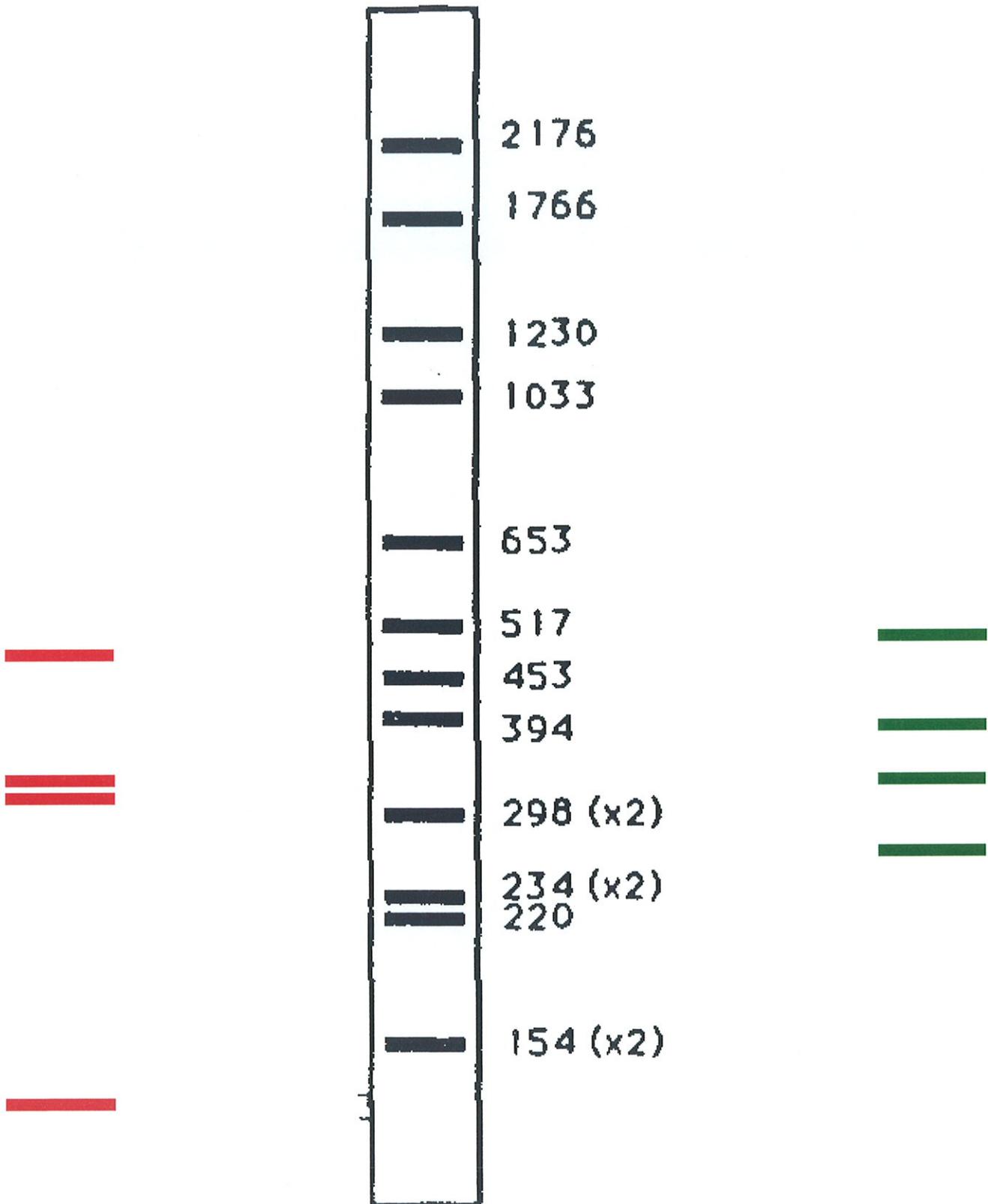
Tout le matériel ayant servi aux manipulations (gants, surblouses, pointes de pipettes) ainsi que les produits générés par ces manipulations (gels d'agarose, produits de PCR) sont jetés dans les bacs ou les sacs jaune utilisés normalement à l'hôpital. Ceux-ci sont détruits par incinération par une société prestataire de service.

Les liquides pouvant contenir du BET sont stockés dans un bidon particulier et ne doivent pas être mélangés aux autres déchets fluides du laboratoire. Ils seront pris en charge et détruits par la même société.

Version 1	préparée par : Marjolaine Héraud	approuvé par : Louis BUJAN	Date :	Signature
Version remplacée		date de l'ancienne version		

MIX 1

MIX 2



Résultats attendus pour les amplifications du premier screening

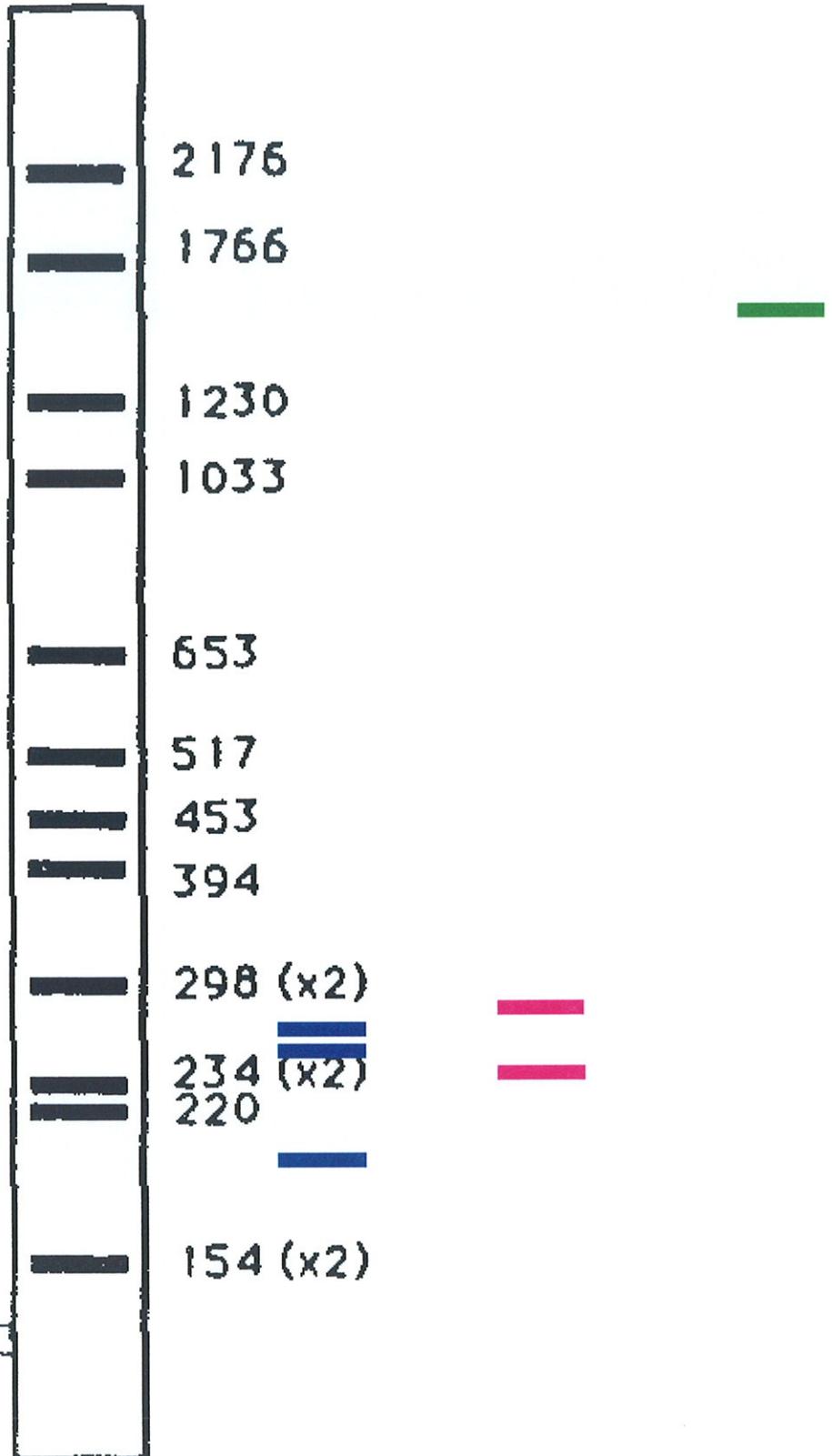
MIX 3

MIX 4

MIX 5

MIX 6

MIX 7



Résultats attendus pour les amplifications du second screening

GLOSSAIRE

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

ARN = Acide RiboNucléique

FISH = Fluorescence In Situ Hybridization

STS = Sequence Tagged Site

EST = Expressed Sequence Tag

ACBCD = Agénésie Congénitale Bilatérale des Canaux déférents

TESE = Testicular Sperm extraction

ICSI = Intra Cytoplasmic Sperm injection

Transposase = enzyme nécessaire à l'insertion d'éléments transposables c'est-à-dire d'éléments mobiles dans le génome.

LINES = Long Interspersed Sequences. Séquences transposables présentant une très grande variabilité. Au niveau du génome humain, on en retrouve 103 copies complètes et 105 copies incomplètes.

SINES = Short Interspersed Sequences. Elles sont appelées séquences Alu chez l'humain. Ce sont des éléments de 300 bp environ. Chez l'homme on en compte de 300 000 à 900 000 copies dispersées dans le génome soit une séquence Alu tous les 6 kbp.

SNP = Single Nucleotide Polymorphism

Code à une lettre et trois lettres désignant les acides aminés :

Acide aminé	Trois lettres	Une lettre	Acide aminé	Trois lettres	Une lettre
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Acide aspartique	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Acide Glutamique	Glu	E	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Trh	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisée de mes confrères, si j'y manque ;

BON A IMPRIMER N° 337

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Microdélétions du chromosome Y et infertilité masculine : mise au point de la technique de détection consensuelle et revue de la littérature

RESUME :

Dans le cadre du bilan médical de l'homme infertile, la recherche des microdélétions du chromosome Y est maintenant considérée comme un élément diagnostic déterminant : ces microdélétions se retrouvent majoritairement chez les hommes azoospermes et oligospermes sévères. Leur recherche apportera une aide importante pour le diagnostic étiologique, l'orientation thérapeutique et le conseil génétique.

Devant l'augmentation du nombre de tests prescrits, il devenait incontournable de mettre en place au laboratoire du CECOS de Toulouse une technique moins coûteuse en temps que celle utilisée jusqu'alors. Notre travail a permis l'adaptation au laboratoire d'une technique de PCR multiplex suivant les recommandations de l'European Academy of Andrology. Cette technique permet de couvrir les principales délétions décrites à ce jour en sept réactions de PCR là où dix-huit étaient nécessaires auparavant.

Titre en anglais : Microdeletion and male infertility : assessment of a consensus technique and review of literature.

DISCIPLINE : Biologie de la reproduction

MOTS-CLES : Stérilité masculine, azoospermie, oligospermie, chromosome Y, microdélétions, PCR multiplex, assistance médicale à la procréation

CECOS Midi-Pyrénées
Service d'urologie-andrologie
Groupe de recherche Fertilité Humaine (EA3694)
CHU Paule De Viguer
330 avenue de Grande Bretagne
31059 Toulouse cedex 9

Directeur de thèse : Dr Louis Bujan