

Avis de Soutenance

Madame Maha AL DALA ALI

Biologie-Santé - Spécialité Génétique

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Étude du remodelage nucléaire et de la stabilité du génome pendant la spermatogenèse par des analyses fonctionnelles de gènes mutés dans des cas d'infertilité masculine humaine.

dirigés par Monsieur Michael MITCHELL et Madame Catherine METZER-GUILLEMAIN

Soutenance prévue le **lundi 24 juin 2024** à 14h00

Lieu : FSMPPM - rdc - aile bleue Campus Santé -Timone 27 boulevard Jean Moulin 13005 MARSEILLE
Salle : de visioconférence

Composition du jury proposé

M. Michael MITCHELL	Inserm/AMU U1251 - Marseille Medical Genetics	Directeur de thèse
Mme Deborah BOURCHIS	Institut curie/Génétique et biologie du développement (CNRS UMR3215 / INSERM U934)	Rapporteuse
Mme Nadege VERNET	IGBMC: Institut de génétique, biologie moléculaire et cellulaire/Dept. of Functional genomics & cancer	Examinatrice
M. Patrice ROLL	Marseille Medical Genetics - MMG	Président
M. Pierre RAY	Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Mme Catherine METZLER-GUILLEMAIN	Inserm/AMU U1251 - Marseille Medical Genetics/AP-HM, Pôle femmes, parents, enfants, Centr clinico-biologique AMP-CECOS	Co-directrice de thèse

Mots-clés : infertilité, spermiogenèse, complexes de pore nucléaire, rétrotransposons, enveloppe nucléaire, stabilité génétique

Résumé :

Environ 15% des couples dans le monde sont touchés par l'infertilité, dont la moitié présente un facteur masculin. Les causes génétiques, seules ou combinées à des facteurs environnementaux, sont considérées comme des causes majeures de l'infertilité masculine. L'ignorance de ces facteurs entrave une évaluation précise de la qualité génétique des gamètes et de son impact sur la descendance. Ainsi, l'identification des défauts génétiques est cruciale pour comprendre la physiopathologie d'infertilité masculine et ainsi personnaliser les traitements pour chaque couple infertile. Mon projet de thèse se concentre sur la caractérisation fonctionnelle de deux gènes spécifiques du testicule qui ont été trouvés inactivés dans deux cas d'infertilité masculine. 1) NUP210L, code une nucléoporine spécifique aux testicules une mutation homozygote de perte de fonction dans NUP210L a été identifiée chez un homme infertile présentant des têtes de spermatozoïdes décompactées. Nos résultats ont révélé que l'absence de NUP210L avait un impact modéré sur la morphologie de la tête et la motilité, mais que la compaction de la chromatine et la

fertilité restait normale. Nous avons ensuite créé des souris knockout pour Banf2, codant le facteur de barrière à l'autointégration (BAF-L), qui colocalise avec NUP210L au niveau de l'enveloppe nucléaire caudale dans les spermatides humaines. L'absence de BAFL ne montre aucun impact sur la spermatogenèse ou la fertilité. Cependant, les double mutants pour Banf2 et Nup210l étaient infertiles. BAFL est devenu essentiel pour la fertilité de manière dose-dépendante dans le contexte génétique Nup210l^{-/-}. Les souris Banf2^{+/-} ; Nup210l^{-/-} et Banf2^{-/-} ; Nup210l^{-/-} sont infertiles et présentent un blocage partiel de la spermiogenèse avec une oligozoospermie sévère et des anomalies dans l'organisation du réseau cytosquelettique autour du noyau. Notre travail montre clairement que BAF-L et NUP210L sont impliqués dans le même processus biologique qui assure un remodelage nucléaire efficace des spermatides. 2) EXD1 code la protéine exonucléase 3'-5' domaine-contenant 1, impliqué dans la répression transcriptionnel des éléments transposables, médiée par piRNA. Notre équipe a découvert une mutation non-sens homozygote chez cinq frères infertiles présentant une oligozoospermie sévère. Nous avons étudié un modèle murin Exd1-KO sur un fond génétique outbred où les Exd1^{-/-} mâles montrent deux phénotypes: un tiers sont infertiles avec des testicules atrophiés et une oligozoospermie sévère, tandis que les autres sont fertiles avec une spermatogenèse normale. Notre analyse de ce modèle révèle que les souris Exd1-KO infertiles présentent une forte dérégulation des rétrotransposons LINE-1 dans les spermatocytes avec un blocage partiel au zygotène. Dans les prospermatogonies de 34% des souris nouveau-nées Exd1-KO, nous avons trouvé que MIWI2, un effecteur nucléaire de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs LINE1, était exclusivement cytoplasmique, suggérant qu'un déficit de méthylation de l'ADN médiée par MIWI2, peut être la cause de l'infertilité dans nos souris Exd1-KO et dans le cas humain EXD1-KO. La différence de gravité phénotypique entre les souris Exd1-KO pourrait s'expliquer par la présence, chez les souris sévèrement affectées, d'une mutation dans un gène inconnu avec une redondance fonctionnelle par rapport à Exd1. En résumé, nos résultats montrent que l'étude de la fonction par l'inactivation d'un seul gène peut être obscurcie par une redondance fonctionnelle, la fonction ne devenant apparente qu'après l'inactivation d'un deuxième gène agissant dans le même processus biologique. Il est donc prudent de considérer le digénisme ou l'oligogénisme lors de l'évaluation des variants présents chez un homme infertile et dans la validation des variants chez la souris. Notre étude démontre l'importance de l'exploration du digénisme pour la découverte de fonctions géniques et biologiques inimaginés.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

Environ 15% des couples dans le monde sont touchés par l'infertilité, dont la moitié présente un facteur masculin. Les causes génétiques, seules ou combinées à des facteurs environnementaux, sont considérées comme des causes majeures de l'infertilité masculine. L'ignorance de ces facteurs entrave une évaluation précise de la qualité génétique des gamètes et de son impact sur la descendance. Ainsi, l'identification des défauts génétiques est cruciale pour comprendre la physiopathologie d'infertilité masculine et ainsi personnaliser les traitements pour chaque couple infertile.

Mon projet de thèse se concentre sur la caractérisation fonctionnelle de deux gènes spécifiques du testicule qui ont été trouvés inactivés dans deux cas d'infertilité masculine.

1) *NUP210L*, code une nucléoporine spécifique aux testicules une mutation homozygote de perte de fonction dans *NUP210L* a été identifiée chez un homme infertile présentant des têtes de spermatozoïdes décompactées. Nos résultats ont révélé que l'absence de *NUP210L* avait un impact modéré sur la morphologie de la tête et la motilité, mais que la compaction de la chromatine et la fertilité restait normale. Nous avons ensuite créé des souris knockout pour *Banf2*, codant le facteur de barrière à l'autointégration (BAF-L), qui colocalise avec *NUP210L* au niveau de l'enveloppe nucléaire caudale dans les spermatides humaines. L'absence de BAF-L ne montre aucun impact sur la spermatogenèse ou la fertilité. Cependant, les double mutants pour *Banf2* et *Nup210l* étaient infertiles. BAF-L est devenu essentiel pour la fertilité de manière dose-dépendante dans le contexte génétique *Nup210l^{-/-}*. Les souris *Banf2^{+/-} ; Nup210l^{-/-}* et *Banf2^{-/-} ; Nup210l^{-/-}* sont infertiles et présentent un blocage partiel de la spermiogenèse avec une oligozoospermie sévère et des anomalies dans l'organisation du réseau cytosquelettique autour du noyau. Notre travail montre clairement que BAF-L et *NUP210L* sont impliqués dans le même processus biologique qui assure un remodelage nucléaire efficace des spermatides.

2) *EXD1* code la protéine exonucléase 3'-5' domaine-contenant 1, impliqué dans la répression transcriptionnelle des éléments transposables, médiée par piRNAs. Notre équipe a découvert une mutation non-sens homozygote chez cinq frères infertiles présentant une oligozoospermie sévère. Nous avons étudié un modèle murin *Exdl*-KO sur un fond génétique outbred où les *Exdl^{-/-}* mâles montrent deux phénotypes: un tiers sont infertiles avec des testicules atrophiés et une oligozoospermie sévère, tandis que les autres sont fertiles avec une spermatogenèse

normale. Notre analyse de ce modèle révèle que les souris *Exd1*-KO infertiles présentent une forte dérégulation des rétrotransposons LINE-1 dans les spermatoocytes avec un blocage partiel au zygote. Dans les prospermatogonies de 34% des souris nouveau-nées *Exd1*-KO, nous avons trouvé que MIWI2, un effecteur nucléaire de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs LINE1, était exclusivement cytoplasmique, suggérant qu'un déficit de méthylation de l'ADN médiée par MIWI2, peut être la cause de l'infertilité dans nos souris *Exd1*-KO et dans le cas humain EXD1-KO. La différence de gravité phénotypique entre les souris *Exd1*-KO pourrait s'expliquer par la présence, chez les souris sévèrement affectées, d'une mutation dans un gène inconnu avec une redondance fonctionnelle par rapport à *Exd1*.

En résumé, nos résultats montrent que l'étude de la fonction par l'inactivation d'un seul gène peut être obscurcie par une redondance fonctionnelle, la fonction ne devenant apparente qu'après l'inactivation d'un deuxième gène agissant dans le même processus biologique. Il est donc prudent de considérer le digénisme ou l'oligogénisme lors de l'évaluation des variants présents chez un homme infertile et dans la validation des variants chez la souris. Notre étude démontre l'importance de l'exploration du digénisme pour la découverte de fonctions géniques et biologiques inimaginés.

Abstract

Infertility affects 15% of couples worldwide, with a male factor identified in half of cases. Genetic defects are considered to be a significant cause of male infertility either alone or in association with environmental factors. Ignorance of causal factors prevents informed evaluation of gamete genome quality and its impact on future progeny. Identifying genetic defects will be vital to understanding the pathophysiology in each case of male infertility, allowing the optimization of personalized treatment for each infertile couple.

My thesis project focuses on the functional characterization of two testis-specific genes that have been found inactivated in two separate cases of male infertility.

1) *NUP210L*, encodes a testis-specific nucleoporin. A homozygous loss-of-function mutation in *NUP210L* was identified in an infertile man exhibiting decompacted sperm heads. Our findings revealed that the inactivation of NUP210L had a mild impact on head morphology and motility (50%) but chromatin compaction remained normal, and fertility was unaffected. We then created knockout mice for *Banf2*, encoding Barrier to autointegration factor-like (BAF-L), that colocalizes with NUP210L at the caudal NE in human elongating spermatids. The absence of BAF-L shows no discernible impact on spermatogenesis or fertility. However double mutants for *Banf2* and *Nup210l* were infertile. Fertility becomes sensitive to BAF-L haploinsufficiency on the *Nup210l*^{-/-} genetic background; *Banf2*^{+/-};*Nup210l*^{-/-} and *Banf2*^{-/-};*Nup210l*^{-/-} mouse are infertile, showing a partial block at mid spermiogenesis stage with severe oligozoospermia and anomalies in the organisation of the cytoskeletal scaffolding around the nucleus. Our work provides clear evidence that BAF-L and NUP210L are involved in functionally redundant biological process required for efficient nuclear remodelling of spermatids.

2) *EXD1* encodes exonuclease 3'-5' domain-containing 1, involved in piRNAs-mediated transcriptional silencing of transposable elements. Our team discovered a homozygous nonsense mutation in five infertile brothers with severe oligozoospermia. We developed an *Exd1*-KO mouse model on an outbred genetic background. We found that homozygous KO males present two phenotypes: a severe one where one third of males analysed, phenocopy the human case with infertility, atrophied testes and severe oligozoospermia, while the other group had normal fertility, testis size and sperm count. Our analysis of this model revealed that

infertile *Exdl*-KO mice have strong de-repression of LINE-1 retrotransposons in spermatocytes with a partial block at zygonema. In the prospermatogonia of 34% of newborn *Exdl*-KO mice, we found that MIWI2, the piRNAs-guided nuclear effector of DNA methylation at LINE1 promoters, was exclusively cytoplasmic, implying that a lack of MIWI2-mediated DNA methylation at LINE-1 promoters may be the cause of infertility in our *Exdl*-KO mice and in the human *EXDI*-KO familial case. The difference in phenotypic severity between *Exdl*-KO mice could indicate that severely affected mice carry a mutation in an unknown gene with functional redundancy to *Exdl*.

In conclusion, our results show that the study of function using single gene inactivation in the mouse can be obscured by functional redundancy, with function only becoming apparent upon inactivation of a second gene that acts in the same biological process. Therefore, it is prudent to consider digenism or oligogenism during variant assessment of next generation sequencing data from infertile men and in the validation of candidate variants in mouse models. Our studies illustrate that the exploration of digenism has huge potential for the discovery of unimagined gene and biological function.