Contribution à l'étude de Topaz 1, gène indispensable pour la spermatogénèse murine

Elodie Poumerol

▶ **To cite this version:**

Elodie Poumerol. Contribution à l'étude de Topaz 1, gène indispensable pour la spermatogénèse murine. Biologie de la reproduction. 2019. hal-03213260

HAL Id: hal-03213260
https://hal.inrae.fr/hal-03213260

Submitted on 30 Apr 2021

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

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

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté
par
Elodie Poumerol

Pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Contribution à l'étude de Topaz 1, gène indispensable pour la spermatogénèse murine

Soutenu le *03 décembre 2019* **devant le jury suivant :**

Dr Mignotte Bernard	**– Président**
Dr Mandon-Pépin Béatrice	**– Tuteur scientifique**
Dr Renaud Flore	**– Tuteur pédagogique**
Dr Kocer Ayhan	**– Rapporteur**
Dr Calvel Pierre	**– Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Mandon-Pépin Béatrice
INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas

et de

Dr Renaud Flore
IGR, UMR1186 INSERM EPHE, Villejuif

Remerciements

- Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres de ce jury pour avoir accepté d'être là aujourd'hui et d'avoir travaillé sur ce manuscrit.
- Merci Flore pour ta disponibilité et ton encadrement de haute qualité durant ces années "EPHE". Merci d'avoir démêlé les petits soucis administratifs et d'avoir passé du temps à la relecture de mon manuscrit.

- Béatrice, Ah Béatrice ! Tu m'as fait une place à tes côtés, au labo, le lundi 5 septembre 2005. Il y a 14 ans. Ce diplôme n'a pris que 3 ans sur cette période, et il m'est impossible de me cantonner à ça. Alors comment trouver les mots pour remercier 14 années d'investissement ? C'est toutes ces discussions, ces théories, ces doutes, ces révélations, ces déceptions, ces échanges tellement riches et cette confiance inébranlable qui m'ont forgé. Aujourd'hui, grâce à toi j'ai confiance en moi, j'ai confiance en toi. Je ne te l'ai jamais dit aussi clairement, mais tu es bien plus à mes yeux que ma chef ou une collègue. Pour moi, tu es une amie. C'est évident maintenant. Béa, je suis comme ces C57Bl6, avec moins de poils je te l'accorde, mais tout aussi grégaire. Je n'ai pas besoin d'une organisation hiérarchique très poussée. J'ai juste besoin d'appartenir à un groupe, et on forme la base solide (et ma foi, tout aussi glamour ;) des brebis brunes, toutes les deux. Si c'était à refaire, je referai tout pareil. Ton enthousiasme, ta spontanéité, ton rire probablement capable de pulvériser les murs d'une chambre forte et ce franc parler que tu n'as à envier à personne, font de toi, très certainement, la chef la plus génialissime qui ait foulé n'importe quel lino des laboratoires du monde. Bon OK, je n'ai peut-être pas visité tous les laboratoires du monde, mais en tout cas, un nombre certain à l'INRA et je peux te dire que je mesure la chance que j'ai de t'avoir auprès de moi. Lorsque je t'ai parlé de ce diplôme EPHE, tu n'as pas réfléchi une seconde et tu m'as soutenu dès le départ. Même si ça signifiait me voir disparaitre du labo les 5 semaines d'enseignement! Les moments où j'ai douté, où Topaz1 avait décidé de m'emmener vers la complication plutôt que la simplicité, tu as toujours su trouver les mots pour me remotiver. Un peu comme une tablette de chocolat au lait Lindor (c'est là que tu te rends compte du degré d'importance de la comparaison), une discussion dans ton bureau me redonnait du courage et me permettait d'entrevoir de la lumière où je ne voyais plus que la pénombre. Et en parlant de pénombre, merci pour ces heures passées à la correction de mon manuscrit. Pour tout ça, et tellement plus encore, MERCI d'être là pour moi Béa.

- Merci à toi Eric, de m'avoir soutenu dans ce projet, de m'avoir fait confiance, et d'avoir fait tomber ces barrières stériles entre sciences et technique.
- Merci Geneviève pour cette énergie folle dont tu débordes.

❖ Merci Dominique pour ces discussions improbables qui finissent souvent en prise de positions plus que radicales mais qui poussent à réfléchir sur ce qui nous entoure.

❖ Merci Maëlle et Aurélie pour votre enthousiasme et pour arriver à glisser une subtile féminité dans les projets les plus « Mâles » (franchement, ça fait du bien).

❖ Merci Marjo pour ton soutien indéfectible, ça fait 7 ans qu'on se serre les coudes, et tu pourras toujours compter sur mon soutien comme j'ai toujours pu compter sur le tien.

❖ Merci à Adrie, Ayhan, Alix et Manon. A tous les stagiaires de passage qui m'ont beaucoup apporté en termes de réflexion et de remise en question.

❖ Merci à Corinne d'avoir cru en moi.

❖ Merci Bruno, pour ces moments « café » sur le caillou du 440 à échafauder tout un tas d'hypothèses et de stratégies plus ou moins farfelues, pour élucider ce « mystère du Topaz ». Nos discussions m'ont clairement appris que tout est possible et qu'il ne faut surtout pas se mettre de barrière. J'aurais dû faire le compte du nombre de fois où on a prononcé : « Mais imagine que..., Du coup on pourrait faire…, Et comme ça on montre que..., Oh ! Tiens regardes, un rougequeue noir ! ». Merci pour tout, Bruno.

❖ Merci à l'équipe M.O.D.I.T et à Marthe pour leur « accueil bonjour » et nos discussions matinales autour des souris et de la transgénèse. Vous êtes un peu mon labo d'adoption après tout.

❖ Enfin, MERCI à ma maman et à ma mamie, à qui je fais des bilans de manip depuis des années, et qui abondent toujours dans mon sens, sans forcément saisir tous les tenants et les aboutissants de mes élucubrations. Vous êtes les femmes les plus fortes que j'ai pu rencontrer. Fière de vous.

Sommaire

Abreviations 2

Liste des illustrations 4

I. Introduction 9

A. Le testicule 9

B. La méiose 14

1. La prophase I 15

2. La métaphase I 17

3. L'anaphase I 17

4. La télophase I 18

5. La méiose II 18

C. Découverte de Topaz1 21

D. Objectifs 26

II. Méthodologies 27

A. Maintien de la lignée d'animaux transgéniques. 27

1. KI Topaz1 en C57Bl6. 27

B. Génotypage des souris. 27

1. Extraction de l'ADN génomique. 27

2. Génotypage des animaux. 28

3. Extraction des ARN totaux. 29

C. Phénotypage des souris. 29

1. Immunohistologie sur coupe. 29

2. Immunohistologie sur étalement chromosomique. 34

3. Préparation pour Microscpopie Electronique en transmission (M.E.T). 35

III. Partie 1 : Etude du blocage méiotique par des techniques histologiques 35

A. Résultats : 35

1. Localisation de l'ARNm de Topaz1 par HIS 36

2. Étude de protéines impliquées dans la transition prophase I-métaphase I 38

3. Étude des marques de méthylation du centromère. 46

4. Étude des centrioles nécessaires à la mise en place du réseau de microtubules. 50

B. Discussion : 54

IV. Partie 2 : Analyses transcriptomiques associées à l'étude du rôle de Topaz1 61

A. Résultats : 61

1. Analyse transcriptionnelle des testicules de souris Topaz1$^{-/-}$. 61

B. Discussion : 78
V. Conclusions et perspectives : 81

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
AUS	*Antigen Unmasking Solutions*
BET	bromure d'éthidium
dapB	straindihydrodipicolinate réductase (*bacillus subtilis*)
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
HIS	hybridation *In Situ*
ICS	institut clinique de la souris
j*pc*	jour *post-coitum*
j*pp*	jour *post-partum*
KI	knock in
KO	knock out
lncRNA	ARN long non-codant
Log2FC	log2 fold-change (si inférieur à -1 = 2 fois moins de transcrit, si supérieur à 1 = 2 fois plus de transcrit)
MCP	matériel péricentriolaire
MET	Microscopie Electronique en Transmission
miRNA	microARN
MTOC	microtubule organizing center
p-value	probabilité de sélectionner de gènes faux positifs
PAZ	piwi argonaute zwille
PAF	paraformaldéhyde

PCR	polymerase chain reaction
Pb	paire de bases
PBS	phosphate buffer saline
piRNA	piwi-interacting *RNA*
Ppib	peptidylprolyl-isomérase B
qPCR	PCR quantitative
RT	reverse transcription
SCP	synaptonemal complex protein
siRNA	small interfering RNA
SMC	Structural maintenance of chromosome
Topaz1	testis and ovary-specific PAZ domain gene 1
vol/vol	volume à volume égal
WT	wild-type
αTub	alpha Tubuline
βTub	beta Tubuline
γTub	gamma Tubuline
γ-TuRC	gamma Tubulin Ring Complex
γ-TuSC	gamma Tubulin Small Complex

Liste des illustrations

Figure 1. Coupe transversale d'un testicule murin adulte.

Figure 2. Représentation schématique d'un testicule et d'un tube séminifère.

Figure 3. Stades de la spermatogénèse chez la souris.

Figure 4. Représentation schématique du kinétochore et son devenir.

Figure 5 : Structure et expression du gène *Topaz1* de mouton.

Figure 6 : Photographie et histologie de testicules issus de souris WT (*Topaz1*$^{+/+}$) ou *Topaz1*$^{-/-}$. Apoptose dans les testicules de souris WT et *Topaz1*$^{-/-}$. Immuno-marquage de EZH2 dans ces mêmes testicules.

Figure 7 : Coupe de testicules de souris présentant des métaphases normales chez les souris *Topaz1*$^{+/+}$ et anormales chez les souris *Topaz1*$^{-/-}$.

Figure 8 : Génotypage des souris *Topaz1*$^{-/-}$ sur gel d'agarose.

Figure 9 : Concept d'hybridation *in situ* par la technique du RNAscope (ACDbio).

Figure 10 Hybridation *in situ* sur coupe de testicules à 20 j*pc* et adultes, de souris *Topaz1*$^{+/+}$ *versus Topaz1*$^{-/-}$.

Figure 11 : Complexe cyclique γ-tubuline (γTuRC).

Figure 12 : Immunomarquage αTubuline sur coupe de testicules à 30 j*pc* de souris WT *versus Topaz1*$^{-/-}$*.*

Figure 13 : Immunomarquage γTubuline sur coupe de testicules à 30 j*pc* de souris WT *versus Topaz1*$^{-/-}$*.*

Figure 14: Immunomarquage sur étalements chromosomiques de la protéine SYCP3.

Figure 15 : Immunomarquage sur étalements chromosomiques des protéines Meikin, Rec8, SA2, Smc1β et SYCP3.

Figure 16 : Immunomarquage sur étalements chromosomiques des centromères

Figure 17 : Représentation schématique d'un chromosome de souris en pachytène de méiose I.

Figure 18 : Immunomarquage sur étalements chromosomiques des Histones H3K9 trimethylées.

Figure 19 : Immunomarquage sur étalements chromosomiques des Histones H4K20 trimethylées.

Figure 20 : Coupes de testicules de souris à 28 j*pp* *Topaz1*$^{+/+}$ et *Topaz1*$^{-/-}$ colorées en azur II et bleu de méthylène.
Figure 21 : Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de testicule de souris WT à 28 j*pp* présentant une cellule germinale en métaphase.
Figure 22 Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de testicule de souris WT à 28 j*pp* : Détail: schématisation des centrioles.
Figure 23 : Répartition par processus biologiques des transcrits des testicules de souris *Topaz1*$^{+/+}$ selon le logiciel Panther.
Figure 24 Répartition par processus biologiques des transcrits différentiellement exprimés entre des testicules de 18,5 j*pp* de souris *Topaz1*$^{-/-}$ *versusTopaz1*$^{+/+}$.
Figure 25 : Répartition par processus biologiques des transcrits différentiellement exprimés entre des testicules de 18.5 j*pp* de souris *Topaz1*$^{-/-}$ *versusTopaz1*$^{+/+}$.
Figure 26 Probabilités d'interaction entre lncRNA-Chr10 et MYBL1, MOV10L1 ou TOPAZ1.
Figure 27 Représentation du gène codant pour le lncRNA-Chr10.
Figure 28 : Expression relative de Topaz1 (A) et du LncRNA-Chr10 (B) chez la souris WT de la naissance au stade adulte.
Figure 29 : Expression relative de LncRNA-Chr10 dans différents tissus chez la souris WT adulte. Hybridation *in situ* de LncRNA-Chr10 dans les testicules de 20 jpp et adultes de souris Topaz1$^{+/+}$ et Topaz1$^{-/-}$.

Figure 30: Expression relative des 4 exons du *lncRNA-Chr10* et de l'exon 2 de *Topaz1* dans des testicules de souris adultes WT.
Figure 31: Représentation schématique de l'ADNg du lncRNA-Chr10 et des couples d'amorces utilisées pour les PCR.
Figure 32 : Représentation schématique de l'extrémité 5' de l'ADNg du *lncRNA-Chr10* et des couples d'amorces de PCR. Produits de PCR obtenus à partir d'ADNg ou d'ADNc issus de testicules de souris WT.
Figure 33 : Représentation schématique de l'extrémité 3' de l'ADNg du *lncRNA-Chr10* et des couples d'amorces de PCR. Produits de PCR obtenus à partir d'ADNg ou d'ADNc issus de testicules de souris WT.
Figure 34 : Représentation schématique de la stratégie d'invalidation du gène *LncRNA-Chr10*.
Figure 35 : Génotypage des souris obtenues selon la stratégie 1, et la stratégie 2.

Avant-propos

La reproduction est un phénomène fondamental pour la survie et l'évolution des espèces. Un nombre important de mécanismes génétiques et moléculaires est impliqué dans la fonction de reproduction et de développement dans le règne animal. Ainsi, l'étude de ces mécanismes permet, entre autre, de mettre en évidence les étapes de détermination du sexe, la mise en place des gonades et les différentes étapes de la formation des gamètes qui diffèrent en fonction du sexe. Ces mécanismes sont régulés par de nombreux gènes intervenant à différents temps de développement et permettant le bon déroulement de toutes ces étapes.

La reproduction sexuée permet, à partir d'un gamète mâle et d'un gamète femelle, la formation et le développement d'un nouvel individu. Les gamètes sont des cellules hautement spécialisées permettant la transmission à la descendance d'un lot haploïde de chromosomes issu de chaque parent. Les cellules haploïdes donnant des gamètes fonctionnels sont formées à partir de cellules germinales diploïdes grâce à la méiose. Ce processus de méiose se déroule différemment dans le temps entre un individu mâle ou femelle. Néanmoins, le bon déroulement de la méiose dans les deux sexes est indispensable pour permettre l'obtention de cellules germinales haploïdes. Un dysfonctionnement dans une des différentes étapes de la méiose peut entrainer des défauts de reproduction et une stérilité de l'individu.

L'unité mixte de recherche de Biologie du Développement et Reproduction (BDR) de l'INRA vise notamment à améliorer l'efficacité de reproduction des mammifères d'élevage. L'équipe "Différenciation des Gonades et ses Perturbations", dans laquelle j'effectue mes travaux de recherche, étudie la différenciation des gonades de mammifères en conditions normale ou perturbée (pathologique, environnementale). La formation et la différenciation des gonades chez les mammifères débutent pendant la vie embryonnaire et ne s'achèvent qu'après la naissance. Ces premières étapes de différenciation et d'interaction entre cellules germinales et cellules somatiques sont déterminantes pour assurer une production de gamètes adéquate et ainsi, une fonction de reproduction normale chez l'adulte.

I. Introduction

A. Le testicule

Le testicule est un organe essentiel de l'appareil reproducteur mâle puisque c'est le lieu de synthèse des cellules spécialisées dans la reproduction : les spermatozoïdes, capable de transmettre l'information génétique à la descendance.

Le testicule est organisé en lobules contenant des tubes (ou cordons) séminifères (Figure 1). Différents types cellulaires composent un testicule :

- Des cellules à l'intérieur des tubes séminifères avec les cellules germinales à différents niveaux de différenciation, et les cellules de Sertoli qui permettent de soutenir la structure en cordon et qui sont des cellules nourricières pour les cellules germinales. Ces cellules sont elles-mêmes entourées d'une lame basale. Les cellules de Sertoli s'étendent de la lame basale jusqu'à la lumière des tubules et les différentes cellules germinales viennent s'enchâsser dans ou entre les cellules de Sertoli pour constituer l'épithélium séminifère.
- De cellules entres les cordons: les cellules péritubulaires myoïdes qui délimitent les cordons séminifères, et les cellules de Leydig qui sont les cellules stéroïdogènes testiculaires produisant des facteurs de croissance et des androgènes.

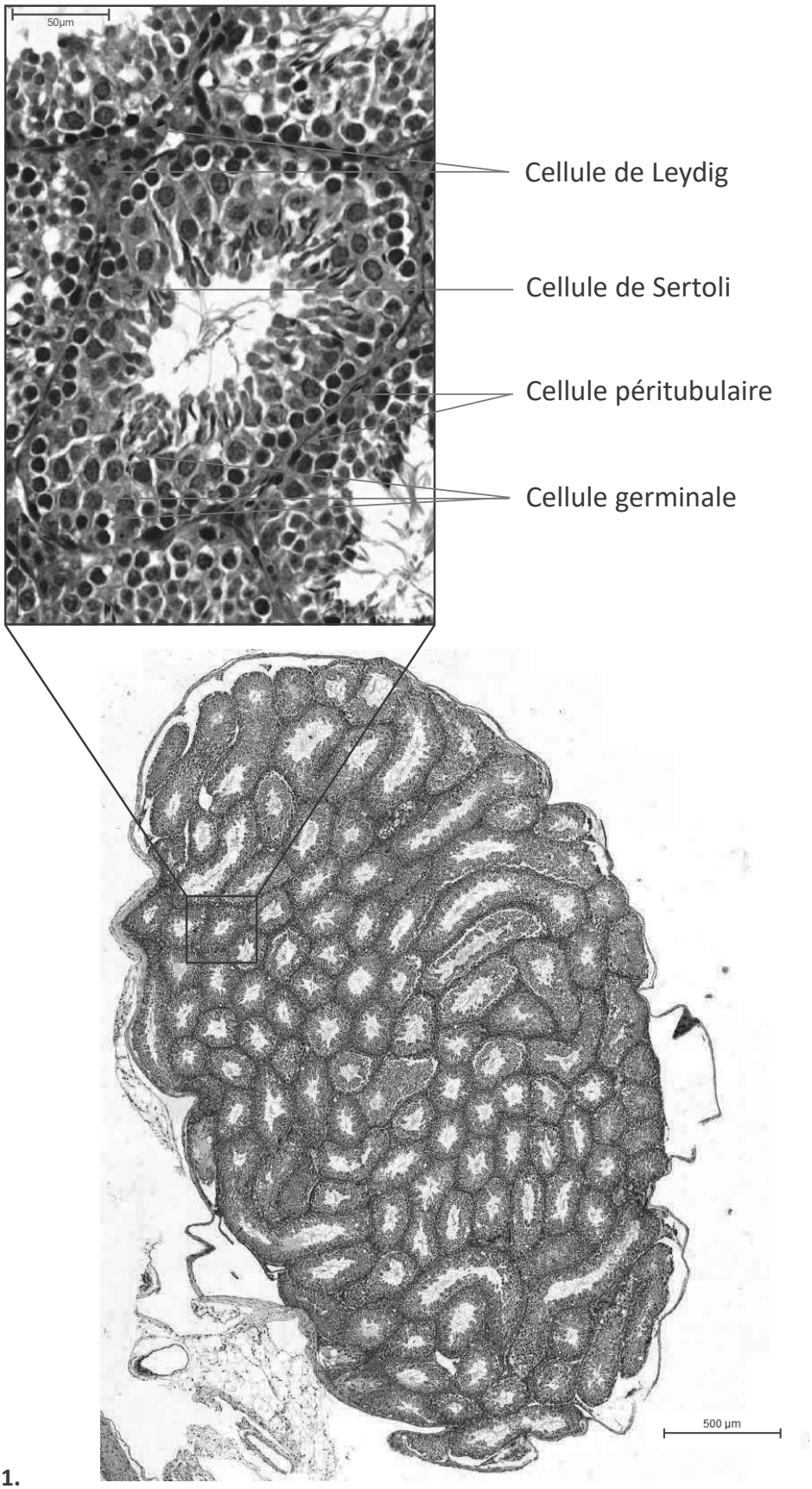


Figure 1.
Coupe transversale d'un testicule murin adulte (Echelle : 500µm).
Détail : tube séminifère et tissus extra-tubulaire (Echelle : 50µm).

La production des spermatozoïdes débute à partir des cellules germinales souches diploïdes: les spermatogonies. Le processus de différenciation cellulaire conduisant les spermatogonies en spermatozoïdes se nomme la spermatogenèse. Ce processus est divisé en 3 grandes étapes (Figure 2):

- une phase proliférative avec l'auto-renouvèlement des spermatogonies et de mitoses rapides,
- la méiose qui permet la formation de 4 cellules haploïdes (spermatides) à partir d'une cellule germinale,
- la spermiogenèse permettant la métamorphose des spermatides issus de la méiose, en spermatozoïdes.

La durée de la spermatogenèse est d'environ 35 jours chez la souris; 74 jours chez l'homme (1).

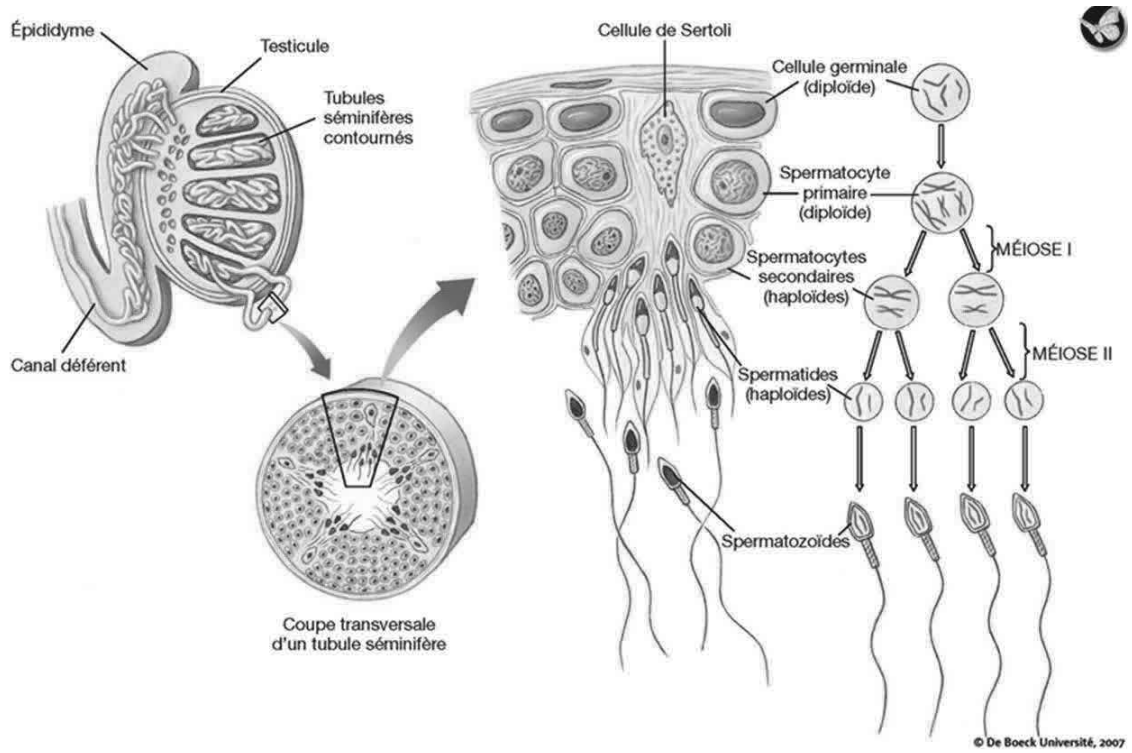


Figure 2.
Représentation schématique d'un testicule et d'un tube séminifère, en coupe transversale (De Boeck Université, 2007).
Le testicule est organisé en tubes séminifères qui se rejoignent et aboutissent à l'épididyme, lui-même se terminant en canal déférent. En coupe transversale, le tube séminifère présente un épithélium séminifère constitué de cellules de Sertoli entourant les cellules germinales en méiose.

L'évolution de la spermatogenèse est coordonnée aussi bien dans le sens transversal des tubes (sens de différenciation des cellules germinale) et dans le sens longitudinal (les stades du cycle de l'épithélium séminifère distribués le long du tubule dans un ordre chronologique) (Figure 3). L'observation histologique d'une coupe transversale de tube séminifère présente toujours l'association, par superposition de cellules germinales de la périphérie vers la lumière des cordons, à différents niveaux de différenciation. Les cellules germinales les moins différenciées (spermatogonies) se trouvent vers la périphérie du tube séminifère, jusqu'aux cellules les plus différenciées (spermatozoïdes) se trouvant près de la lumière des tubes séminifères. Entre les 2, on retrouve les cellules en cours de développement: spermatocytes I et II, et spermatides rondes ou allongées.

Les différentes combinaisons de superpositions des cellules germinales en différenciation constituent les « stades » de l'épithélium séminifère (Figure 3).

En 1901, Regaud définit que ≪ la vague spermatogénique est dans l'espace, ce que le cycle de l'épithélium est dans le temps ≫. En un point donné du tube, la succession chronologique d'une série complète des différentes combinaisons jusqu'à la réapparition de la première combinaison constitue un cycle de l'épithélium séminifère.

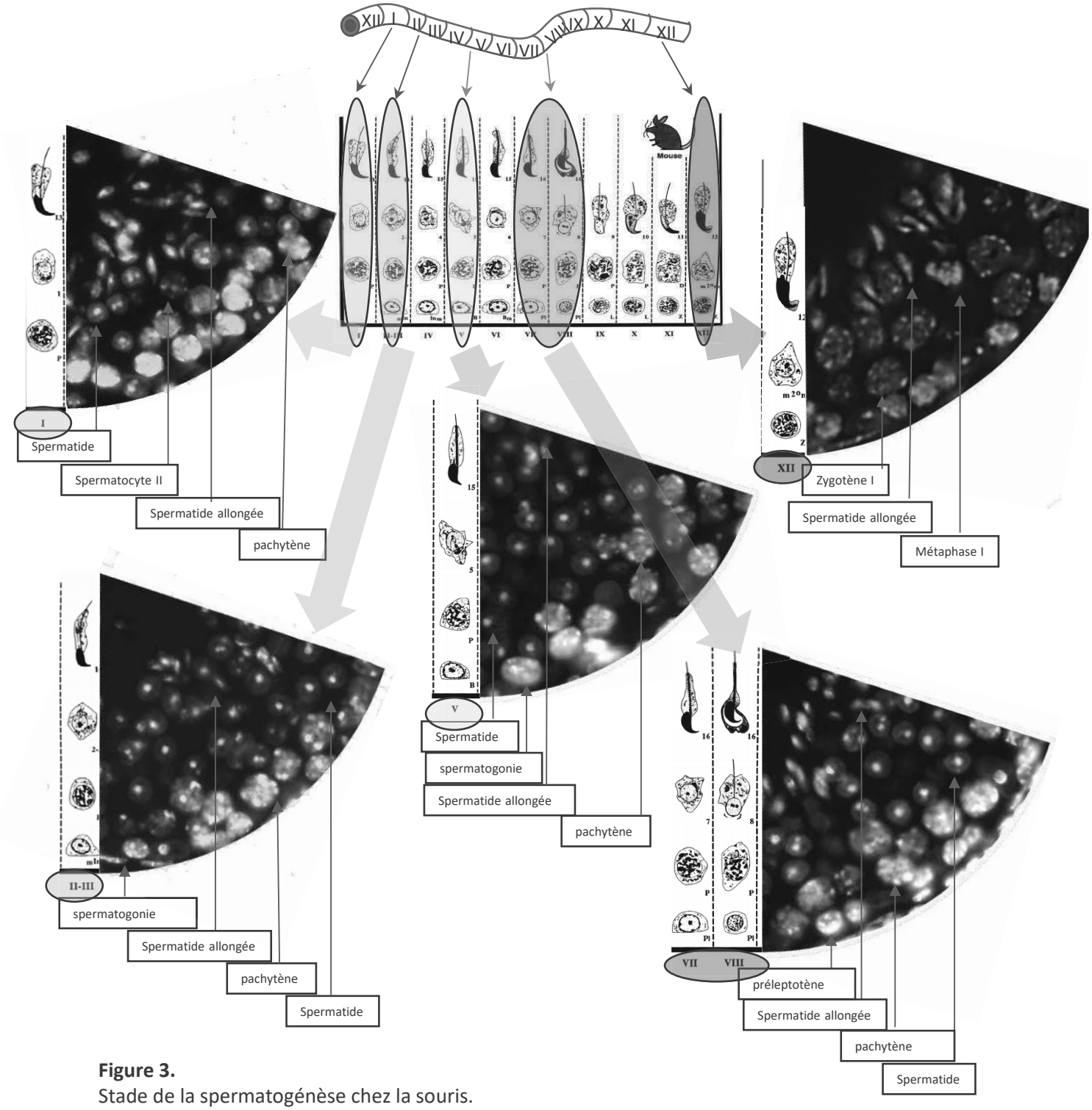


Figure 3.

Stade de la spermatogénèse chez la souris.

Chacune des colonnes notées de I à XII désigne les stades de la spermatogénèse.

Une section de tube séminifère est rapportée au stade du tube séminifère correspondant. La composition en cellules germinales de stade différents varie en fonction de sa localisation dans le tube séminifère.

Composition au stade I: spermatide, spermatocyte II, spermatide allongée et pachytène.

Composition au stade II et III: spermatogonie, spermatide allongée, pachytène et spermatide.

Composition au stade V: spermatogonie, spermatide, spermatide allongée et pachytène.

Composition au stade VII et VIII: préleptotène, spermatide, spermatide allongée et pachytène.

Composition au stade XII: zygotène I, spermatide allongée et métaphase I.

Issu de Russel et al., 1990, Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater (Fl) Cacoe River Presse, pp 286.

B. La méiose

La méiose mâle est le mécanisme par lequel une cellule germinale mâle, la spermatogonie, aboutit à la formation de 4 gamètes haploïdes, contrairement à la méiose femelle, où la moitié des chromosomes ségrégés, suite à la première division de méiose, est expulsée dans un premier globule polaire, et où la moitié des chromatides issus de la seconde division de méiose, est expulsée, à son tour, dans un deuxième globule polaire au moment de la fécondation. La méiose, dans les deux sexes, combine plusieurs évènements successifs : une réplication pré-méiotique, suivie de la première division de méiose (Méiose I, dite division réductionnelle) et de la seconde division de méiose (Méiose II, dite réduction équationnelle).

Chez le mâle, le début de la spermatogenèse est associé à une succession de mitoses des spermatogonies (spermatogonies A et B) qui assurent le maintien de la population des cellules germinales puis une dernière mitose aboutie à un spermatocyte primaire diploïdes (spermatocyte I). A l'issue de la méiose I, ce spermatocyte I aboutira à la formation deux cellules haploïdes appelés spermatocytes II, contenant chacun un des chromosomes homologues. Ainsi chaque spermatocyte II possèdera soit le chromosome de provenance paternelle soit le chromosome de provenance maternelle.
A l'issus de la méiose II, le spermatocyte II subira une séparation de chaque chromatide sœur pour aboutir à 2 spermatides rondes. Chaque spermatide ronde possèdera alors une chromatide sœur du chromosome hérité lors de la méiose I.
La méiose mâle débute après la naissance. Chez la souris, elle débute vers 10 jours pour enclencher la première vague de spermatogenèse. A partir de ce moment précis, la spermatogénèse s'effectue de façon continue, par vague successive, tout au long de la vie adulte du mâle. La méiose de la première vague couvre la période de 10 à 18 jours chez la souris mâle avec apparition des premières cellules haploïdes vers 18 jours. Ces deux évènements méiotiques, méiose I et II, peuvent se divisées en 4 étapes : La prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (bien que l'étape de prophase II soit inexistante).

1. La prophase I

La prophase I est l'étape la plus longue dans le temps où les chromosomes vont subir des changements d'état importants. Cette étape est elle-même subdivisée en 4 phases : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène.

Au préalable, les spermatocytes entament une phase S où leur contenu en ADN est dédoublé (stade pré-leptotène).

Au stade leptotène, correspondant à l'entrée en méiose, le volume du noyau des spermatocytes augmente progressivement lorsque les chromosomes se condensent. A ce stade, débute la mise en place d'un complexe protéique (qui sera complètement formé qu'au stade pachytène, stade plus tardif), appelé complexe synaptonémal, et qui permettra l'appariement des chromosomes homologues. Le complexe synaptonémal est constitué, entre autre, des protéines axiales comme SCP2 (*Synaptonemal complex protein 2*) et SCP3 en association avec des cohésines.

C'est suite à cette condensation des chromosomes que vont s'observer les premiers évènements de recombinaisons. La recombinaison méiotique correspond à la formation de cassures double-brins puis à la réparation de ces cassures double-brins par recombinaison homologue. La recombinaison s'effectue en utilisant la chromatide sœur du chromosome homologue, le double brin intact servant de modèle pour la réparation du brin cassé. A peu près au même moment, les télomères se fixent à l'enveloppe nucléaire afin de former un cluster de télomères destiné à favoriser l'appariement des chromosomes homologues.

Au stade zygotène, un élément transversal du complexe synaptonémal, SCP1, interagissant avec les protéines SCP2 et SCP3 situées le long de chacune des chromatides sœurs au stade leptotène, va permettre l'appariement les chromosomes homologues. A ce stade, la majorité des cassures de l'ADN sont réparées sans échange des brins d'ADN homologues. Cependant, une minorité des cassures sont réparées en crossing-over, entrainant un échange réciproque d'ADN des chromosomes homologues. La majorité des crossing-over auront lieu plus tard, au stade pachytène.

Le stade pachytène, peut être subdivisé en 3 états distincts : pachytène précoce, pachytène intermédiaire, et pachytène tardif. Le pachytène est le stade le plus long des stades de la prophase (5-6 jours chez la souris). Au pachytène, le noyau des spermatocytes est très volumineux, et les chromosomes sont visibles en histologie

(après coloration de type hématoxyline-éosine par exemple). Tous les chromosomes autosomiques homologues sont appariés. Les chromosomes X et Y, sont appariés uniquement sur leur région pseudo-autosomale (PAR pour pseudo-autosomal region en anglais). Cet appariement partiel des chromosomes X et Y mène à la formation d'un complexe protéique appelé XY body (ou vésicule sexuelle) au niveau de la PAR. Le XY body est responsable de l'arrêt de la transcription des chromosomes X et Y grâce à un mécanisme appelée MSCI pour Meiotic Sex Chromosomes Inactivation (2). Le MSCI mis en place dès le stade pachytène précoce, restera en place jusqu'au stade suivant, le diplotène. Au stade pachytène intermédiaire, les chromosomes X et Y subissent des modifications post-transcriptionnelles, comme la déacétylation des histones H3 et H4 et la diméthylation de l'histone H3. Ces modifications post-transcriptionnelles ont pour objectif de maintenir le MSCI. Au stade pachytène tardif, les chromosomes homologues sont complètement appariés grâce au complexe synaptonémal et les recombinaisons homologues se poursuivent par crossing-over.

Au stade diplotène, le complexe synaptonémal se dissocie progressivement. La disparition de SCP1, protéines de l'élément transversal du complexe synaptonémal, permet la séparation des chromosomes homologues. Tandis que SCP3, précédemment localisé le long des chromatides sœurs, va se délocaliser sur la région centromérique, entre les deux chromatides sœurs (3,4). A ce stade, au moins un crossing-over subsiste par paire de chromosomes homologues grâce auquel les chromosomes restent liés l'un à l'autre.

Au stade diacinèse, l'enveloppe nucléaire se fragmente. Dans un même temps les fuseaux méiotiques s'organisent à partir des pôles opposés du noyau. Ces pôles sont les deux centres d'organisation des microtubules (MTOC, MicroTubule Organizing Center) et sont aussi appelés centrosomes. La présence d'au moins un chiasma par paire de chromosomes homologues assure le bon positionnement des chromosomes homologues pendant la première division méiotique et donc la ségrégation correcte de ces chromosomes. En effet, la ségrégation des chromosomes homologues nécessite un lien physique permettant ainsi une orientation correcte des paires de chromosomes sur le fuseau méiotique lors de la métaphase I.

2. La métaphase I

La métaphase de première division de méiose correspond à l'alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique. Elle peut être divisée en deux phases : la pro-métaphase et la métaphase.

En pro-métaphase, le réseau de fuseau méiotique s'organise à partir du MTOC. Au niveau des centromères des chromosomes, où SCP3 du complexe synaptonémal permet le maintien des chromatides sœurs, apparaissent les kinétochores. Ce sont des complexes protéiques constitués de cohésines ubiquitaires, présentes lors de la mitose et de la méiose, comme SA2, SMC1α, STAG1 et RAD2 (5), de cohésines spécifiques à la méiose, comme SMC1β et REC8, SA3 et RAD21L (6), de MEIKIN responsable de la co-localisation de shugoshin (7) et des cohésines (Figure 4). Cette co-localisation entre shugoshin et les cohésines permet d'inhiber le clivage des cohésines par les séparases, et maintenir ainsi intact le bivalent constitué par les kinétochores des chromatides sœurs. Contrairement aux cellules en mitose ou en métaphase II, où les kinétochores sont positionnés « dos à dos » sur les chromatides soeurs, en métaphase I les kinétochores des chromatides sœurs sont localisés « côte à côte ». Ceci permet alors que les deux chromatides d'un même chromosome soient attachées au même centrosome par les microtubules. Les deux kinétochores agissent comme une seule entité, attachés tous les deux au même réseau de microtubules. On parle alors d'un attachement amphitélique des chromosomes. Au moment de la rupture de la membrane nucléaire, les kinétochores sont rapidement capturés par les microtubules en cours d'élongation. Les microtubules migrent pour former un cours fuseau. En fin de pro-métaphase, la majorité des chromosomes bivalents ont atteint le centre du fuseau méiotique.

La métaphase I est effectuée lorsque tous les chromosomes sont attachés et alignés au centre de la cellule. La métaphase I est très rapide, suivie aussitôt de l'anaphase puis de la télophase de première division méiotique.

3. L'anaphase I

En anaphase, les chromosomes homologues s'individualisent grâce à la disparition des chiasmas. Cependant, ils restent unis au niveau du centromère grâce à la persistance de MEIKIN, toujours présente aux kinétochores des chromatides sœurs. Afin de séparer les chromosomes homologues, une endopeptidase spécifique, la

séparase (8) est activée par l'activation du complexe promoteur de l'anaphase (ACP) dépendante de cdc20. Les chromosomes sont alors tirés en direction des pôles opposés de la cellule.

4. La télophase I

La disparition du fuseau méiotique et la formation d'une nouvelle membrane cellulaire, permet, en fin de télophase, la formation de deux spermatocytes secondaires contenant respectivement un chromosome de chaque paire. Les spermatocytes secondaires sont reconnaissables grâce à leur noyau de petite taille. Ils apparaissent transitoirement puisqu'ils vont très rapidement se retrouver dans le processus de la seconde division de méiose (méiose II).

5. La méiose II

La seconde division de méiose est un évènement qui ressemble à la mitose sauf qu'il n'y a pas de réplication de l'ADN au préalable. Cette division s'effectue rapidement et abouti à formation de deux cellules identiques contenant chacune une chromatide sœur issue d'un chromosome.

Contrairement à la méiose I, et en l'absence de MEIKIN (protéine spécifique de la méiose I), shugoshin et les cohésines ne restent pas co-localisées. Les séparases vont donc cliver les cohésines, et séparer les kinétochores des chromatides sœurs. Lors de la méiose II, les kinétochores sont positionnés « dos à dos » sur les chromatides soeurs, permettant un attachement monotélique au fuseau de microtubule. La méiose II permet de générer deux cellules filles identiques, les spermatides rondes, à partir d'un spermatocyte II (Figure 4).

En conclusion, les deux divisions méiotiques de la spermatogenèse permettent de générer 4 cellules filles identiques haploïdes génétiquement différentes.

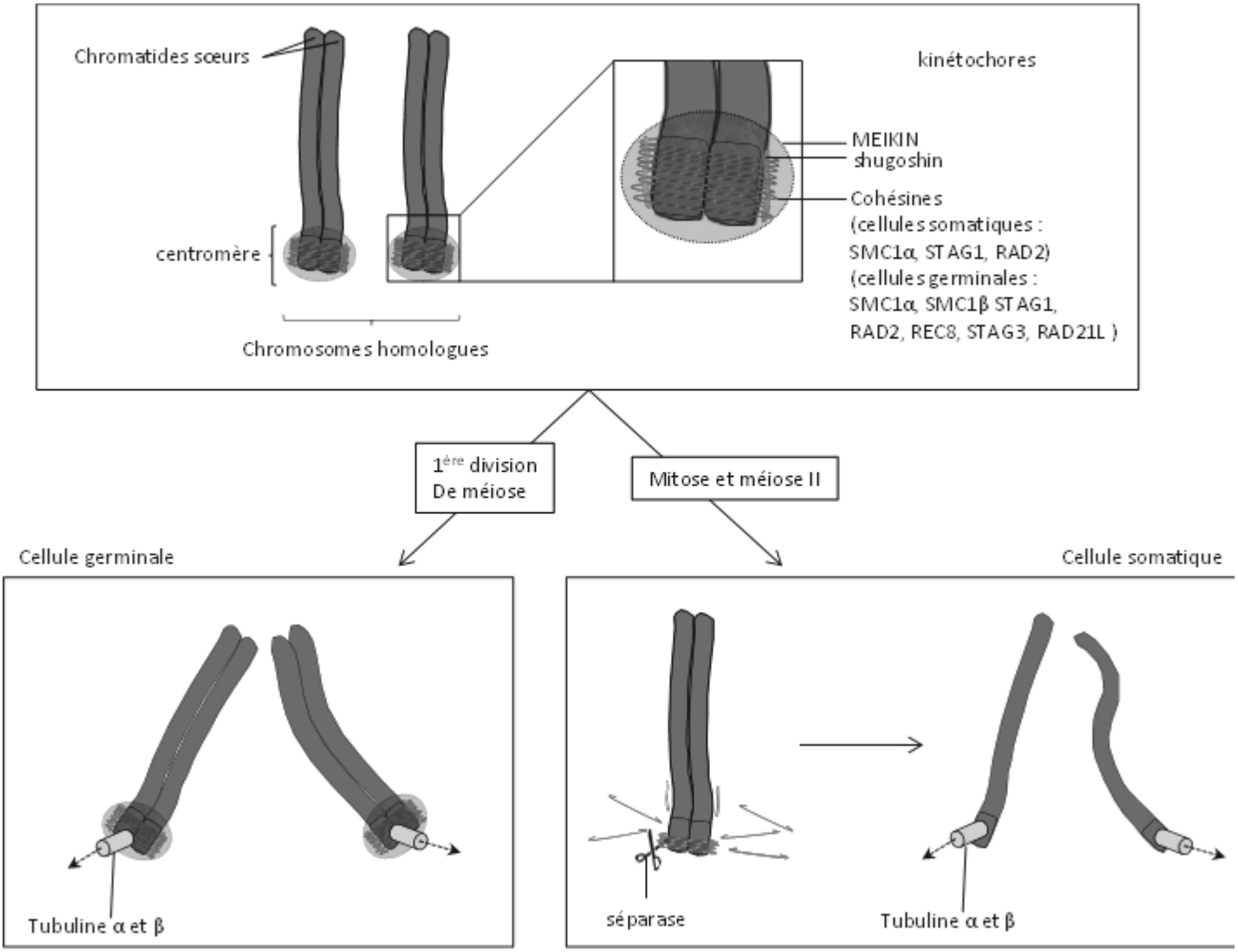


Figure 4.

Représentation schématique du kinétochore des chromosomes et du devenir de celui-ci en fonction de système engagé. Système de la 1ère division de méiose dans les cellules germinales (encadré de gauche) ou système de mitose et de 2nd division de méiose (encadré de droite). Les chromatides sœurs de chaque chromosome homologues en bleu. Le centromère en rouge. Les cohésines en vert. Shugoshin en jaune. MEIKIN en gris. Fuseau de tubuline α et β en cylindre gris. Séparase en ciseau noirs.

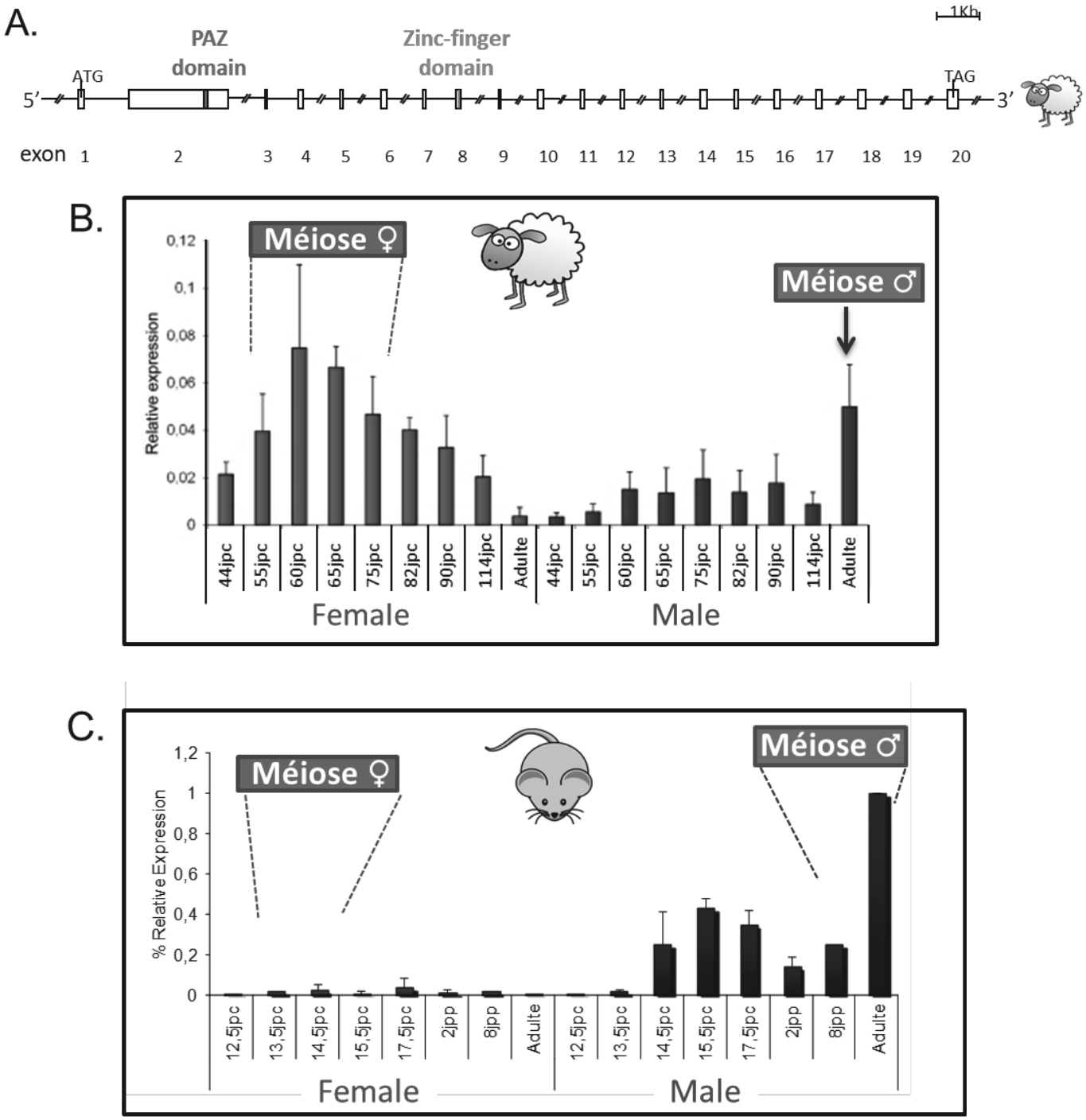


Figure 5.

(A) Structure du gène *Topaz1* de mouton. Le gène *Topaz1* possède 20 exons chez le mouton et comporte un domaine en doigt de zinc (exon 8) et un domaine PAZ (exon2).

(B) Expression relative de l'ARNm Topaz1 dans les gonades ovines mâles et femelles à différents stades de développement (de 44 à 114 j*pc* et adulte).

(C) Expression relative de l'ARNm Topaz1 dans les gonades murines mâles et femelles à différents stades de développement (de 12,5 à 17,5 j*pc*, 2 et 8 j*pp* et adulte).

C. Découverte de Topaz1

Au laboratoire, nous étudions notamment les voies de régulations impliquées dans le développement précoce (période fœtale) de l'ovaire de brebis. Ainsi, nous avons identifié un nouveau gène exprimé majoritairement lors de la méiose I dans les ovaires fœtaux de brebis. Ce nouveau gène a été appelé *Topaz1* (Testis and Ovary specific PAZ domain gene 1).

Le gène *Topaz*1 a été identifié à partir de 2 banques d'ADNc d'ovaires fœtaux de brebis générées au laboratoire, dans le but de découvrir de nouveaux gènes spécifiquement exprimés au cours de l'initiation de la prophase I de méiose ou de la formation des follicules (9,10). Il est exprimé spécifiquement au moment de la prophase I de méiose des ovaires fœtaux de brebis.

Ce gène est hautement conservé chez les vertébrés. Il possède une séquence codante de 4803 pb chez la brebis et comporte 20 exons (Figure 5A). Il comprend un domaine en doigt de zinc (exon 8) et un domaine PAZ (Piwi Argonaute Zwille) (exon 2). Les protéines contenant des domaines en doigt de zinc sont susceptibles de lier des acides nucléiques, comme par exemple les ARN. Elles présentent ainsi des fonctions de régulation à tous les stades du métabolisme des ARN messagers (épissage des pré-ARNm, transport, stabilité). Les protéines Argonautes, caractérisées par leur domaine PAZ, sont impliquées dans la répression des rétrotransposons (11). Les rétrotransposons sont des éléments correspondant à des séquences d'ADN endogènes rétro-transcrites et possédant la capacité de se dupliquer et se transposer dans le génome. Ceci altère l'information et l'organisation du génome et peut être délétère pour les cellules germinales. C'est pourquoi une régulation fine de ces éléments transposables est essentielle au maintien de l'intégrité du patrimoine génétique des cellules germinales. Les protéines Argonautes sont des acteurs essentiels de la désactivation des rétrotransposons. Elles vont se lier spécifiquement à des petits ARN (siRNA, miRNA, piRNA) qui ont pour rôle de guider les protéines Argonautes jusqu'à des ARNs cibles en vue de les rendre silencieux par interférence ARN (12). Parmi les protéines Argonautes, on trouve la famille des PIWI, exprimée essentiellement dans les gonades animales. Les PIWI, *via* leur interaction avec des petits ARN (piRNA), assurent le contrôle des

rétrotransposons au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel au cours du développement de la lignée germinale (13).

En plus de son pic d'expression au cours de la prophase I des ovaires fœtaux de brebis, nous avons montré que *Topaz1* présente un pic d'expression lors de la méiose mâle chez l'ovin (Figure 5B). La fonction de ce gène étant inconnue, nous avons également recherché son expression chez la souris. Dans cette espèce, il s'exprime majoritairement lors de la méiose mâle (Figure 5C). Les études de l'expression de *Topaz1* par RT-PCR dans différents tissus, nous ont permis de mettre en évidence une expression spécifique de *Topaz1* dans les gonades. De façon plus précise, l'étude de l'expression de *Topaz1* sur une lignée de souris *c-kit*$^{-/-}$ (14), dépourvue de cellule germinale, et en comparaison avec l'étude de l'expression de *Topaz1* sur des souris sauvages, a permis de mettre en évidence que *Topaz1* était exprimé uniquement dans les cellules germinales (2).

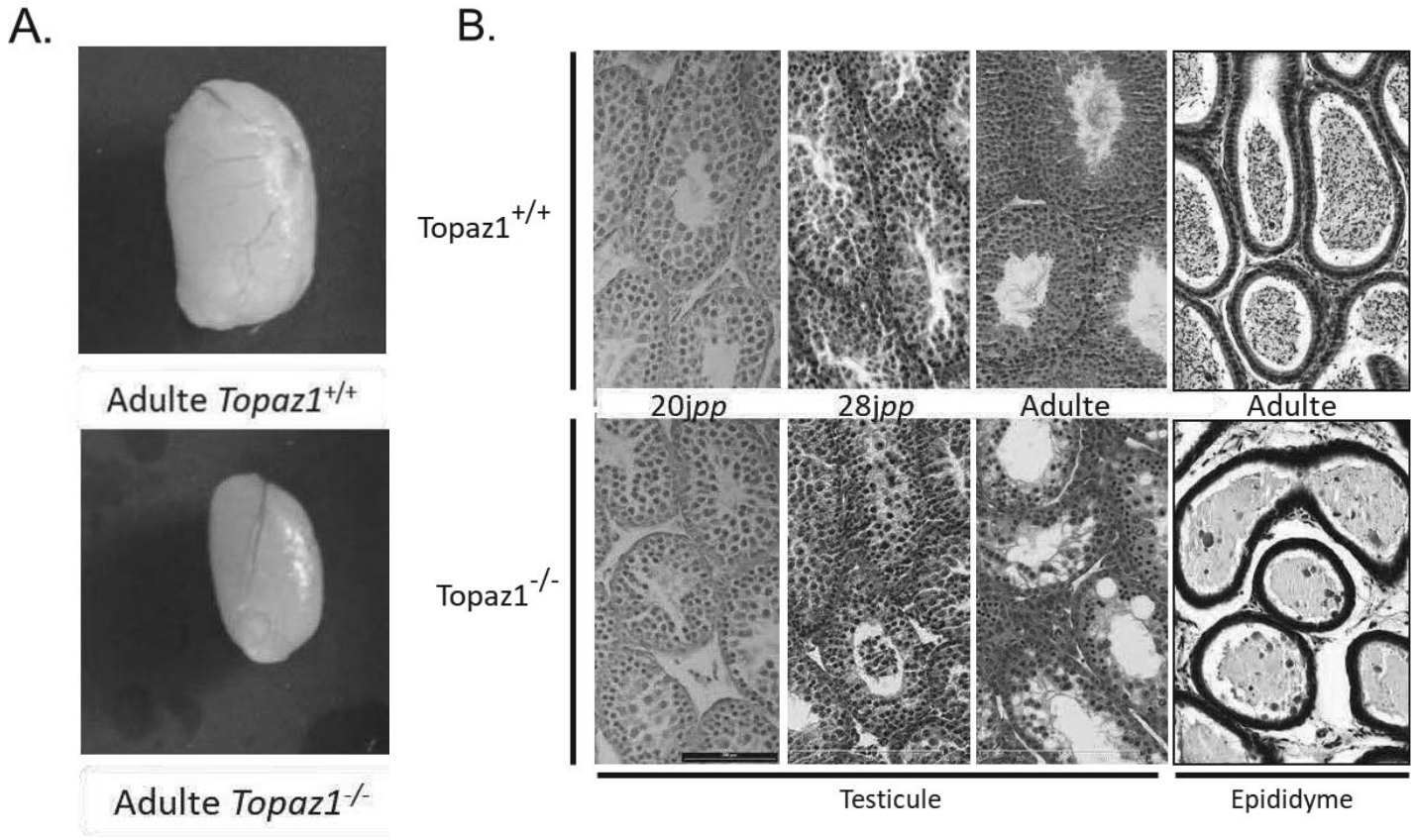
Dans le but de déterminer le rôle de *Topaz1*, une interruption de l'expression de ce gène par Knock-In (KI) a été réalisée chez la souris. Afin de faciliter la compréhension de ce manuscrit, et après vérification de l'absence de transcription de *Topaz1* dans la lignée de souris transgénique générée, j'ai choisi de nommer cette lignée *Topaz1*$^{-/-}$*.* La lignée de souris *Topaz1*$^{-/-}$ obtenue est viable et a un développement normal. Cependant, les souris mâles *Topaz1*$^{-/-}$ sont stériles contrairement aux femelles *Topaz1*$^{-/-}$ qui se reproduisent normalement. (15)

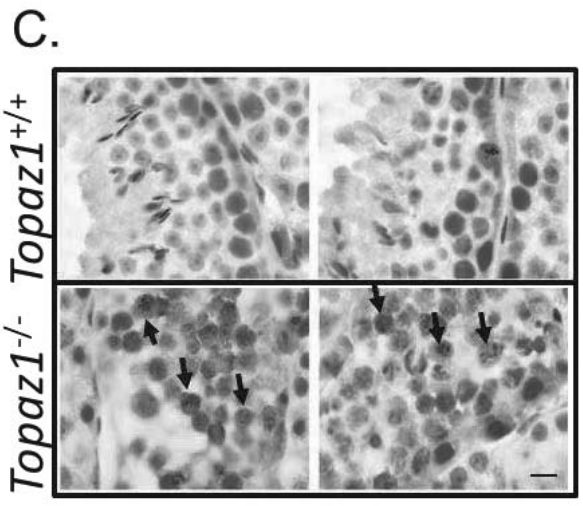
L'étude des souris mâles *Topaz*1$^{-/-}$ a permis de mettre en évidence une diminution significative de la taille des testicules de ces souris par rapport à ceux des souris *Topaz1*$^{+/+}$ (WT) et ceci dès 28 jours (28 j*pp*, jours post-partum) (Figure 6A). Des coupes histologiques de testicules *Topaz1*$^{-/-}$ révèlent une désorganisation des tubes séminifères visible également à partir de 28 j*pp*, ainsi qu'une absence de spermatozoïde dans la lumière des tubes séminifères et dans l'épididyme (Figure 6B). De plus, un marquage immunohistochimique de la protéine EZH2 (Figure 6D), spécifique des spermatides rondes, cellules haploïdes produites après la seconde division de méiose, s'avère négatif, indiquant une absence de spermatide dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$*.* Ainsi, aucune cellule germinale haploïde n'est observée dans les testicules de ces souris adultes Topaz1$^{-/-}$. Ces résultats nous permettre de conclure à un blocage méiotique pour les souris *Topaz1*$^{-/-}$. De plus, une

apoptose importante des cellules germinales mâles est également observée dans les testicules de souris Topaz1$^{-/-}$, démontrant la dégénérescence d'une grande proportion de cellules germinales (Figure 6C) (15).

Ainsi, sans le gène *Topaz1,* les souris présentent donc une désorganisation testiculaire et un arrêt de la spermatogenèse.

A la différence des souris dépourvues des gènes Piwi (les protéines Piwi contenant elles aussi un domaine PAZ) qui présentent une stérilité mâle régulièrement associée à une augmentation de l'expression des rétrotransposons, nous avons montré que les spermatocytes de souris *Topaz*1$^{-/-}$ ne montrent pas de dé-répression des rétrotransposons (15). Effectivement, le niveau d'expression d'IAPGag, Mervk et IAPdelta1, rétrotransposons à longue séquence terminale répétée (LTR) ainsi que l'expression de L1ORF et L1UTR, qui ne possède pas de LTR ne varie pas dans les testicules de souris WT et *Topaz1*$^{-/-}$.





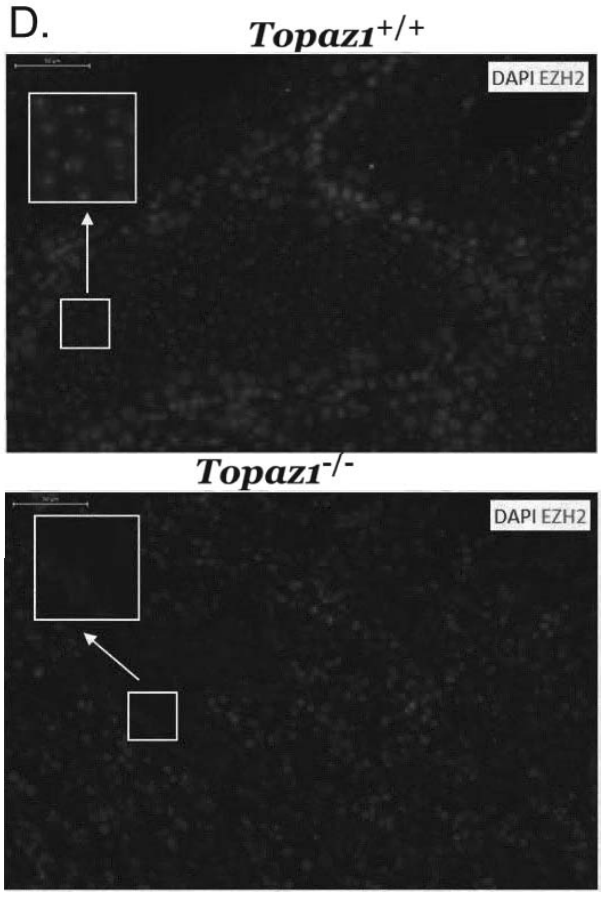


Figure 6.

(A) Photographie de testicules issus de souris WT (*Topaz1*$^{+/+}$) ou *Topaz1*$^{-/-}$ à 28 j*pp*.

(B) Coloration hématoxyline-éosine de coupes de testicules et d'épididyme à différents stades de développement (20 et 28 j*pp* puis adulte (6 mois)) chez la souris *Topaz1*$^{+/+}$ et *Topaz1*$^{-/-}$.

(C) Détection des cellules germinales en apoptose par ISEL (*In situ* End Labelling) sur des testicules de souris adultes Topaz1$^{+/+}$ et Topaz1$^{-/-}$.

(D) Immuno-marquage de EZH2 en rouge, protéine spécifique des spermatides rondes dans des testicules adultes de Topaz1$^{+/+}$ and Topaz1$^{-/-}$. Un marquage spécifique est mis en évidence dans les spermatides des animaux normaux; est absent des animaux Topaz1$^{-/-}$ indiquant une absence de spermatide dans les testicules mutants. Le DAPI permet de détecter les noyaux des cellules. (Echelle=50 µm).

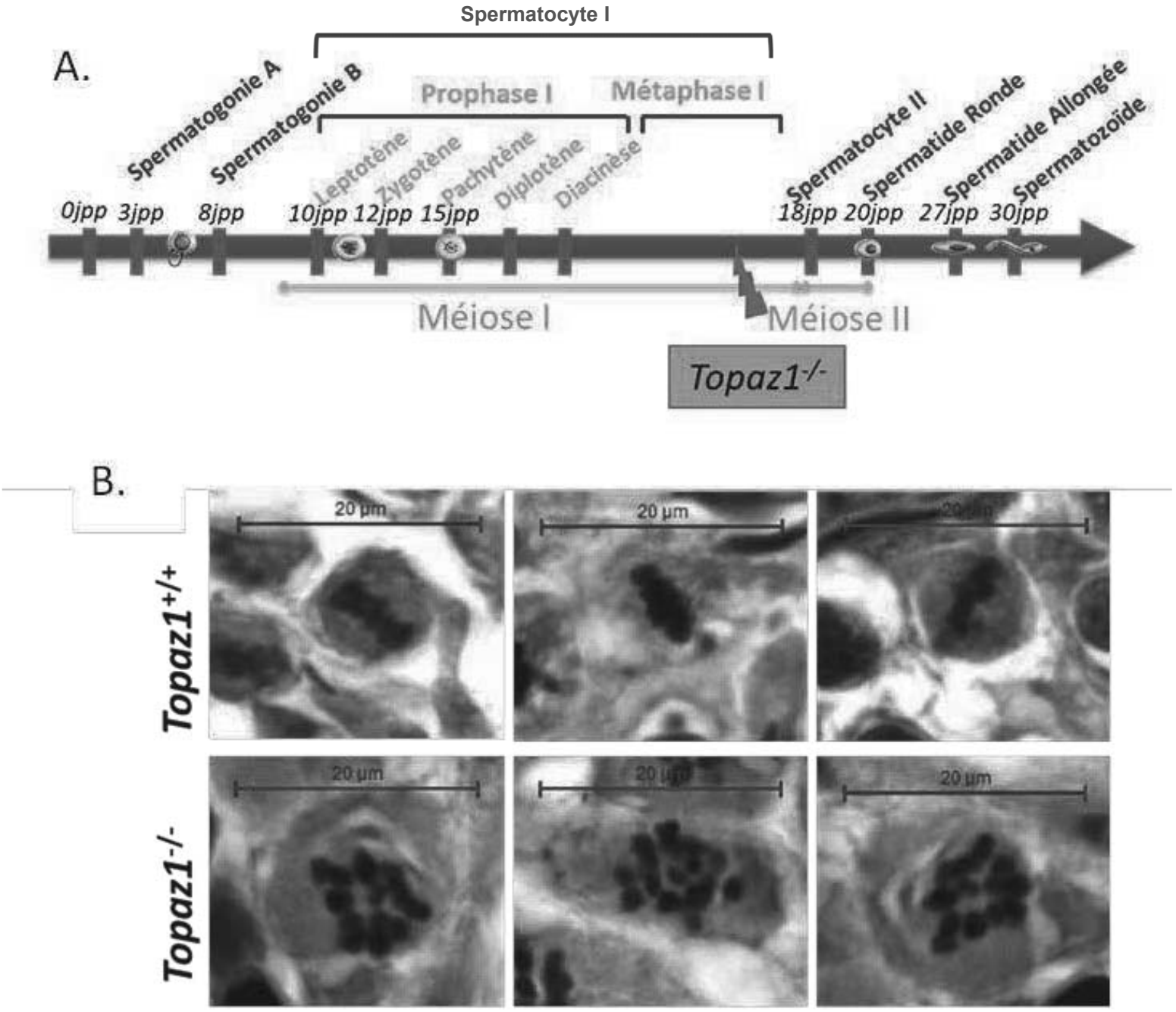


Figure 7.
(A) Schéma du déroulement de la spermatogénèse et identification du moment de blocage de la spermatogénèse dû à l'absence de *Topaz1* chez les souris *Topaz1*$^{-/-}$.
(B) Coupe de testicules de souris adultes présentant des métaphases I normales chez les souris *Topaz1*$^{+/+}$ et anormales chez les souris *Topaz1*$^{-/-}$. (Echelle = 20µm).

De plus, nous avons montré que les cellules germinales mâles initient la prophase I de méiose mais que les spermatocytes arrêtent leur progression méiotique avant la première division. Les coupes histologiques ont mis en évidence des Figures de métaphase anormales des spermatocytes I dans les testicules murins *Topaz1*$^{-/-}$: les chromosomes ne sont pas correctement placés sur la plaque équatoriale du fuseau méiotique (Figure 7A). Ainsi le blocage de la spermatogenèse, chez les souris dépourvues du gène *Topaz1*, semble avoir lieu entre le stade de fin de prophase I (diplotène) et le stade de début de métaphase (pro-métaphase) de première division de méiose qui est un point de contrôle crucial pour le bon déroulement des autres étapes méiotiques (Figure 7B) (15).

L'ensemble de ce travail a donc montré que *Topaz1* est un gène indispensable à la spermatogenèse chez la souris, pour une production adéquate des gamètes mâles.

D. Objectifs

L'objectif de ce projet est donc de caractériser la fonction du gène *Topaz1* dans la spermatogénèse murine.

- Dans un premier temps, après avoir essayé sans succès de détecter la protéine TOPAZ1 sur coupe de testicules de souris de génotype sauvage (Wild Type, WT) *versus* de testicules de souris de génotype Topaz1$^{-/-}$, faute d'anticorps spécifiques conservés, nous avons essayé de détecter l'ARNm de *Topaz1*$^{-/-}$ afin de déterminer (i) sa localisation au sein des différentes cellules germinales et (ii) sa localisation nucléaire ou cytoplasmique dans ces cellules.
- A la vue d'un appariement correct des chromosomes lors de la méiose I dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ et vu les anomalies histologiques détectées lors de l'analyse histologique de ces mêmes testicules, nous avons essayé de mettre en évidence différents éléments intervenants lors de la transition Prophase I - métaphase I.
- Nous avons enfin étudié et mis en évidence des variations de transcription entre testicules de souris WT et souris *Topaz1*$^{-/-}$.

II. Méthodologies

A. Maintien de la lignée d'animaux transgéniques.

1. KI Topaz1 en C57Bl6.

Une lignée de souris C57Bl6 dépourvue du gène *Topaz1* a été générée à l'Institut Clinique de la Souris (ICS). Pour cela, les exons 1 et 2 de ce gène ont été remplacés par le gène LacZ, empêchant ainsi la transcription du gène *Topaz1* et permettant une expression de LacZ en lieu et place de *Topaz1*. Ces souris ont intégré l'élevage, en zone expérimentale de niveau 1, de l'IERP (infectiologie expérimentale des rongeurs et des poissons) de l'INRA de Jouy-en-josas. L'obtention des souris *Topaz1*$^{-/-}$ se fait par croisement entre des femelles *Topaz1*$^{-/-}$ âgées de 2 mois à 6 mois avec des mâles *Topaz1*$^{+/-}$ âgés de 1,5 mois à 2 ans. Afin d'obtenir un stade de développement fiable pour obtention de fœtus, la visualisation d'un bouchon vaginal est contrôlé de 14 à 16h après la mise en accouplement. Les souris sont sacrifiées après la naissance par dislocation cervicale, puis les tissus d'intérêt (gonades) sont immédiatement prélevés et sont soit plongés dans de l'azote liquide (une congélation immédiate permet d'éviter la dégradation des ARN), soit immergés en Paraformaldéhyde (PAF) 4% afin de fixer les structures des cellules en vue d'études histologique et immunohistologique. Les tissus congelés sont, eux, conservés à long terme dans des congélateurs à -80°C pour des études moléculaires ultérieures.

B. Génotypage des souris.

1. Extraction de l'ADN génomique.

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) est effectuée à partir d'un petit morceau de queue de souris dissocié à la protéinase K (200µg/mL) dans un tampon adapté (Tris/HCl pH8 à 50mM, EDTA à 5mM, SDS à 1% et acétate de sodium pH=8 à 300mM). La dissociation des tissus est réalisée à 56°C pendant 3h, puis l'ADNg est séparé en phase aqueuse de Phénol/chloroforme (vol/vol). L'ADN est ensuite précité en isopropanol (vol/vol) additionné d'acétate de sodium (0.3M) et repris dans de l'eau avant d'être stocké à 4°C.

2. Génotypage des animaux.

Les souris mâles *Topaz1*$^{-/-}$ étant stériles, la production d'animaux homozygotes nécessite le croisement entre femelles homozygotes (-/-) et mâles hétérozygotes pour un rendement de 50% d'individus *Topaz1*$^{-/-}$, soit environ 25% de mâles *Topaz1*$^{-/-}$. Aussi, pour connaitre les génotypes de chacun des souriceaux, une amplification ciblée par PCR est réalisée sur l'ADNg extrait. Un couple d'amorce met en évidence le gène *Topaz1* et un couple d'amorce met en évidence LacZ. Ainsi après PCR et migration sur gel, il est déterminé le génotype de la souris : *Topaz1*$^{+/+}$, *Topaz1*$^{+/-}$ ou *Topaz1*$^{-/-}$ (Figure 8).

a) PCR.

L'amplification par PCR est réalisée à partir de 1µL à une concentration de 100ng/µL de l'ADNg d'intérêt, précédemment extrait, et 19 µL de mix contenant du tampon TAKARA 1X, des dNTP à 2mM, des oligonucléotides à 0.45µM chacun, et l'enzyme ExTaqTAKARA à 0.2U.

Les cycles de PCR se composent de 3 phases :

- 94°C pendant 30 secondes : dénaturation des doubles brins d'ADN génomique ou complémentaire,
- 60°C pendant 30 secondes : hybridation des amorces,
- 72°C permettant l'élongation des séquences cibles. Cette température correspond à la température optimale de fonctionnement de l'enzyme utilisée. Le temps pour cette étape dépend de la longueur du fragment à amplifier. Il est généralement compté 30 secondes de temps d'élongation pour 1000 pb.

Les 3 phases sont répétées 35 fois. Puis les échantillons sont conservés à 4°C.

b) Electrophorèse sur gel d'agarose.

La visualisation des produits issus de l'amplification par PCR a lieu sur gel d'agarose. Pour ce faire, on réalise un gel d'agarose à 1,5 % pour des fragments inférieurs à 1 Kb ou à 1% pour les fragments supérieurs à 1Kb, auquel sont ajoutées quelques gouttes de BET (Bromure d'éthidium) dilué au 1/100ème, soit environ 0,5µg/ml. Deux microlitres de tampon de charge (0,21% de bleu de bromophénol, 0,21% de xylène cyanol FF, 0,2M EDTA, pH 8,0, et 50% de glycérol dans de l'eau de qualité

biologique moléculaire) sont mélangés à 10 µL de produits de PCR et 11µL de ce mélange sont déposés dans chaque puits. La migration sur gel à lieu à 100V. Les produits PCR sont visibles sous un éclairage par des rayons ultra-violets.

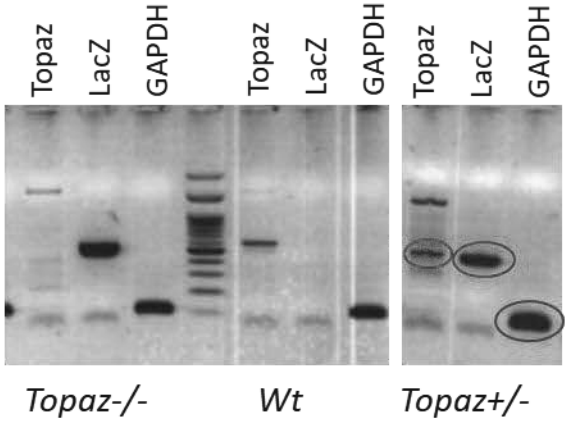


Figure 8. Génotypage des souris de la lignée Topaz1$^{-/-}$ après PCR.
Visualisation sous éclairage par des rayons ultra-violets des produits de PCR (ADN) de Topaz1 (cercle rouge, 571pb), de LacZ (cercle vert, 549pb) de GAPDH (cercle bleu, 100 pb, contrôle positif de l'expérience de PCR) sur gel d'agarose 1,5%.

3. Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux du tissu d'intérêt initialement stocké congelé à -80°C, sont extraits grâce au RNeasy Mini Kit (Quiagen), dont certaines étapes des instructions fournies avec le kit ont été adaptées à nos besoins. Les ARN sont DNasés au cours de l'extraction via une DNase (RNase-free DNAse Set, Qiagen). Une fois extraits, les ARNs totaux sont dosés au spectrophotomètre Nanodrop et la qualité de l'ARN est également évaluée par dépôt d'un aliquot sur gel d'agarose.

C. Phénotypage des souris.

1. Immunohistologie sur coupe.

a) Prétraitement des organes.

Les études immunohistochimiques sont réalisées sur des coupes de testicules de souris WT et KO après fixation de leurs organes. La fixation est effectuée en plongeant les tissus dans du Paraformaldhéyde (PAF) 4% pendant une nuit à 4°C. Ce bain de paraformaléhyde va permettre la formation de ponts disulfures entre les

atomes d'azote libres des groupements protéiques de chaque cellule. Ainsi, la formation de ce réseau permet la rigidification des cellules et restreint les activités enzymatiques qui pourraient entrainer la dégradation des composants cellulaires. La fixation d'un tissu biologique permet de conserver les structures des tissus étudiés. Les organes sont ensuite placés en éthanol 40% pendant 24h puis en éthanol 70%. L'inclusion en paraffine est effectuée à l'aide d'un automate de déshydratation et d'inclusion de la société Thermo Scientific, le Citadel 2000 Carousel, dont les bains successifs (présentés dans le tableau ci-dessous) d'éthanol, butanol et paraffine vont permettre de remplacer l'eau contenue dans le tissu par de la paraffine.

produits	concentration	temps
Ethanol	70%	30min
Ethanol	90%	30min
Ethanol	100%	1h
Ethanol	100%	1h
Ethanol/butanol (volume à volume)	100%	2h
butanol	100%	2h
paraffine	100%	3h
paraffine	100%	12h

Les organes ainsi traités sont ensuite inclus en bloc de paraffine afin d'être coupés au microtome. Les coupes de 4µm d'épaisseur sont montées sur lames. Puis, les lames sont déparaffinées à 60°C pendant 10 minutes. Les étapes de réhydratation des lames sont réalisées par bains successifs de xylène (le premier de 20 minutes, puis le suivant de 10 minutes), éthanol 100% pendant 6 minutes, éthanol 95% pendant 3 minutes, éthanol 70% pendant 3 minutes et eau distillée pendant 5 minutes. Afin de permettre aux anticorps d'accéder à leurs épitopes cibles présents dans les tissus étudiés lors de la réaction immunohistochimique, l'élimination des ponts disulfures générés lors de la fixation des tissus est nécessaire. Pour ce faire, un démasquage des épitopes antigéniques est réalisé dans une cocotte-minute sous pression pendant 3 minutes, contenant de tampon de démasquage (AUS-Vector Laboratories H3300).

b) *Immunocytochimie*

Le kit M.O.M (Mouse On Mouse de Vector Laboratories BMK-2202) est utilisé pour permettre la réalisation des réactions d'immunohistologie. Après démasquage des épitopes antigéniques, les coupes sont plongées dans un réactif de saturation permettant d'éviter l'accrochage aspécifique de l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome et donc, d'éviter ainsi un bruit de fond indésirable. Dans un second temps, les coupes sont recouvertes d'une goutte contenant l'anticorps primaire d'intérêt, pendant une nuit à 4°C. Après un lavage de 2 fois 2 minutes en PBS (Phosphate Buffer Saline 1%), les coupes sont recouvertes d'une goutte contenant l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, pendant 45 minutes à température ambiante suivi d'un lavage en PBS comme décrit précédemment. Les anticorps primaires utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

Anticorps	espèce réactive	Fournisseur	référence	dilution	Anticorps secondaire utilisé
α-tubuline	lapin	Sigma	034M4792V	1/500	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
γ-tubuline	lapin	Sigma	T5192	1/500	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Topaz C-terminal	lapin	ProteoGenix	C-term	1/200	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Topaz N-terminal	lapin	ProteoGenix	N-term	1/200	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Topaz1	lapin	Abcam	Ab184872	1/200	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Topaz1	lapin	Interchim	7737	1/200	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Dr Yoshinori Watanabe, Laboratory of Chromosome Dynamics, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Toyo, Japan					

Tableau 1: Liste des anticorps utilisés sur coupe et leur condition d'utilisation.

Les lames sont ensuite colorées au DAPI (dilué au 1/1000 en PBS). Les échantillons sont ensuite protégés par une lamelle fixée avec une goutte d'Eukitt (Sigma-Aldrich), et observées au microscope à fluorescence ou conservées à 4°C pendant 10 jours maximum.

c) *Hybridation in situ*

Des coupes fixées toute la nuit au PAF 4% ont été utilisées pour l'hybridation *in situ* selon la technique RNAscope®. Les sondes utilisées ont été personnalisées par Advanced Cell Diagnostics (ACD, Hayward, CA). Quarante sondes de 25 bases couvrant 1 kb de l'ARNm *Topaz1* de la souris (NM 001199736.1) ont été choisies et préparées par la société ACD. Les sondes témoins spécifiques des ARNm codant

pour la straindihydrodipicolinate réductase (dapB) de *Bacillus subtilis* et la peptidylprolyl-isomérase B (Ppib) ont été commandées auprès de l'ACD, respectivement en tant que contrôles négatif et positif. La sonde positive Ppib a été choisei pour sa particularité d'être transcrite d'un niveau d'expression comparable à celui de l'ARN Topaz1. Les étapes de prétraitement à la protéinase K (issue du kit et diluée au 1/15ème), d'hybridation de sonde, de pré-amplification, d'amplification, de marquage et de coloration globale ont été effectuées conformément au manuel d'utilisation pour tissus inclus en paraffine (ACD). La révélation s'effectue suite grâce à un système d'amplificateurs successifs se terminant par un complexe enzymatique permettant la précipitation d'un chromogène coloré rose au point d'hybridation de la sonde (Figure 9). Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra DP50CCD (Olympus) reliée à un microscope Leica Leitz DMRB, et d'un objectif x40 (Leica) avec immersion dans l'huile.

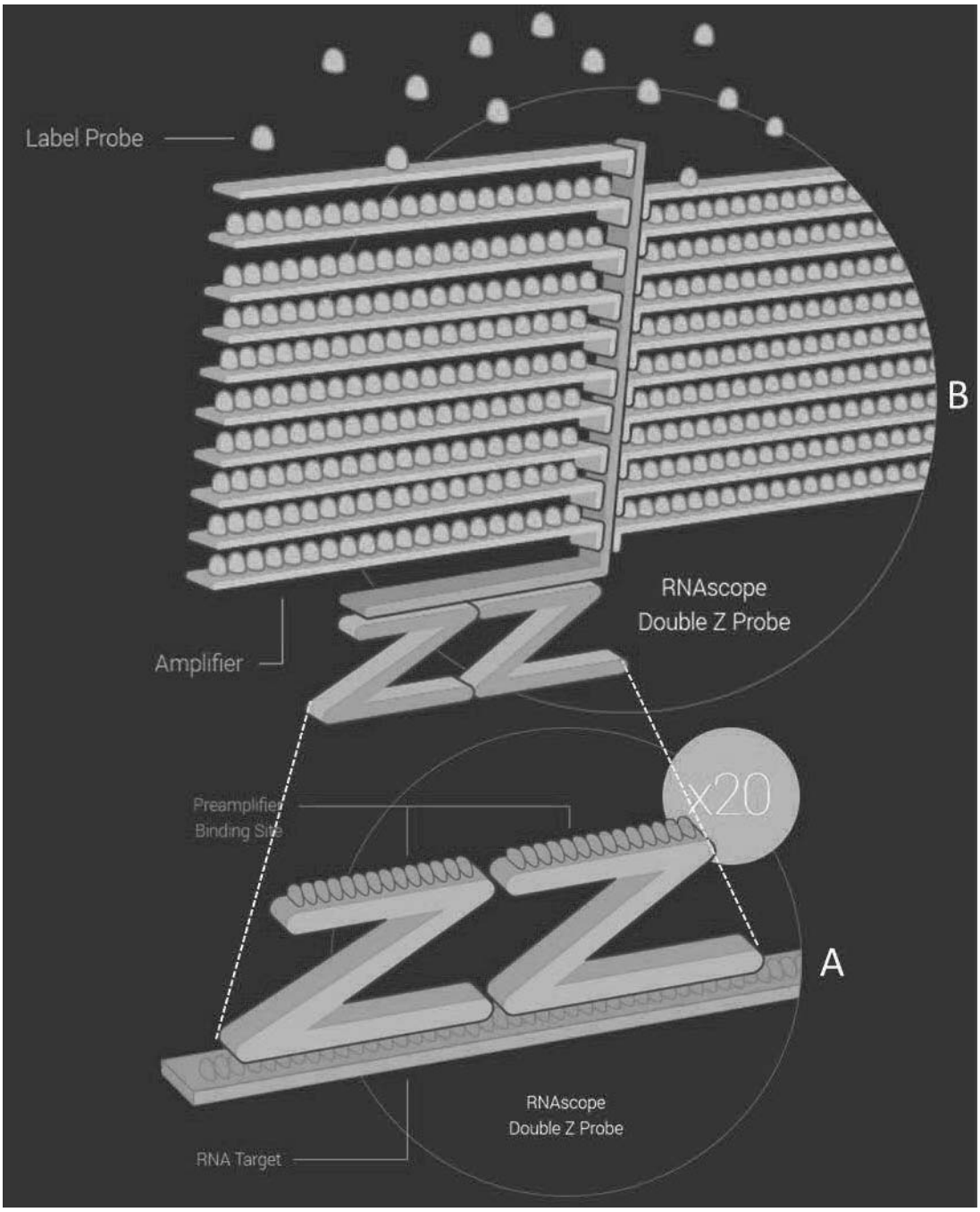


Figure 9.

Concept d'hybridation *in situ* par la technique du RNAscope (ACDbio).
Après avoir perméabilisé les cellules et démasqué les ARN cibles d'une coupe de tissu, une quarantaine de sondes Z spécifiques du gène cible sont hybridées par complémentarité de séquence (A). Des amplificateurs séquentiels sont hybridés successivement (B) et terminés par un système enzymatique permettant la précipitation d'un chromogène coloré. Chaque amplificateur ne pourra se fixer que si les sondes sont parfaitement jointes deux à deux. Chaque point coloré représente alors une molécule d'ARN cible unique.
Source: https://acdbio.com/science/how-it-works

2. Immunohistologie sur étalement chromosomique.

a) Etalement chromosomique.

Après prélèvement du testicule, la membrane externe (albuginée) est retirée et la pulpe testiculaire restant et placée en PBS 1X. Le tissu est ensuite dilacéré à l'aide d'aiguilles hypodermiques jusqu'à obtenir une solution homogène. Après décantation, la phase supérieure, contenant les cellules germinales libérées des cordons séminifères dilacérés, est récupérée afin d'être centrifugée. Le culot de cellules est, en fonction de sa taille, re-suspendu en PBS de façon à obtenir une concentration cellulaire permettant à chaque cellule d'être isolée. Les cellules sont ensuite déposées sur lame en présence de nonylphénol éthoxylé (NP-40) dilué en eau à 0.25% pendant 30secondes. Puis la réaction d'étalement est arrêtée par l'ajout de solution S-fix (1% de paraformaldéhyde, 10mL de borate de sodium à 100mM en eau). Après évaporation des gouttes de solution, les lames sont plongées dans une solution de photo-flo à 0.4% (kodak) avant d'être séchées et stockées à -20°C.

b) Immunohistochimie

Les lames d'étalements chromosomiques sont successivement placées dans un bain de photo-flo à 0.08% pendant 5 minutes, en triton à 0.1% pendant 5 minutes, en photo-flo à 0.08% pendant 5 minutes, puis incubées sur la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans une solution contenant 2% de sérum de veau fœtal, 18g/L de lait en poudre et 10g/L d'albumine bovine diluée en PBS1X. Les différents anticorps utilisés pour permettre la réalisation des réactions d'immunohistologie sont présentés dans le tableau suivant :

Anticorps	espèce réactive	Fournisseur	référence	dilution	Anticorps secondaire utilisé
meikin	lapin	don du Dr Watanabe		1/500	anti-lapin/FITC (1/200)
Rec8	lapin	Sigma	HPA031729	1/100	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
SA2	chèvre	Abcam	Ab4463	1/200	anti-chèvre/cyanine3 (1/200
SYCP3	lapin	Abcam	Ab1591	1/100	anti-lapin/cyanine3 ou FITC (1/200)
CREST	homme	don de DrFritzler		1/100	anti-humain/cyanine3 (1/200)
H3K9me3	lapin	Diagenode	CS-056-050	1/500	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
H4K20me3	lapin	Millipore	07-463	1/500	anti-lapin/cyanine3 (1/200)
Dr Marvin J Fritzler, Mitogen Advanced Diagnostics, University of calgary, Alberta Canada					

Tableau 2: Liste des anticorps utilisés sur étalement chromosomique et leur condition d'utilisation.

Les lames sont ensuite colorées au DAPI (dilué à 1mg/L en PBS). Les échantillons sont ensuite protégés par une lamelle fixée avec une goutte d'Eukitt (Sigma-Aldrich), et observés au microscope ou conservés à 4°C pendant 10 jours maximum.

3. Préparation pour Microscpopie Electronique en transmission (M.E.T).

Après prélèvement, le testicule est rincé en PBS 1X, fixé en glutaraldéhyde 2% / paraformaldéhyde 1,5% dilué en PBS 1X, puis inclus en gélose (2% d'agarose dilué en cacodilate de sodium 0,1M pH=7,2). Les gonades sont ensuite confiées à la plateforme MIMA2 en vue d'étude histologique par M.E.T (C.Longin, INRA Jouy en Josas).

III. Partie 1 : Etude du blocage méiotique par des techniques histologiques

A. Résultats :

Afin de localiser la protéine TOPAZ1, nous avons testé une série d'anticorps commerciaux comme décrit dans le paragraphe « Méthodologie ». Les tests ont été réalisés sur coupes de testicules de souris adultes sauvages *versus* de souris

invalidées pour le gène *Topaz1*. La présence d'un marquage fort dans toutes les cellules du testicule de souris *Topaz1*$^{-/-}$ nous a amené à conclure que tous ces anticorps sont aspécifiques.

Aussi, dans un premier temps, nous n'avons donc pu localiser uniquement l'ARNm de *Topaz1* et non pas sa protéine. Pour cela, la technique de l'Hybridation *In Situ* (HIS), selon la méthode RNAscope®, a été utilisée.

1. Localisation de l'ARNm de Topaz1 par HIS

Afin de contrôler l'expérimentation de HIS en elle-même, l'hybridation d'une sonde peptidylprolyl-isomérase B (Ppib) positive ubiquiste est effectuée (16). On observe un signal dans toutes les cellules indépendamment du stade et du génotype (Figure 10 A-B).

De même, l'hybridation d'une sonde négative ciblant straindihydrodipicolinate réductase (dapB) de *bacillus subtilis*, spécifique de cette bactérie, n'est pas détectable sur les coupes de testicule de souris WT ou Topaz1$^{-/-}$, quel que soit l'âge (20 j*pp* ou adulte) (Figure 10 E à H).

Afin de localiser l'ARNm de *Topaz1*, nous avons hybridé une sonde complémentaire de *Topaz1* de souris sur coupes de testicules. La spécificité de cette sonde complémentaire de Topaz1 est validée par l'absence de signal sur les coupes de testicule des souris dépourvues de Topaz1 (Topaz1$^{-/-}$) à 20 jpp (Figure 10. K) et adultes (Figure 10. L).

Chez les animaux normaux, la localisation de l'ARNm de *Topaz1* (Figure10) sur coupes de testicules de souris âgées de 20 j*pp* ne révèle aucun marquage d'hybridation dans la couche de cellules la plus externe des tubes séminifères, couche constituée essentiellement de spermatogonies (Figure 10. I). Au stade adulte montre un marquage punctiforme de l'ARN de Topaz1 exclusivement dans les spermatocytes, cellules particulièrement reconnaissables grâce à leur forme et leur localisation (Figure 10. J). Il s'agit effectivement de grosses cellules situées dans la deuxième couche de cellules formant les cordons séminifères de stades I à X des testicules de souris.

L'ARNm de Topaz1 est donc détecté dans les spermatocytes de testicules normaux de souris.

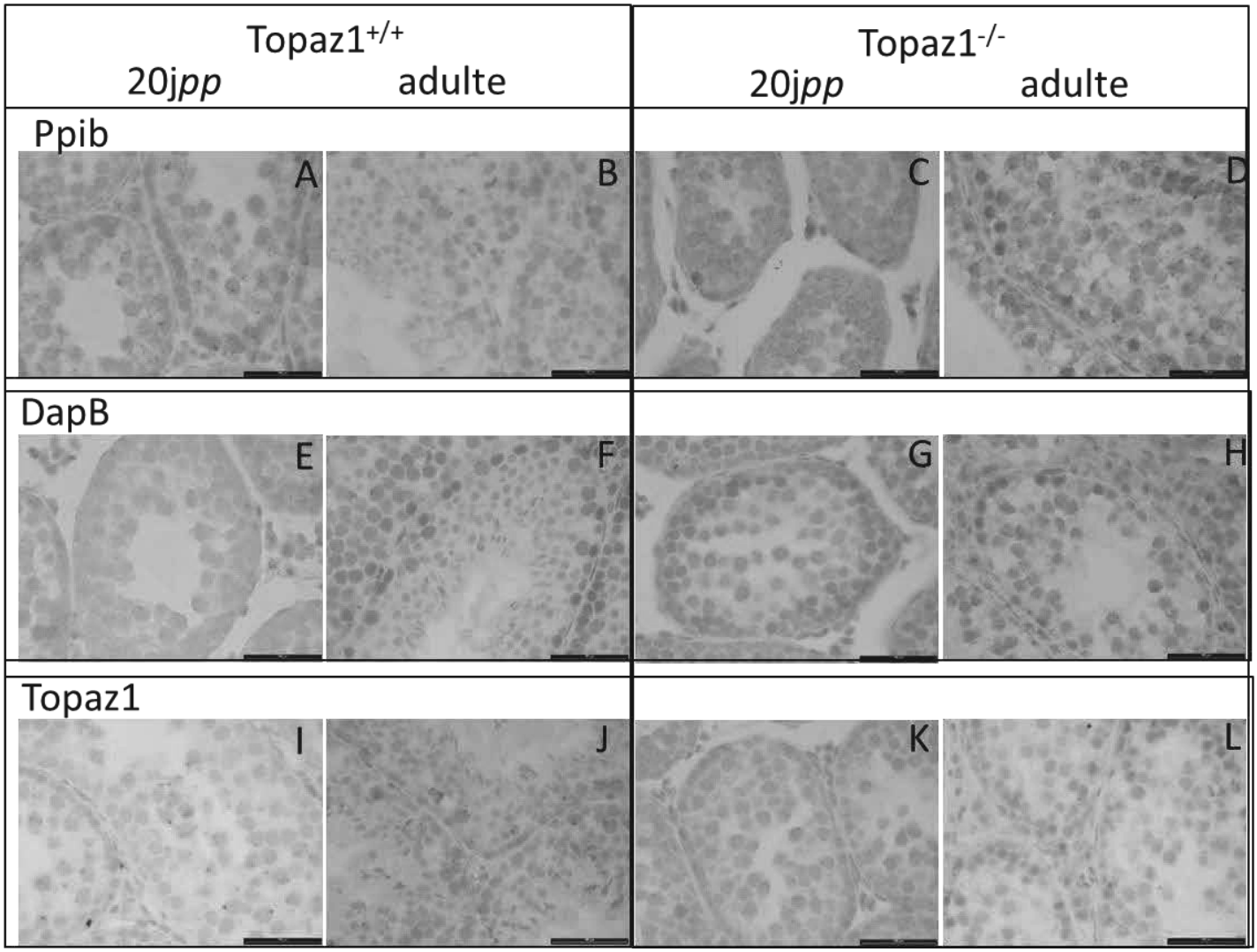


Figure 10.

Hybridation *in situ* sur coupe de testicules à 20 j*pc* et adulte de souris *Topaz1*$^{+/+}$ (A, B, E, F, I, J) *versus* *Topaz1*$^{-/-}$ (C, D, G, H, K, L). L'ARNm de peptidylprolyl-isomérase B (Ppib) est transcrit de façon ubiquitaire dans toutes les cellules et sert de contrôle positif (A, B, C, D). L'ARNm de straindihydrodipicolinate réductase (dapB) de *bacillus subtilis* n'est pas exprimé dans les testicules de souris et est utilisé comme contrôle négatif (E, F, G, H). L'ARNm de Topaz1 est révélé par une accumulation de chromogène rose (points) dans les coupes de souris *Topaz1*$^{+/+}$ adultes (J) et âgées de 20 j*pp* (I). Le signal est spécifique des spermatocytes des souris WT (non retrouvé chez les souris Topaz1$^{-/-}$). (Barre d'échelle à 100µm).

2. Étude de protéines impliquées dans la transition prophase I-métaphase I

Le phénotype anormal des testicules de souris Topaz1$^{-/-}$ est visible en coloration Hématoxyline-éosine à partir de la transition prophase – "métaphase-like" de première division de méiose (Figure 7A).

Si la protéine TOPAZ1 n'était pour l'instant pas détectable, faute d'anticorps validé par une absence de marquage sur les coupes de testicule de souris *Topaz1*$^{-/-}$, nous avons décidé d'observer d'autres protéines, par immunohistochimie, connues pour leur implication dans la mise en place de ces métaphases de première division de méiose ou dans la mise en place du fuseau méiotique.

Le stade choisi, 30 jours après la naissance (30 j*pp*), correspond à la fin de la première vague de méiose et nous permet ainsi d'obtenir des coupes de tissus avec peu de spermatozoïdes chez la souris WT. Effectivement, le déroulement de la spermatogénèse dans les différents tubes séminifères étant asynchrone, il est techniquement plus facile de repérer les tubes au stade XII, seul stade auquel on observe, normalement, des spermatocytes en métaphase de méiose I (Figure 7).

a) Alpha tubuline.

L'alpha Tubuline (αTub) est une protéine qui, avec la béta Tubuline (βTub), constitue le réseau de microtubuline. Ce réseau s'établit à partir du MTOC, le centre organisateur des microtubules (Micro Tubule-Organizing Center) appelé aussi centrosome. Il est constitué d'une paire de centrioles, du γ-TuRC (γ-Tubulin Ring Complex) et de γ-Tubuline (γTub) (Figure 11) (17,18).

Par immunomarquage de l'α-tubuline, on observe le réseau de microtubuline. Les spermatogonies en mitose, situés sur la première couche de cellules des tubes séminifères, présentent un marquage de l'α tubuline de leur réseau microtubuline mitotique identique entre WT et mutant donc indépendamment de leur génotype (Figure 12, B et D). Ces divisions mitotiques permettent la multiplication des cellules germinales.

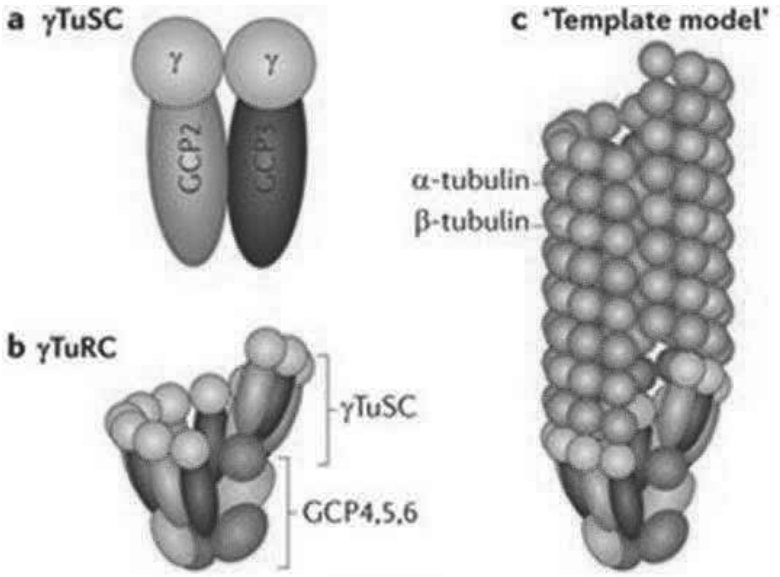


Figure 11. Complexe cyclique de γTubuline

(a) Le γTuSC contient deux copies de γ-tubuline et une copie de chacune des protéines du complexe γ-tubuline (GCP2 et GCP3). C'est le noyau essentiel de nucléation des microtubules.
(b) Le γTuSC s'associe avec GCP4, GCP5 et GCP6 dans un complexe cyclique γ-tubuline (γTuRC).
(c) A partir du γTuRC,l'anneau de γ-tubulines établit des contacts longitudinaux avec α-tubuline – β-tubuline (αβ tubuline).
Sources: *Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes (Justin M. Kollman, Andreas Merdes, Lionel Mourey & David A. Agard) Nature Reviews Molecular Cell Biology (2011)*

Dans les cellules germinales, en pro-métaphase de première division de méiose, de souris WT (Figure 12, A), les réseaux d'α et β-tubuline se polymérisent à partir de chacun des deux pôles de la cellule jusqu'à la plaque métaphasique constituée des chromosomes alignés 2 à 2 et mis en évidence par un marquage au DAPI.
Dans les cellules germinales Topaz1$^{-/-}$, on observe un réseau unique centré dans la cellule avec des prolongements vers la périphérie cellulaire, s'apparentant à une sorte d'hémi-fuseau (Figure 12, C). Le réseau d'α-tubuline dans les spermatocytes de souris Topaz1$^{-/-}$ est donc anormal.

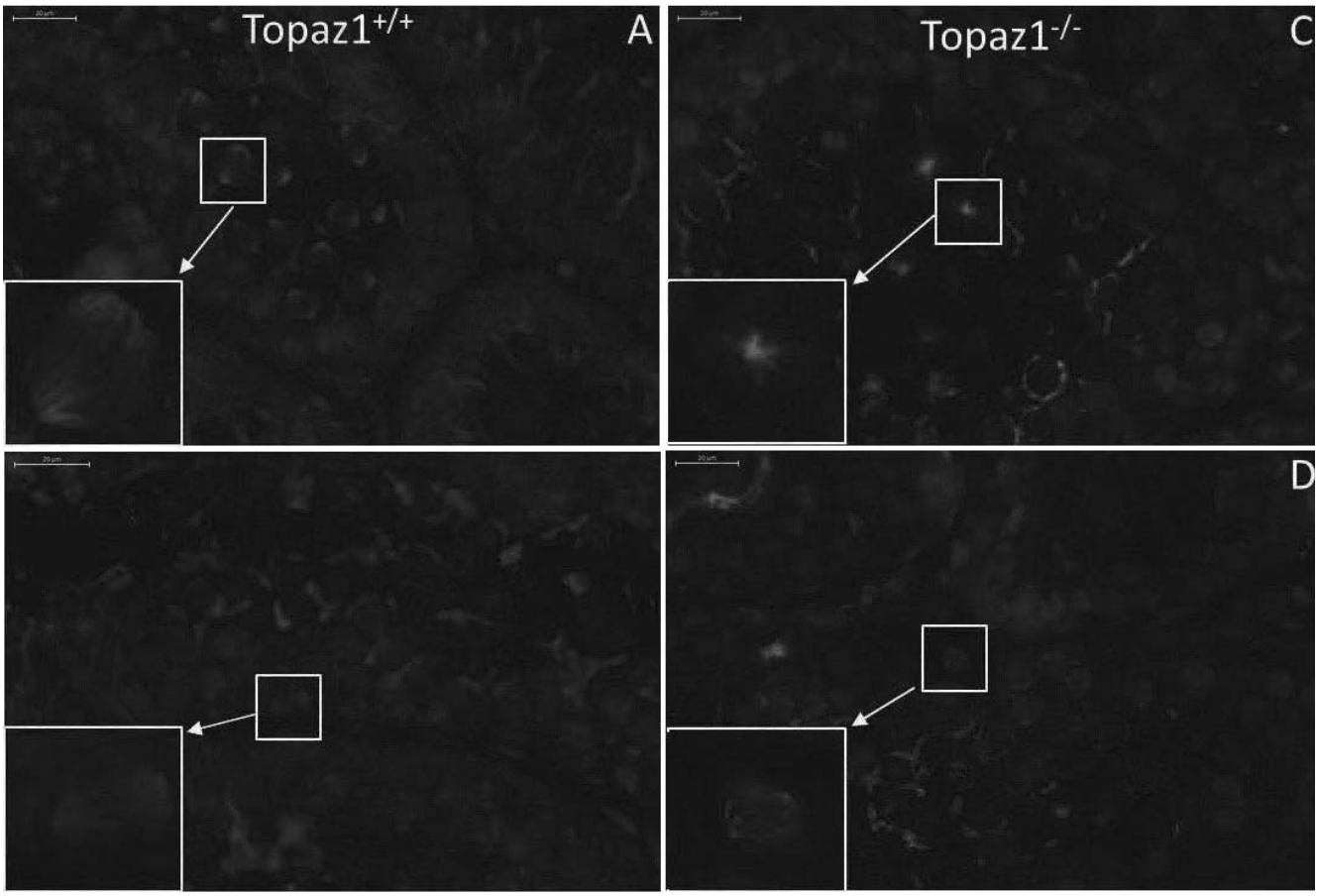


Figure 12.
Immunomarquage sur coupe de testicules à 30 j*pp* de souris WT (A, B) *versus* Topaz1$^{-/-}$ (C, D). L'αTubuline est en rouge et l'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). On observe des spermatocytes en métaphase de 1ère division méïotique (A, C), ainsi que des spermatogonies en métaphase (D) ou anaphase (B) de mitose. (Echelle : 20µm).

b) Gamma tubuline.

Afin de visualiser le centre organisateur des microtubules, nous avons détecté, par immunohistochimie, la protéine gamma tubuline (γTub). La gamma tubuline est une protéine constitutive du centrosome à partir duquel va s'effectuer la nucléation des microtubules, ceux-ci étant composés d'α-tubulines et de β-tubulines.

On observe un marquage de la γTub, répartis aux deux pôles des cellules germinales sur les coupes de testicule de souris WT (Figure 13. A), attestant de la présence des 2 centrosomes positionnés à chacun des pôles de la cellule germinale.

Par contre, le marquage de la protéine γTub est centré en un seul point dans les cellules germinales de la lignée de souris *Topaz1*$^{-/-}$ (Figure 13. B).

Le réseau de γ-tubuline dans les spermatocytes de souris Topaz1$^{-/-}$ est donc anormal.

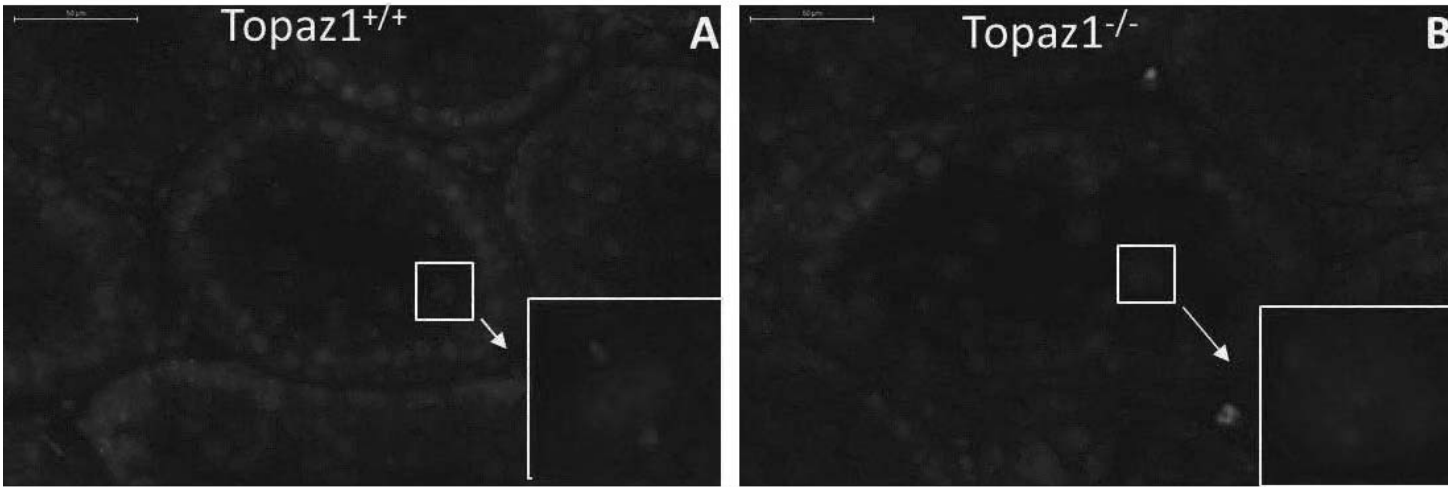


Figure 13.
Immunomarquage sur coupe de testicules à 30 j*pp* de souris WT (A) *versus* Topaz1$^{-/-}$ (B). La γTubuline est en rouge et l'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). On observe des spermatocytes en métaphase de 1ère division méiotique (A, B). (Echelle : 50µm).

c) Protéines du kinétochore.

Si la localisation des protéines α- (et supposé β-) et γ-tubulines est perturbée dans les testicules de souris dépourvus de *Topaz1* pendant la méiose I, la localisation des chromosomes au stade de « fin de prophase I - début de métaphase-like » pourrait également être perturbée. Aussi, nous nous sommes demandé si l'altération de la localisation du centre organisateur des microtubules pouvait être liée à un défaut d'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale. Le kinétochore représente un assemblage de nombreuses protéines au niveau des régions centromériques des chromosomes et qui permet d'établir un lien moléculaire entre chromosomes et réseau de microtubules en mitose et en méiose. Nous avons donc décidé de comparer les marquages par immunohistochimie de certaines protéines appartenant au kinétochore.

Le marquage de ce type de protéine est relativement fin et de type punctiforme, c'est pourquoi ces marquages par immunohistochimie sont effectués sur des étalements chromosomiques, et non sur des coupes, à partir de testicules de souris âgées de 28 jours après la naissance (28 j*pp*).

Dans un 1er temps, afin de repérer le stade des cellules germinales observées, nous avons dressé une sorte de « catalogue » de développement des différents stades de méiose grâce à un marquage SYCP3.

En effet, SYCP3 est une protéine de l'élément latéral du complexe synaptonémal qui participe à l'appariement des chromosomes homologues (Figure 14). Elle apparait dès le stade leptotène de première division de méiose. La protéine SYCP3 se localise le long des chromosomes homologues lors de leur appariement au stade zygotène–pachytène. Lorsque les chromosomes homologues se dissocient, SYCP3 disparait en persistant tout de même au niveau du centromère, localisé à l'extrémité des chromosomes murins (les chromosomes murins sont dits acrocentriques), où SYCP3 aurait également un rôle dans la cohésion des centromères (19) (Figure 14).

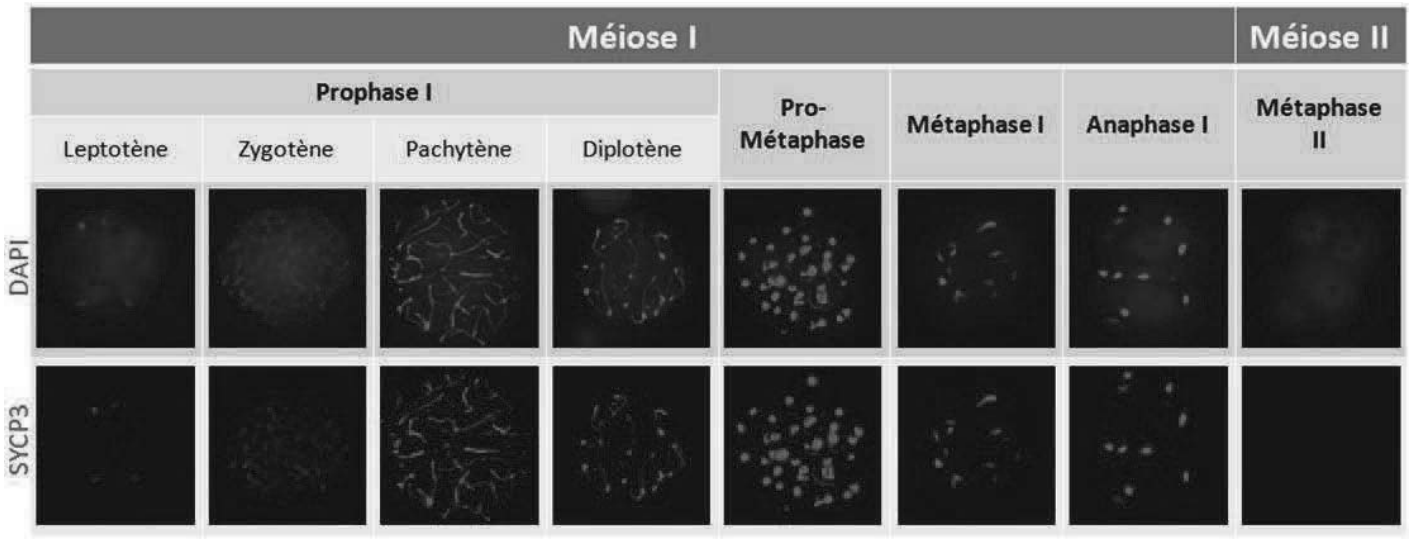


Figure 14.
Immunomarquage sur étalements chromosomiques de la protéine SYCP3 (en rouge) issues de cellules à différents stades de développement de testicule Topaz1$^{+/-}$ de 28 j*pp*. L'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). Le marquage de SYCP3 est identique pour les souris *TOPAZ1*$^{-/-}$.

De plus, dans une étude antérieure, nous avons démontré que la suppression de l'expression du gène *Topaz1* n'avait pas d'impact dans la mise en place du complexe synaptonémal. Ainsi la position de SYCP3 au cours de la prophase I n'est pas modifiée chez les animaux *Topaz1*$^{-/-}$ (15). *Topaz1* ne semble donc pas jouer un rôle

dans la mise en place ou dans le maintien du complexe synaptonémal. La localisation de SYCP3 est donc retrouvée, comme sur la figure 14, chez les animaux Topaz1$^{-/-}$ mais jusqu'au stade de pro-métaphase. Aucun stade de développement des cellules germinales mutantes n'est obtenue au-delà de cette étape de pro-métaphase.

Une fois ce "catalogue SYCP3" dressé, nous nous sommes tout d'abord intéressés à une protéine spécifique de la méiose, localisée au niveau des kinétochores : MEIKIN. De plus, nous avons choisi de suivre plusieurs protéines du complexe de cohésines des chromosomes avec uUne cohésine ubiquitaire : SA2 (5); et deux cohésines spécifiques de la méiose : SMC1β et REC8 (6).
Nous montrons que toutes ces protéines: MEIKIN (Figure 15, A), REC8 (Figure 15, B), SA2 (Figure 15, C) et Smc1β (Figure 15, D) ne présentent pas de différence de localisation dans les testicules de souris dépourvues de *Topaz1* (en comparaison avec des souris hétérozygotes pour la mutation).

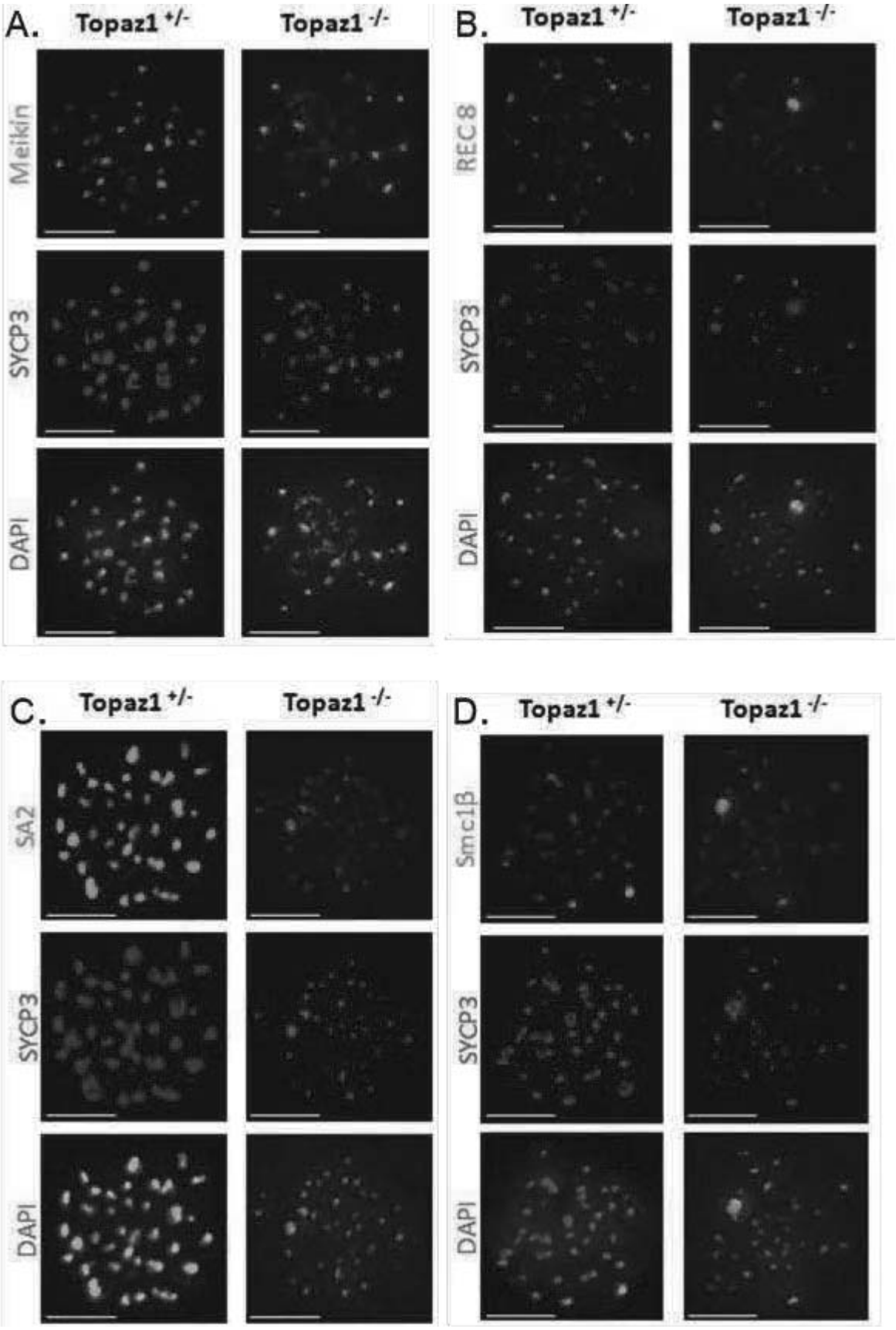


Figure 15.
Immunomarquage sur étalements chromosomiques des protéines Meikin (A), Rec 8 (B), SA2 (C), Smc1β (D) (en vert) et SYCP3 (en rouge). L'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). Les cellules observées proviennent de testicules de 28 j*pp* de souris Topaz1$^{+/-}$ et Topaz1$^{-/-}$, ces cellules sont aux stades diplotène de première division méiotique ou de pro-métaphase. (Echelle : 10µm).

Puis nous avons cherché à visualiser par immunofluorescence les centromères.Ainsi, CREST, un antisérum humain (ou ACA: anti-centromere antibody) ayant la particularité de marquer les centromères a été utilisé.

Dans les spermatocytes au stade pachytène de souris hétérozygotes, le marquage obtenu avec l'antisérum CREST se localise au niveau des centromères des chromosomes (Figure 16). Chez les mutants, ce marquage "anti-centromère" est diffus et semble présent sur toute la longueur des chromatides. Cette mauvaise localisation, ainsi mise en évidence par le marquage CREST, pourrait être une cause ou une conséquence de la mauvaise mise en place du fuseau de microtubules.

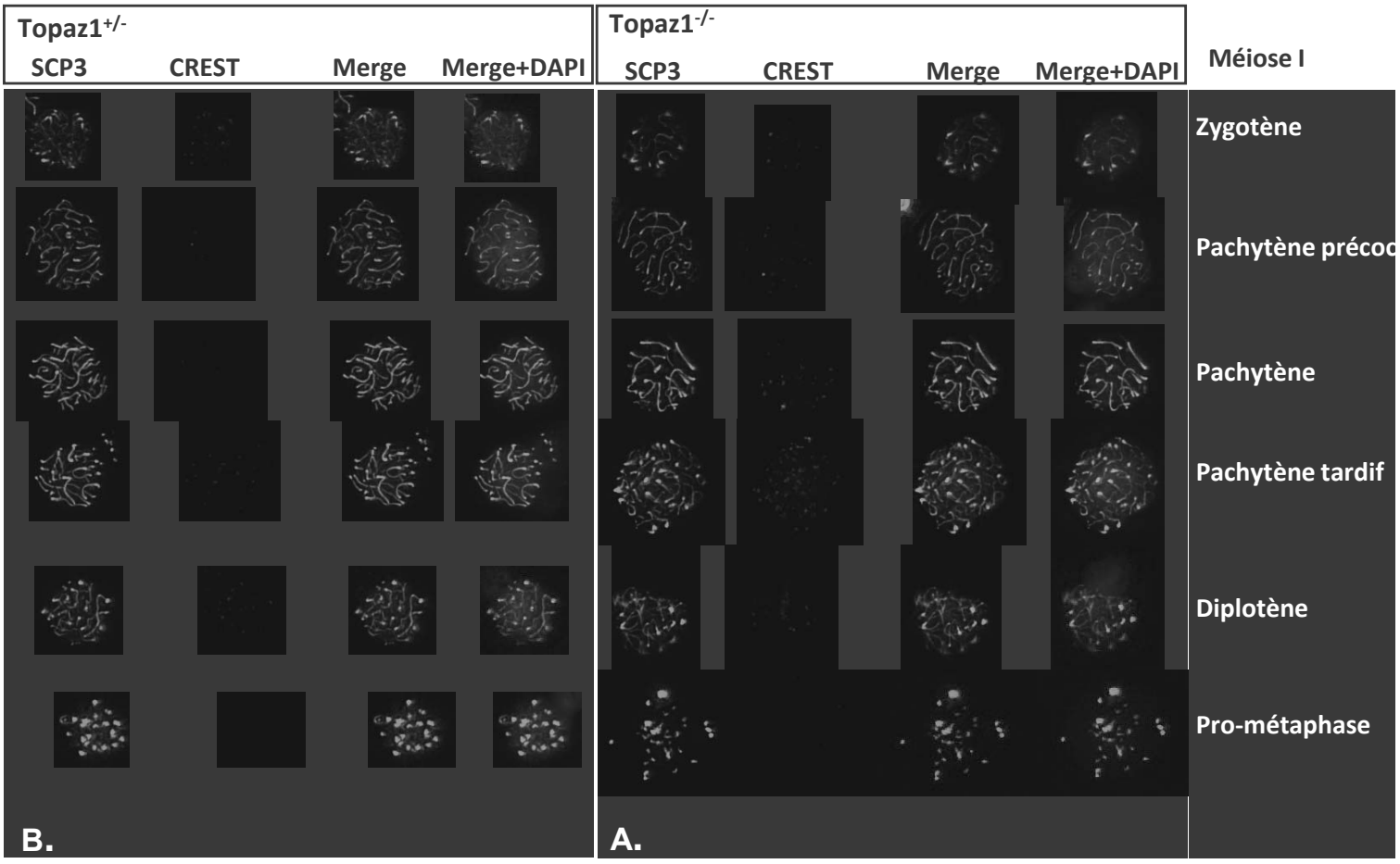


Figure 16.
Immunomarquage sur étalements chromosomiques des centromères (attesté par l'anticorps anti-CREST) (en rouge) avec SCP3 (en vert). L'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). Les cellules observées proviennent de testicules de souris Topaz1$^{+/-}$ (A) et Topaz1$^{-/-}$ (B) de 28 j*pp*.
Ces cellules sont présentées dans l'ordre chronologique (échelle de droite) de première division méiotique.

3. Étude des marques de méthylation du centromère.

Dans l'espèce murine, les chromosomes sont acrocentriques. Le centromère est situé à l'extrémité du chromosome (Figure 17). La fonction du centromère est défini épigénétiquement (20).

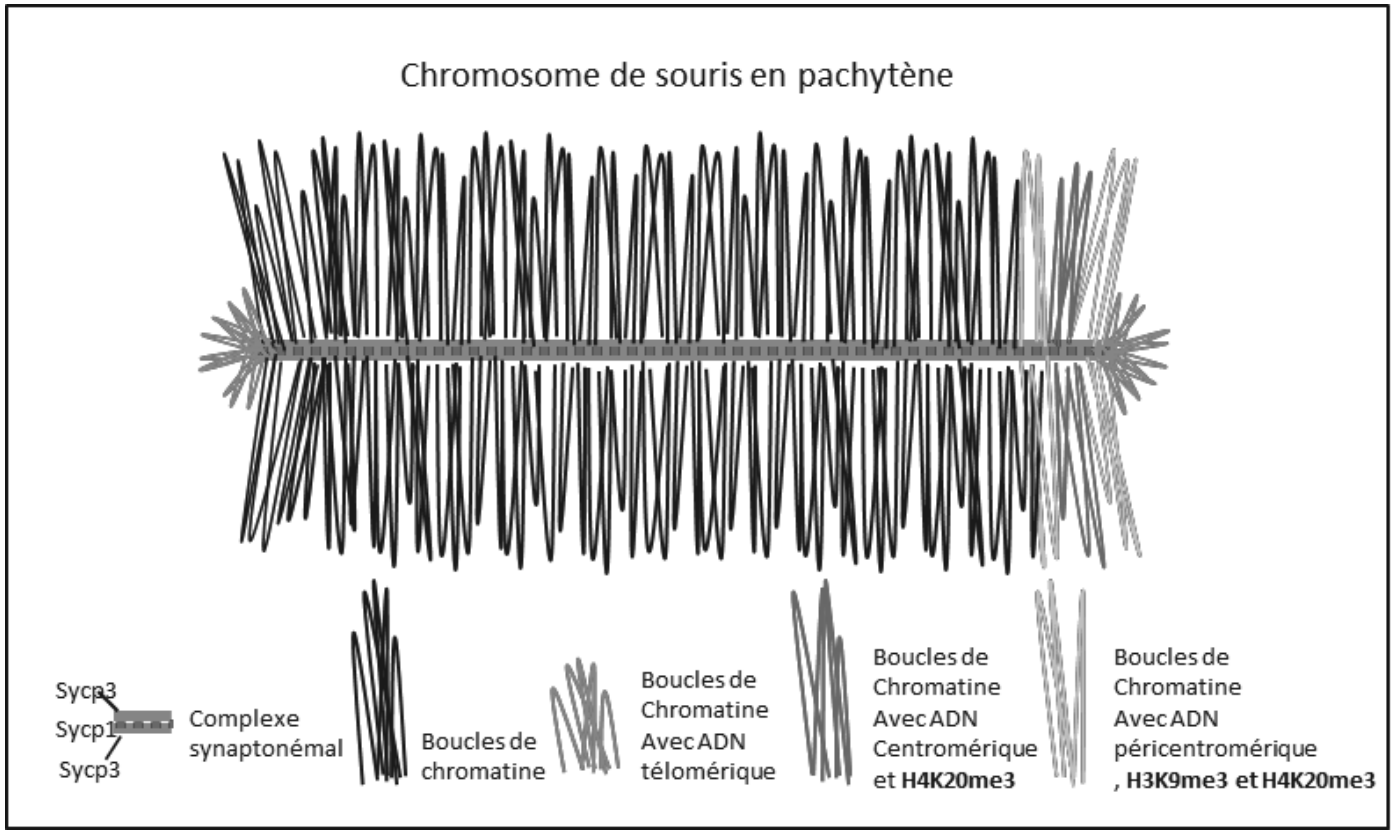


Figure 17.
Représentation schématique d'un chromosome de souris en pachytène de méiose I.

Afin d'évaluer l'intégrité des marques épigénétiques du centromère des chromosomes des souris invalidées pour *Topaz1*, j'ai procédé au marquage par immunoflourescence de certaines de ces marques sur des étalements de chromosomes de testicules de souris *Topaz1*$^{+/-}$ *versus* souris *Topaz1*$^{-/-}$.

Les marques épigénétiques testées sont :

- Histone H3 dont la lysine en position 9 est tri-méthylée (H3K9me3), reflète une chromatine inactive. Les H3K9me3 sont particulièrement enrichies au niveau de l'ADN péricentromérique des chromosomes de souris (21).

On observe un marquage évoluant en s'intensifiant progressivement lors des premières étapes de la prophase I de méiose (Figure 18), puis un marquage plus marqué au stade pachytène tardif, situé à l'extrémité des chromosomes

acrocentriques, au niveau du centromère. Ceci est en accord avec les travaux de Page et al., (22) qui montre un faible marquage uniformément distribué aux stades leptotène et zygotène mais plus vif au niveau des régions péricentromériques. Puis le marquage H3K9me3 se localise plus intensément autour des chromosomes sexuels au stade pachytène. Au fur et à mesure que ce stade pachytène progresse, le marquage uniformément distribué sur les autosomes diminue et ne devient visible que sur les régions centromériques (pachytène tardif et diplotène). Cette diminution du marquage H3K9me3 reflète l'état de réactivation transcriptionnelle qui a lieu en fin de pachytène.

Aucune différence notable n'est observée entre l'étalement chromosomique de testicules de souris *Topaz1*$^{+/-}$ (Figure 18B) et de souris *Topaz1*$^{-/-}$ (Figure 18A) pour le marquage H3K9me3.

- Histone H4 dont la lysine en position 20 est tri-méthylée (H4K20me3), reflète un état de chromatine inactive (23). Comme H3K9me3, H4K20me3 est présente au niveau de l'ADN centromérique des chromosomes de souris (Figure 18). H4K20me3 serait associée à l'hétérochromatine des régions péricentromériques pour les stabiliser (27).

Comme pour la marque épigénétique H3K9me3, on observe un marquage H4K20me3 diffus lors des premières étapes de la prophase I de méiose. Le marquage d'H4K20me3 est observable sous deux formes. Un premier marquage semble visible à l'extrémité des chromosomes de souris, au niveau du centromère, et visible au stade pachytène. Un second marquage plus diffus, qui semble être réparti en territoires. On note une persistance du signal diffus au stade diplotène dans les cellules germinales des souris Topaz1$^{-/-}$ (Figure 19, A) par comparaison avec le signal terminal observé dans les cellules germinales des souris Topaz1$^{+/-}$ au même stade (Figure 19, B).

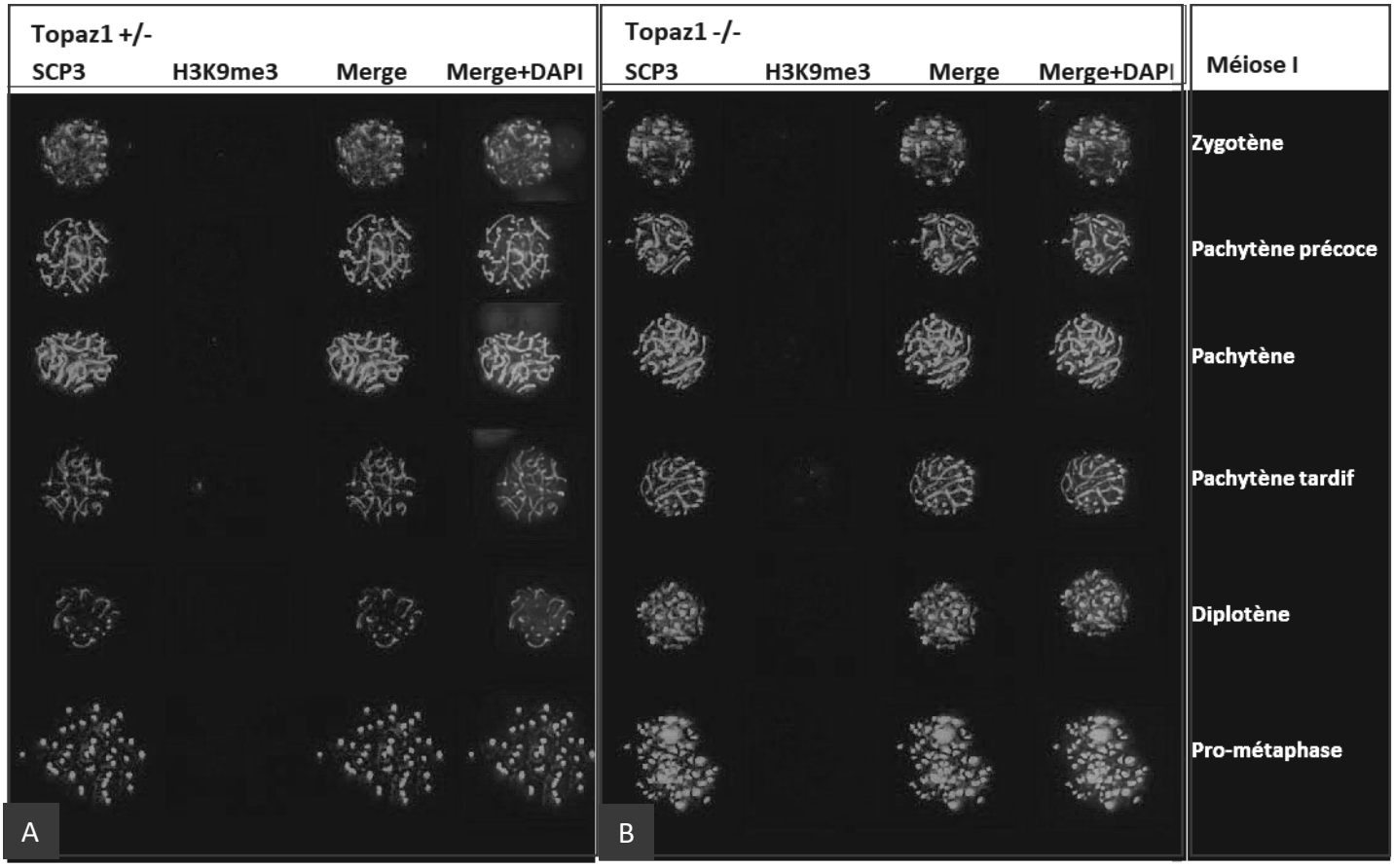


Figure 18.
Immunomarquage sur étalements chromosomiques des Histones H3K9 trimethylées (en rouge) et SCP3 (en vert). L'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). Les cellules observées proviennent de testicules de souris Topaz1$^{-/-}$ (A) et Topaz1$^{+/-}$ (B) de 28 jpp. Ces cellules sont présentées dans l'ordre chronologique de première division méiotique.

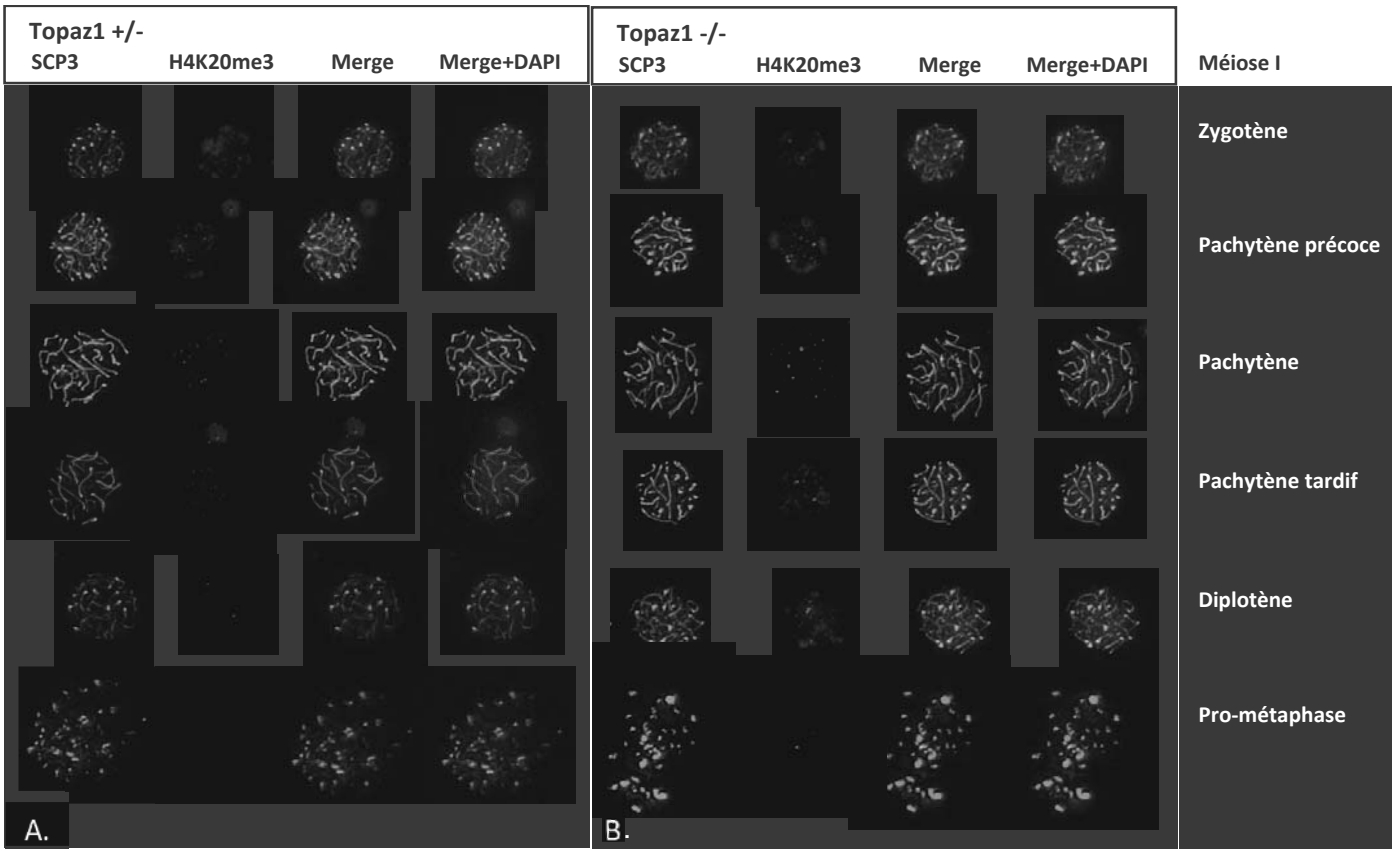


Figure 19.
Immunomarquage sur étalements chromosomiques des Histones H4K20 trimethylées (en rouge) et SCP3 (en vert). L'ADN est révélé par une coloration DAPI (bleu). Les cellules observées proviennent de testicules de souris Topaz1$^{+/-}$ (A) et Topaz1$^{-/-}$ (B) de 28 j*pp*. Ces cellules sont présentées dans l'ordre chronologique de première division méiotique.

4. Étude des centrioles nécessaires à la mise en place du réseau de microtubules.

Nous avons ensuite choisi d'observer les centrosomes en localisant directement les centrioles, dans les spermatocytes de souris Topaz1$^{+/-}$ et Topaz1$^{-/-}$ par microscopie électronique.

a) Localisation des chromosomes en métaphase.

Afin d'optimiser la localisation des cellules au stade méiotiques souhaitées, des coupes semi-fines de testicules de souris à 28 j*pp* sont observées. Cette période correspond à la fin de la première vague de spermatogénèse. Il y a encore peu de spermatozoïdes (24), ce qui facilite l'observation et la recherche de spermatocytes I en fin de prophase ou métaphase de méiose I.
Après avoir repéré ces cellules situées dans les tubes séminifères en stade XII (Figure 3) sur coupes semi-fines colorées en Azure II et bleu de méthylène (Figure 20), des coupes ultra-fines ont été réalisées par la plateforme MIMA 2 de l'INRA de Jouy-en Josas. Ces coupes ultra-fines ont ensuite été observées au Microscope électronique à transmission (M.E.T).

Sur les coupes de testicule Topaz1$^{+/+}$, on observe très facilement des amas plus denses correspondant aux chromosomes en métaphase (Figure 21), comme décrit dans le manuel « The Cell » de Don W.Fawcett (25). Des masses de chromatine condensées sur des coupes de testicules mutants Topaz1$^{-/-}$ sont toujours en cours d'analyse et d'observation à ce jour.

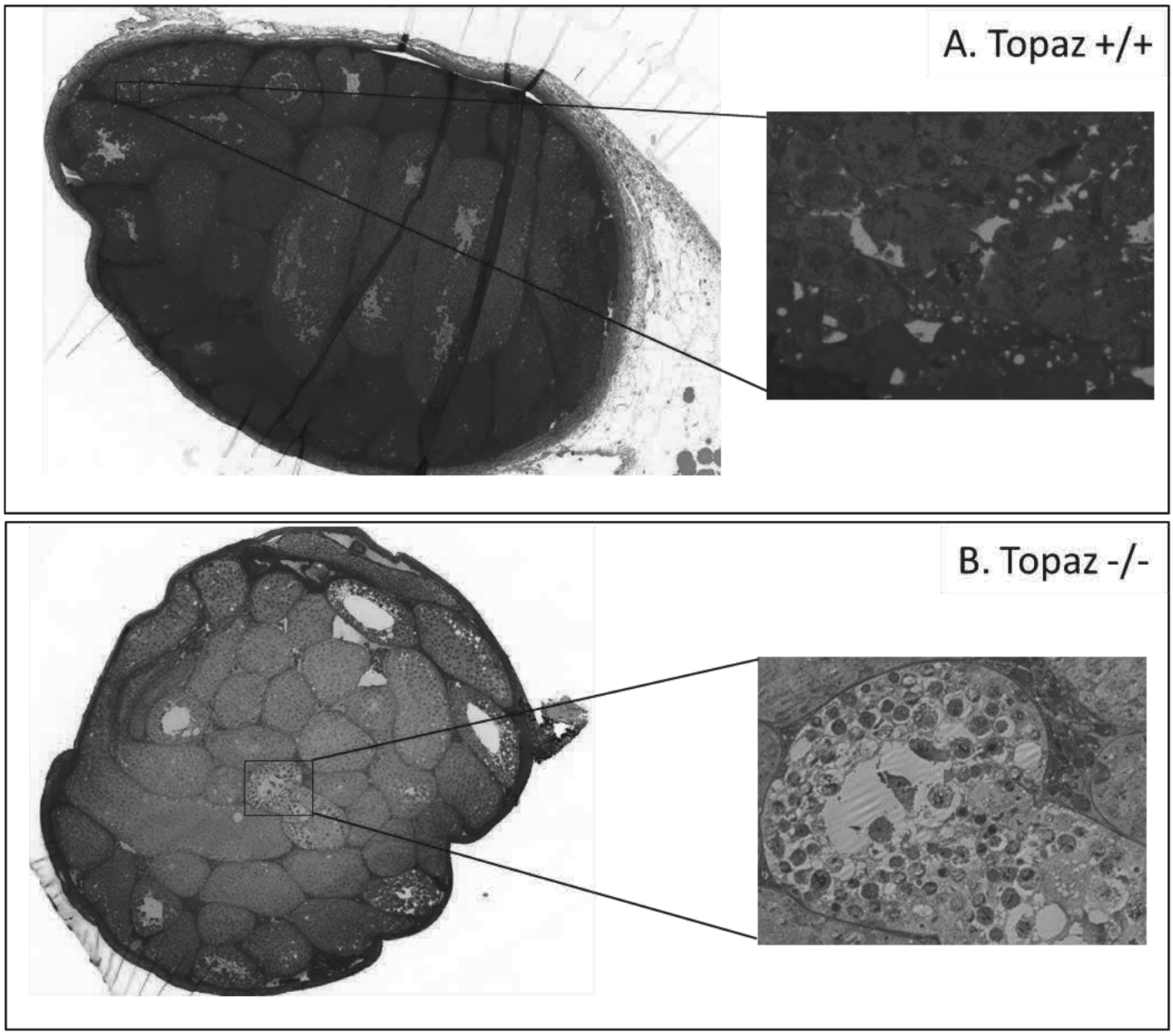


Figure 20.
Coupes de testicules de souris à 28 j*pp* Topaz1$^{+/+}$ (A) versus Topaz1$^{-/-}$ (B) colorées en azur II et bleu de méthylène. Agrandissement de la zone correspondant à un stade XII des tubes séminifères. La pointe rouge précise un spermatocyte en métaphase (A) ou en "pseudo métaphase-like" (B).

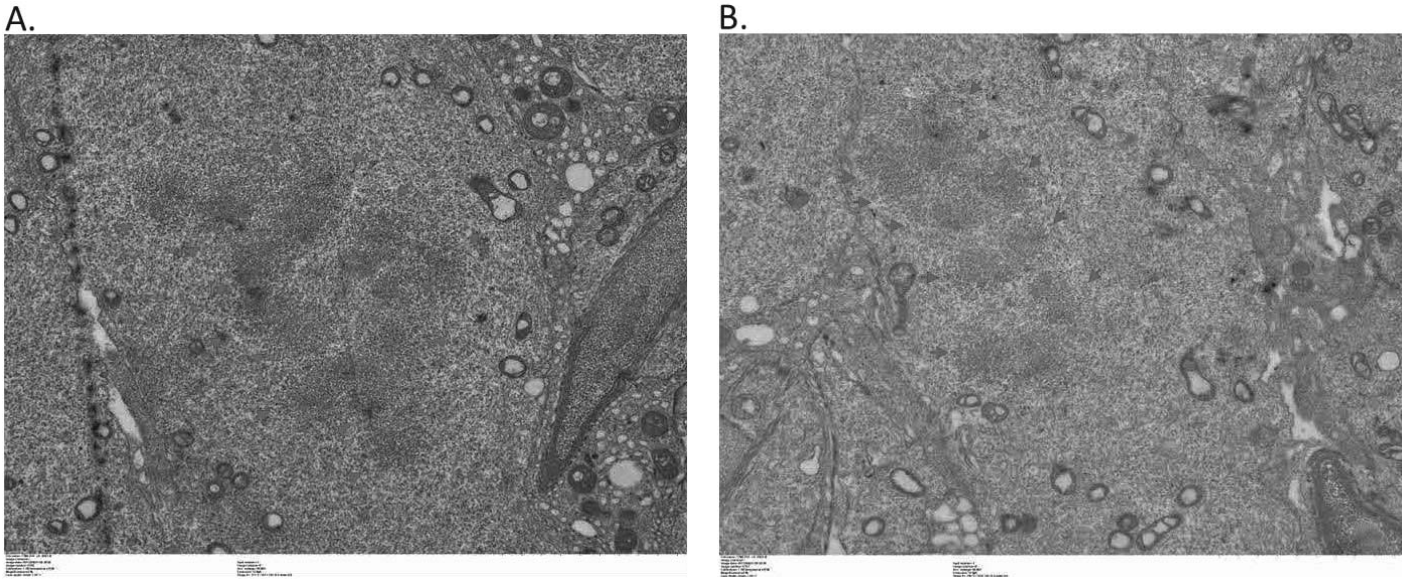


Figure 21.
Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de testicule de souris WT à 28 j*pp*. Agrandissement à X2,0k. Les cellules présentées sont au stade de pro-métaphase (A) ou de métaphase (B). Les masses condensées de chromatine sont indiquées par les pointes rouges.

b) Recherche des centrioles de cellules en métaphase.

Le centrosome, appelé aussi MTOC (Micro Tubule-Organizing Center), est le principal centre organisateur des microtubules. Le réseau de microtubules s'organise à partir du MTOC. Il est constitué de deux centrioles entourés par une matrice péri-centriolaire (26).

Les différentes étapes nécessaires à la constitution du MTOC sont (27) :

- Duplication des centrioles en phase S. Les procentrioles nouvellement synthétisés restent étroitement liés à leur centriole mère.
- Accumulation de matériel péricentriolaire (MCP).
- Séparation des deux centrosomes par migration à chaque pôle de la cellule.

Dans l'étude par M.E.T de coupes de testicule Topaz1$^{+/+}$, on observe la présence de doublet de centrioles dans les cellules en métaphase. La position des centrioles semble similaire à celle retrouvée dans la littérature (Figure 22) (27).

Comme précédemment, la présence de doublet de centrioles n'a pas encore été observée sur les coupes de testicules Topaz1$^{-/-}$ et l'observation des lames continue à ce jour.

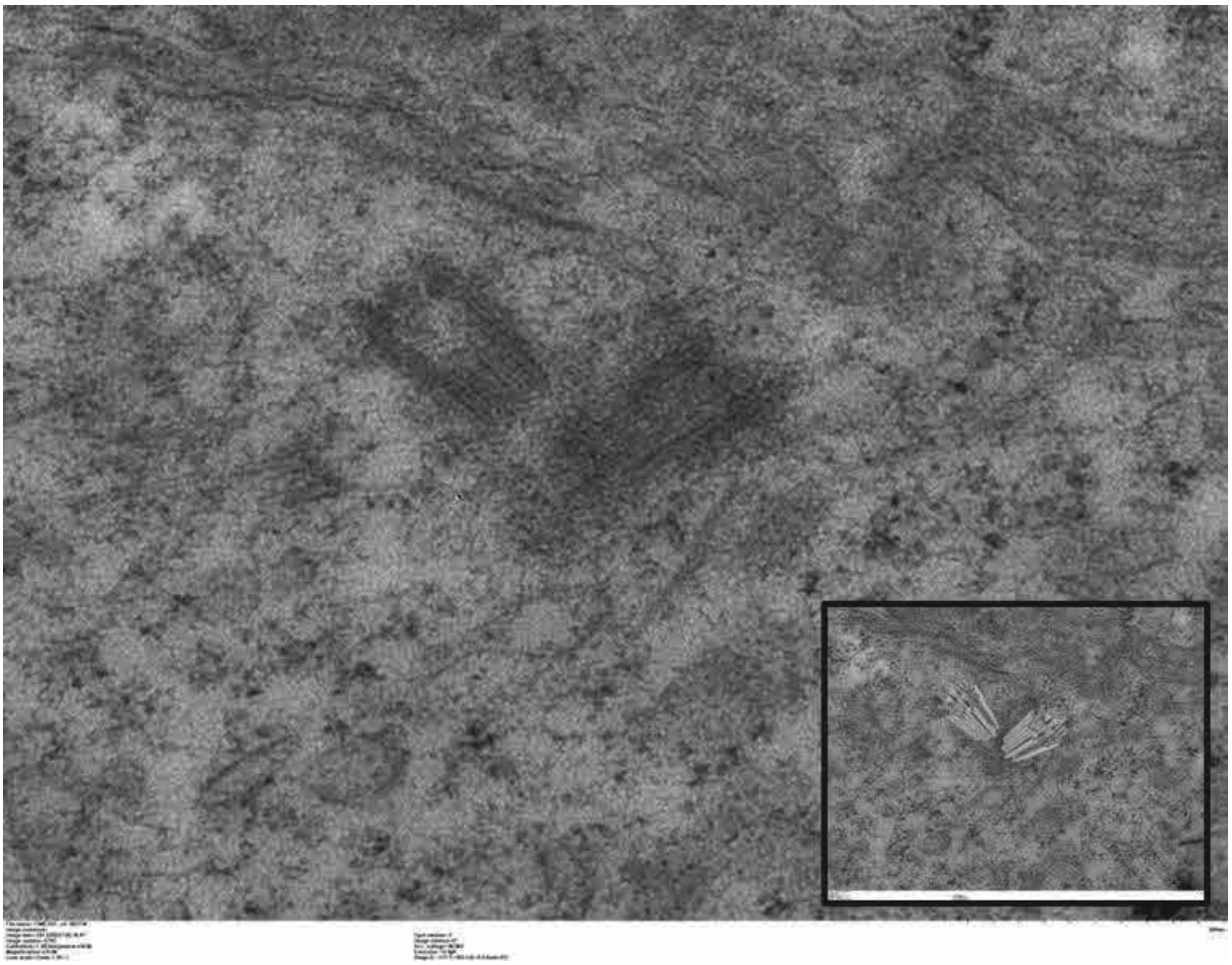


Figure 22.
Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de testicule de souris WT à 28 j*pp*. Agrandissement à X15,0k. Visualisation des centrioles de cellule en pro-métaphase ou métaphase. Détail: l'orientation des centrioles a été schématisée.

B. Discussion :

En amont de ce travail, nous avons mis en évidence, au laboratoire, le gène TOPAZ1, hautement conservé chez les vertébrés et spécifiquement exprimé dans les cellules germinales. Chez la souris, la suppression d'expression de ce gène à l'état homozygote entraine une stérilité mâle due à un blocage méiotique lors de la spermatogenèse. Différents points de contrôle possibles au cours de la méiose I ont été étudié par différentes techniques d'histologie afin de mieux comprendre cet arrêt méiotique.

Chez la souris mâle, *Topaz1* est un gène transcrit essentiellement après la naissance. Lors de son invalidation, le phénotype histologique testiculaire, visible vers 28 j*pp,* montre une absence de cellule haploïde. La première vague de la spermatogénèse s'effectue en une trentaine de jours après la naissance avec une apparition des premières cellules haploïdes vers 20 jours. L'observation de coupes de testicules de souris à 20 j*pp* nous permet de situer nos expérimentations dans cette première vague et d'observer ainsi une grande proportion de cellules méiotiques diploïdes. Grâce à la technique d'hybridation *In Situ*, nous avons pu montrer une absence de l'ARNs de *Topaz1* dans les spermatogonies mais sa présence dans les spermatocytes des souris WT dès 20 j*pp*.

L'ARN Topaz1 est donc transcrit à un stade de la différenciation germinale en aval du blocage méiotique observable. Le spermatocyte I contient également de nombreux transcrits spécifiques de la méiose et donc la suppression entraine également des blocages méiotiques comme pour les souris *Topaz1*$^{-/-}$. Notons pour exemple, les transcrits Mlh1, Mlh3 et Ccna1.

Le phénotype anormal des testicules de souris Topaz1$^{-/-}$ est visible en coloration Hématoxyline-éosine lors de la transition prophase – "métaphase-like" de première division de méiose (Figure 7A). Lors de cette transition la formation du réseau de microtubulines est un point capital pour la division cellulaire. Nous montrons dans cette étude que a mise en place du fuseau métaphasique se déroule de façon anormale dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$. En effet, la polymérisation de l'α- et la γ-tubuline semble dysfonctionnelle. Ainsi, l'organisation anormale du réseau de

microtubule, juste avant la métaphase méiotique, pourrait expliquer l'arrêt de la division de la méiose I chez les souris mâles *Topaz1*$^{-/-}$.

Une différence fondamentale entre division mitotique et première division méiotique est la production (i) de cellules filles identiques à la cellule mère dans le cas de la mitose, et (ii) de cellules filles haploïdes après la première division de méiose. Pour ce faire, la répartition en matériel génétique sur la plaque équatoriale est différente.
Lors de la première division de méiose, les chromosomes homologues sont sous forme de bivalents bi-orientés à chaque pôle de la cellule, par un attachement monotélique (chaque chromosome est relié à un pôle). Les kinétochores frères sont orientés côte à côte ce qui facilite leur attachement monopolaire (28). L'attachement monotélique aboutira, après l'anaphase de première division méiotique, à 2 cellules filles haploïdes contenant soit l'exemplaire paternel soit l'exemplaire maternel des chromosomes (après brassage inter-chromosomique).
Lors de la mitose, les chromatides sœurs sont sous la forme d'un monovalent bi-orienté à chaque pôle de la cellule. Les kinétochores frères sont reliés à un pôle opposé de la cellule. Des analyses par microscopie électronique chez les mammifères ont montré qu'en pro-métaphase de mitose, les kinétochores frères des chromatides sœurs sont orientés dos à dos ce qui facilite leur attachement bi-orienté par le fuseau. Cet attachement correspond à un attachement amphitélique, qui aboutira, après l'anaphase de mitose, à 2 cellules filles identiques à la cellule mère. Chaque cellule fille possédera une chromatique sœur de chacun des chromosomes.
Nos résultats montrent donc que, bien que les fuseaux de division mitotique et méiotique soient composés de tubulines α (et β), l'invalidation du gène *Topaz1*, dans l'espèce murine, perturbe spécifiquement le réseau de microtubules des spermatocytes I, au cours de la première division méiotique sans altérer celui de la mitose des spermatogonies. L'accrochage monotélique des chromosomes semble perturbé par l'absence de *Topaz1*.

Aussi, cette absence de *Topaz1* modifie la localisation et le nombre des centres organisateurs des microtubules dans les spermatocytes en "métaphase-like" de première division de méiose. L'observation en microscopie électronique à transmission (M.E.T) des centrioles normalement présents sous forme de 2 paires positionnées à chacun des pôles des spermatocytes en pro-métaphase devrait nous permettre de vérifier si les centrioles sont correctement répliqués et/ou si la migration

s'est effectuée normalement dans les spermatocytes de testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$.

De tels spermatocytes, présentant des figures de métaphases I anormales (hémi-fuseau centré dans la cellule et disposition aberrante des chromosomes) ont déjà été visualisés dans des cellules germinales de testicules de différentes lignées de souris dépourvues des gènes :

- MeioC (29): dans une lignée de souris *MeioC*$^{-/-}$,, le phénotype observé dans les cellules germinales mâles est, comme dans la lignée *Topaz1*$^{-/-}$, une altération du réseau de microtubulines lors de la mise en place des métaphases de première division de méiose. MeioC est impliqué dans la stabilisation des transcrits indispensables à la méiose. Afin de déterminer si la protéine TOPAZ1 pourrait être impliquée dans ce type de fonction, des expériences d'immunoprécipitation de la protéine TOPAZ1 pourront être envisagées lorsque nous disposerons d'un anticorps spécifiques anti-TOPAZ1 ou lorsque nous aurons créé une lignée de souris portant une étiquette (FLAG tag) sur la protéine TOPAZ1.
- Stra8 (30): gène responsable de l'initiation de la prophase I de méiose, les cellules germinales des souris dépourvues de ce facteur de transcription ne peuvent initier leur méiose. Les spermatocytes de ces souris présentent également une disposition aberrante des chromosomes de type "métaphase-like", non alignés sur la plaque équatoriale (13).
- La suppression de l'expression de la *cycline A1* (Ccna1) provoque également l'arrêt de la méiose mâle dans les spermatocytes en toute fin de prophase I, juste avant l'entrée en métaphase I (31), et une augmentation des cellules rentrant en apoptose (32). Ccna1 est une cycline spécifique des cellules germinales mâles et qui active, avec d'autres protéines, la transition vers la métaphase I (33) . Cet arrêt méiotique mâle des souris Ccna1$^{-/-}$ est lié à un défaut de séparation des chromosomes et à une réduction de l'activation de la *Cdc2* kinase qui permet la transition de prophase à métaphase de première division de méiose. Dans les testicules de souris invalidées pour le gène *Topaz1,* aucune altération du complexe synaptonémal n'est visible (15). Ceci

nous permet d'écarter, à priori, la piste d'un défaut de séparation du complexe synaptonémal.

- La suppression de l'expression de *MLH1* dans des testicules de souris, provoque également un défaut d'alignement des chromosomes, bloquant la méiose I en "métaphase-like" semblable à une pro-métaphase (34,35). La protéine MLH1 (marqueur des crossing-over) permet le maintien de l'appariement des chromosomes bivalents. En absence de MLH1, les chromosomes sont capables de se condenser et de fragmenter le complexe synaptonémal, mais l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique échoue. Ces spermatocytes rentrent alors en apoptose suggérant un point de contrôle d'assemblage du fuseau métaphasique essentiel à la méiose I.

Dans une formation adéquate du réseau de microtubulines et de positionnement adéquate des chromosomes sur l'équateur de la plaque métaphasique, le rôle de certaines protéines, localisées autour des chromosomes, peut également avoir un rôle. Dans cette étude nous n'avons pas observé de différences de localisation de protéines du kinétochore (MEIKIN, SA2, Rec8, SMC1β) des chromosomes en méiose I chez les souris dépourvues de TOPAZ1.

- MEIKIN est une protéine spécifique de la première division de méiose.

MEIKIN joue un rôle dans la stabilisation de la localisation du shugoshin, responsable de la mono-orientation des kinétochores sœurs (7). Lors de la mitose, le shugoshin est co-localisé avec les cohésines au stade prophase et pro-métaphase, puis leur localisation se sépare lorsque chacun des kinétochores sœurs sont tirés vers les pôles opposés de la cellule en mitose. Lors de la méiose, le shugoshin et les cohésines restent co-localisés grâce à un facteur de protection, la MEIKIN. Le site de clivage des centromères des chromatides sœurs est alors protégé contre la séparase, et chaque bivalent orienté vers le même pôle de la cellule en méiose. Au stade pachytène, MEIKIN apparait au niveau des centromères, lorsque les chromosomes homologues sont appariés. Puis, dès le stade diplotène, son signal diminue graduellement jusqu'en métaphase I, pour disparaitre en anaphase.

La suppression du gène murin entraine une infertilité dans les deux sexes. Chez le mâle *Meikin*$^{-/-}$, un défaut de ségrégation des chromosomes apparait au cours de la méiose (36).

- SA2 est une cohésine ubiquitaire, présente lors de la mitose et de la méiose, tout comme SMC1α, STAG1 et RAD2 (5).
- SMC1β et REC8 sont des cohésines spécifiques de la méiose, tout comme SA3 et RAD21L (6).

Chez la souris, les protéines dédiées à la maintenance structurale des centrosomes (SMC avec les protéines SMC1α, SMC1β et REC8) s'associent en forme d'anneau, le long des chromosomes appariés lors de la prophase I de méiose. La capacité du SMC à contenir les 2 brins d'ADN lui confère une activité de cohésion des chromatides sœurs. Si SMC1α disparait progressivement au stade diplotène et est indétectable en métaphase I, SMC1β reste associée aux régions centromériques jusqu'en métaphase II.

Rec8 apparait dès le stade préleptotène. Il se répartit le long des chromosomes appariés puis adopte une position centromérique jusqu'en métaphase II.

L'invalidation de Rec8 ou de SMC1β, dans l'espèce murine, entraine dans les deux lignées obtenues, une infertilité des femelles (37)(38) et des mâles (au stade pachytène pour les souris SMC1β$^{-/-}$ et au stade zygotène-like pour les souris Rec8$^{-/-}$) (20, 21).

La localisation de ces protéines des kinétochores, étudiées dans ce rapport, ne semble pas être altérée en absence de *Topaz1*.

Nous avons donc caractériser toute la région centromérique des chromosomes des souris *Topaz1*$^{-/-}$.

La fonction du centromère est défini épigénétiquement (20). C'est un domaine essentiel à la ségrégation des chromosomes. L'ADN situé au niveau du centromère est essentiellement constitué d'ADN à séquence répétées. CENP-A (variant de histone H3) forme un nucléosome spécifique du centromère, en s'associant avec les histones H2A, H2B et H4 (39). La modification de l'histone H3 méthylée sur le résidu K9 (H3K9me3), permettrait le recrutement de la cohésine essentielle au maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs, pour une séparation des chromosomes paternels et maternels, en première division de méiose. C'est la structure de la

chromatine associée à la région centromérique qui lui confère son implication dans l'assemblage du kinétochore. La triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3) est nécessaire au bon alignement des chromosomes. L'inactivation, par RNA interférence, de Suv4-20h, une méthyltransférase H4K20, entraine, dans l'ovocyte, une grande proportion d'ovocytes présentant des figures anormales de métaphase de première division de méiose (40).

Dans cette étude, la modification de l'histone H3 par la tri-méthylation de sa lysine en position 9 ne semble pas affectée par l'absence de *Topaz1*. Par contre, la localisation de la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 semble perturbée dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$. Afin de préciser l'impact de ce défaut de localisation de H4K20me3 dans les spermatocytes *Topaz1*$^{-/-}$, des études de co-localisation et d'immunoprécipitation de TOPAZ1 et de Suv4-20h (nommé aussi Kmt5c), methytransférase responsable de la tri-méthylation de H4K20me3, pourraient être envisagées.

Après la condensation des chromosomes, et à partir de la diacinèse tardive, deux centrosomes adjacents vont former un fuseau court de tubuline alpha et béta. Ce fuseau est dit bipolaire (41). Grâce à la disparition de la membrane nucléaire, les kinétochores de chaque chromosome méiotique sont capturés par les microtubules du fuseau court bipolaire. Par des jeux de tensions radiales et par la polymérisation du fuseau de microtubule, les chromosomes bivalents se dirigent mécaniquement vers l'équateur de la cellule et les deux centrosomes se séparent en direction des pôles opposés.

La mise en évidence des fuseaux de tubulines alpha et gamma, dans les spermatocytes de testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$, ont révélé une anomalie dans la mise en place de ce fuseau méiotique. Dans les testicules de souris Topaz1$^{-/-}$, le fuseau semble adopter une position centrale. Le point de convergence du réseau de microtubule semble situé au centre de la cellule et l'extrémité de chacun des fuseaux de microtubule semble être orientée vers la périphérie de la cellule, formant une sorte d'étoile. Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse que le centrosome, point de départ de la nucléation des fuseaux de microtubules, pourrait

être mal localisé dans la cellule ou que la duplication des centrioles n'a pas lieu correctement.
L'observation de doublet de centrioles et leur localisation pourrait nous permettre d'orienter notre hypothèse concernant les raisons du blocage de la spermatogénèse murine en absence de *Topaz1*. Effectivement, une altération de la migration ou de la duplication des centrioles aux pôles de la cellule serait délétère pour la ségrégation des chromosomes en anaphase de première division de méiose.

Cependant, l'observation au M.E.T des centrioles se heurte à plusieurs difficultés techniques. La première est le faible nombre de spermatocytes en métaphase visible par coupe ultrafine. La seconde est directement liée à la structure tridimensionnelle des cellules. La probabilité d'effectuer une coupe dans le plan passant par le doublet de centrioles est faible. De même, la probabilité d'effectuer une coupe dans le plan passant par les deux doublés de centrioles, situés à chaque pôle de la cellule germinale en métaphase, est d'autant plus faible.

IV. Partie 2 : Analyses transcriptomiques associées à l'étude du rôle de Topaz1

A. Résultats :

1. Analyse transcriptionnelle des testicules de souris Topaz1$^{-/-}$.

a) Séquençage des ARN

Afin d'évaluer l'impact de la suppression de l'expression de *Topaz1* sur l'état transcriptionnel des testicules de souris, nous avons procédé à une analyse RNAseq (RNA sequencing) afin de comparer les transcrits de testicules de souris WT *versus* de souris *Topaz1*$^{-/-}$.

L'objectif est de mettre en évidence des gènes dérégulés par l'absence de *Topaz1*. Pour cela, des analyses transcriptomiques des testicules des souris WT et *Topaz1*$^{-/-}$ ont été réalisées à 18,5 j*pp*, correspondant au stade en aval du blocage méiotique. Le stade de 18,5 j*pp* est choisi car nous cherchons à mettre en évidence des gènes dérégulés précocement dans la transition prophase I- métaphase I du à l'absence de *Topaz1*. Après alignement des transcrits sur le génome murin et comptage des transcrits, l*es* analyses statistiques (DESeq2) ont été effectuée et les critères retenus pour la sélection des gènes différentiellement exprimés sont les suivantes: (i) une p-value inférieure à 0,01 (correspondant à une probabilité de sélectionner de gènes non différentiels (gènes dits "faux-positifs") inférieure à 1%) et (ii) un log2 fold-change (Log2FC) inférieur à -1 ou supérieur à 1 (correspondant à des expressions différentielles des gènes 2 fois moins ou 2 fois plus exprimés respectivement, par rapport au contrôles). Ainsi, à 18,5 j*pp*, on obtient un total de 2294 gènes différentiellement exprimés entre les testicules de souris WT et Topaz1$^{-/-}$. Une analyse d'ontologies génétiques, permettant la classification des gènes selon leur domaine d'implication, par le logiciel Panther (http://www.pantherdb.org/) nous a permis d'obtenir une vue global des différents processus biologiques potentiellement impactés par l'invalidation de *Topaz1*(Figure 24A). La catégorie la plus représentée (350 gènes) est "processus cellulaire" qui comprend de nombreux gènes de l'organisation de la cellule (organisation de la chromatine, jonction cellulaire, organisation membranaire, facteurs de signal apoptotique, de facteurs liés aux microtubules…). L'analyse des de l'ensemble des transcrits présents dans des testicules de souris WT de 18.5 j*pp* révèle un profil d'ontologie génétique identique

(Figure 23). Les mêmes catégories géniques des processus biologiques sont représentées et dans les mêmes proportions. Ceci n'est pas étonnant puisqu'environ 15 000 gènes sont exprimés dans les testicules WT à 18.5 j*pp*, et seulement 2294 gènes sont différentiels entre WT et Topaz1-/-. Parmi ces 2294, uniquement 1208 sont considérés par le logiciel Panther pour l'analyse de l'ontologie génique, représentant seulement 8% des transcrits totaux.

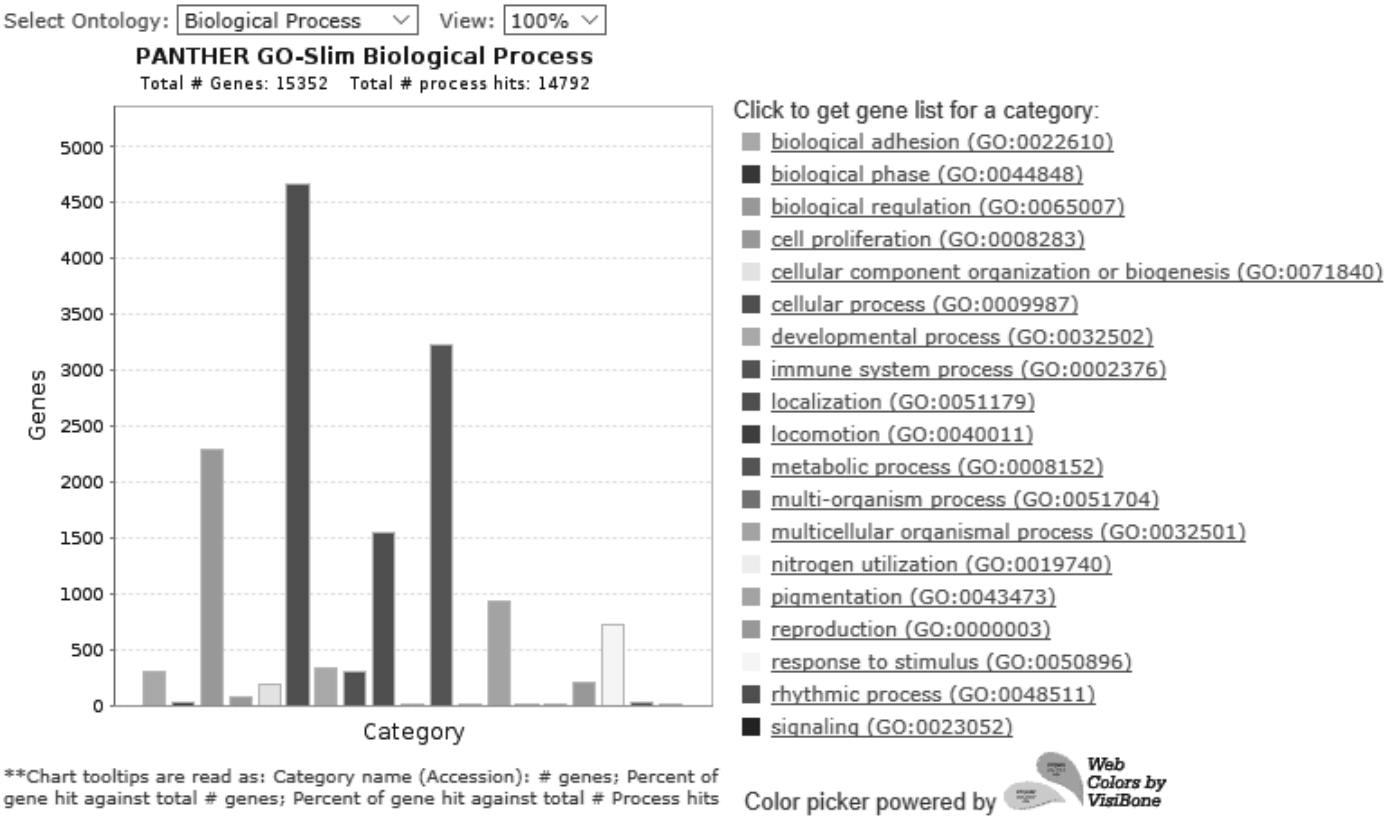


Figure 23.
Répartition par processus biologiques des transcrits exprimés dans des testicules de souris WT à 18,5 j*pp,* selon le logiciel Panther.

Concernant les gènes différentiellement exprimés entre WT et Topaz1$^{-/-}$, la catégorie de " reproduction", présente des sous-catégories "reproduction des organismes multicellulaire", "processus de reproduction" et "reproduction sexuée" (Figure 24B). En comparaison avec les transcrits présents dans les testicules de souris WT à 18,5 j*pp*, on retrouve 40% des gènes de la sous-catégorie "reproduction des organismes multicellulaire", 2,6% des gènes de la sous-catégorie "processus de reproduction" et

15% des gènes de la sous-catégorie "reproduction sexuée" dérégulés dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$.

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre testicules de souris Topaz1$^{-/-}$ *versus* souris WT, 28% sont des lncRNAs (ARN non codants longs) (Figure 25).

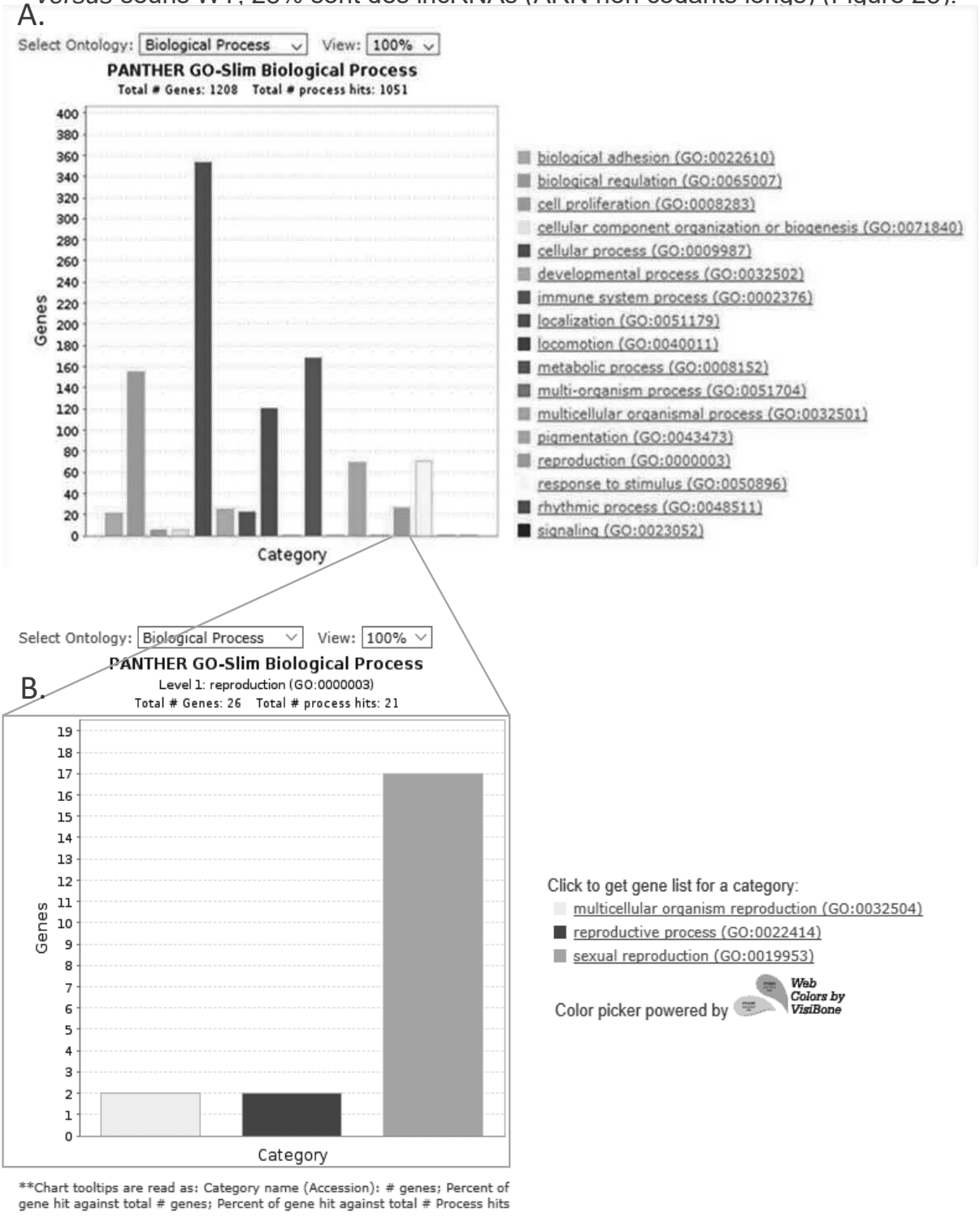


Figure 24.

Répartition par processus biologiques des transcrits différentiellement exprimés entre des testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ versus*Topaz1*$^{+/+}$ à 18,5 j*pp*(A) et répartition de la catégorie reproduction en sous

catégories fonctions de reproduction des transcrits différentiellement exprimés entre des testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ versus *Topaz1*$^{+/+}$ à 18,5 j*pp* (B) selon le logiciel Panther.

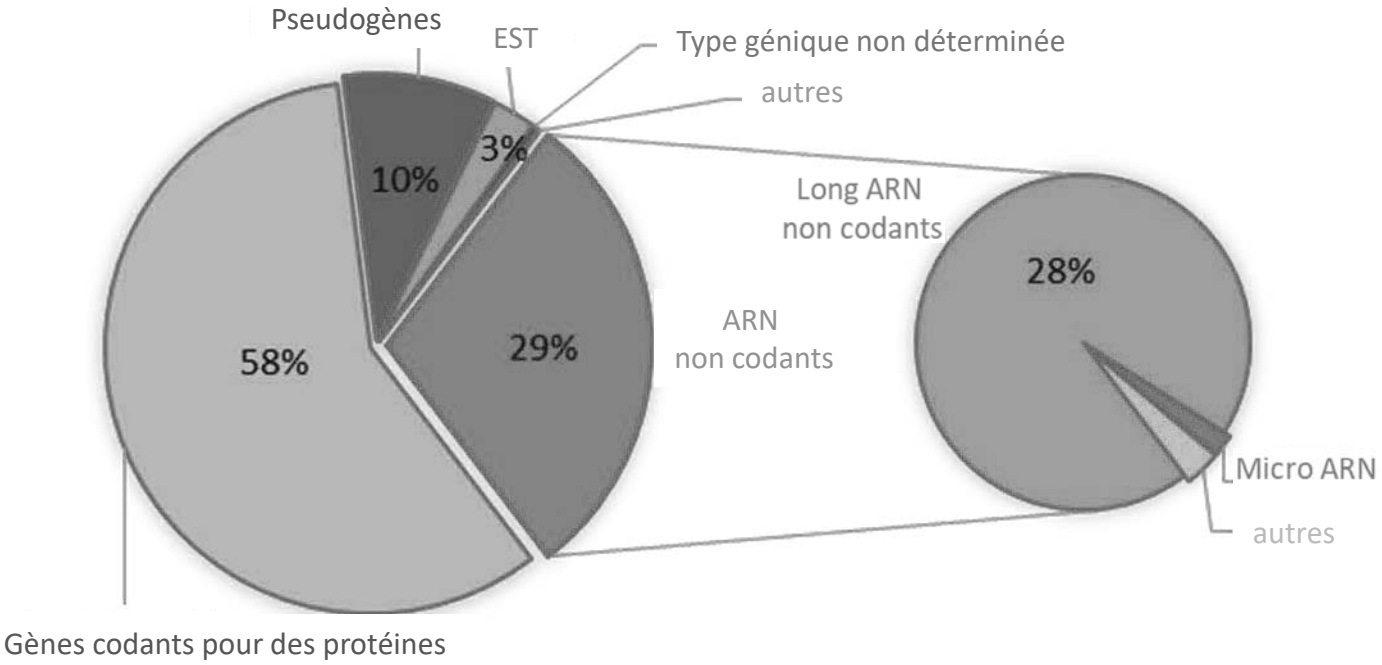


Figure 25.
Répartition par types géniques des transcrits différentiellement exprimés entre des testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ versus *Topaz1*$^{+/+}$ à 18,5 j*pp*, pour une -p-value inférieure à 0,05 et un fold-change supérieur ou inférieur à ±2.

Tableau 3 : Probabilités d'interaction entre lncRNA-Chr10 et TOPAZ1 à l'aide du logiciel RPISeq. Les prédictions avec des probabilités supérieures à 0,5 sont considérées comme positives.

Interaction probabilities of lncRNA-Chr10	TOPAZ1
Prediction using RF classifier	0.75
Prediction using SVM classifier	0.96

b) Caractérisation du LncRNA du chromosome 10

Parmi les ARN longs non codants mis en évidence, l'un d'eux, 4930463O16Rik, est exprimé assez précocement (15 j*pp*), un peu après l'expression de Topaz1, et son expression est quasi-nulle dans les testicules de souris Topaz1$^{-/-}$. Nous appellerons ce gène lncRNA-Chr10 étant situé sur le chromosome 10 murin.

La base de prédiction d'interactions ARN-protéine RPISeq (http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/) prédit que la protéine TOPAZ1 a une bonne probabilité d'interaction avec lncRNA-Chr10 (Figure 26).

A notre connaissance, le *lncRNA-Chr10* n'a jamais été décrit et étudié. Dans les bases de données publiques, le gène murin a une longueur de 9383 pb et comporte 4 exons et 3 introns putatifs (Figure 27). L'ARN messager de ce gène, toujours d'après les bases de données publiques, représente 2329 pb.

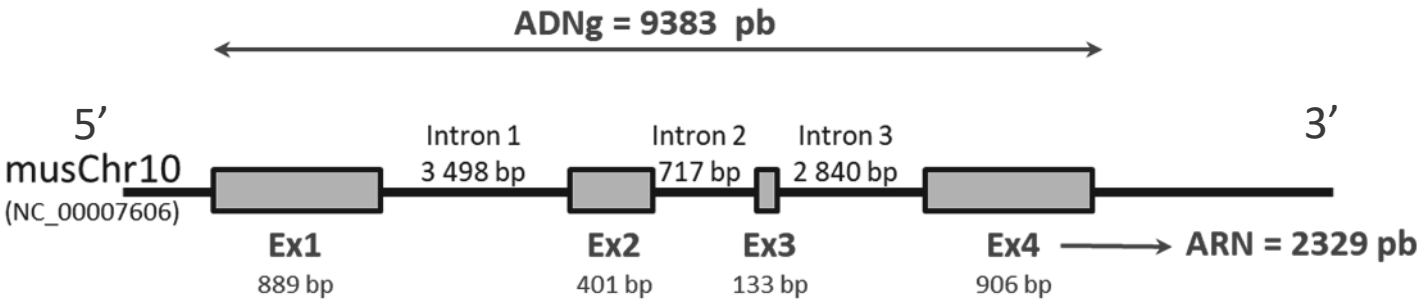


Figure 27.
Représentation du gène codant pour le lncRNA-Chr10 comme décrit dans les bases de données publiques (NCBI, Ensembl!). Le gène a une taille de 9383pb et possède 4 exons et 3 introns. *Le lncRNA-Chr10* a une longueur de 2329 pb.

L'expression du *lncRNA-Chr10* a donc été étudiée au laboratoire par RT-PCR. Il n'est pas exprimé dans les tissus somatiques testés et est fortement exprimés dans le testicule murin (Figure 29A). L'étude a également montré que son expression testiculaire débute à partir de 15 j*pp* et augmente au cours du développement et que son expression est fortement réduite dans les testicules des souris Topaz1$^{-/-}$ (Figure 28B). Le profil d'expression du *lncRNA-Chr10* corrèle avec le profil d'expression de *Topaz1* (Figure 28A). Enfin des hybridations *in situ* (HIS) ont permis de mettre en évidence une expression du *lncRNA-Chr10* dans les spermatocytes I (les mêmes cellules où est exprimé Topaz1) chez les souris WT à 20 j*pp* et adultes. Par HIS,

nous confirmons l'absence de LncRNA-Chr10 dans les spermatocytes chez les souris Topaz1$^{-/-}$ (Figure 29B).

Ainsi, l'absence de Topaz1 induit une forte sous-expression de ce *lncRNA-Chr10* dans les spermatocytes de souris.

Ce lncRNA-Chr10 n'ayant jamais fait l'objet d'étude biologique, nous avons choisi, dans un premier temps, de caractériser d'un point de vue moléculaire le gène de LncRNA-Chr10.

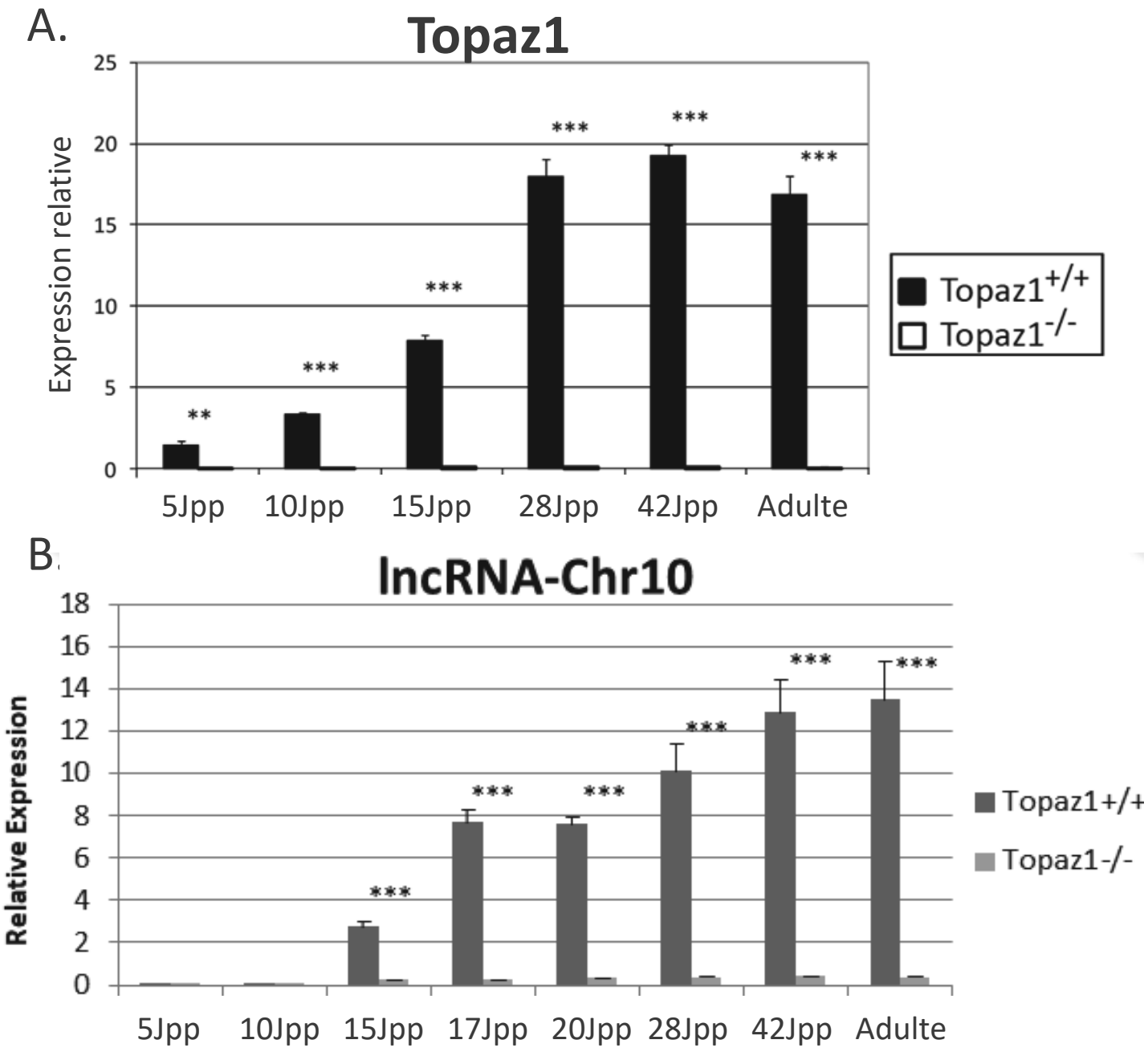
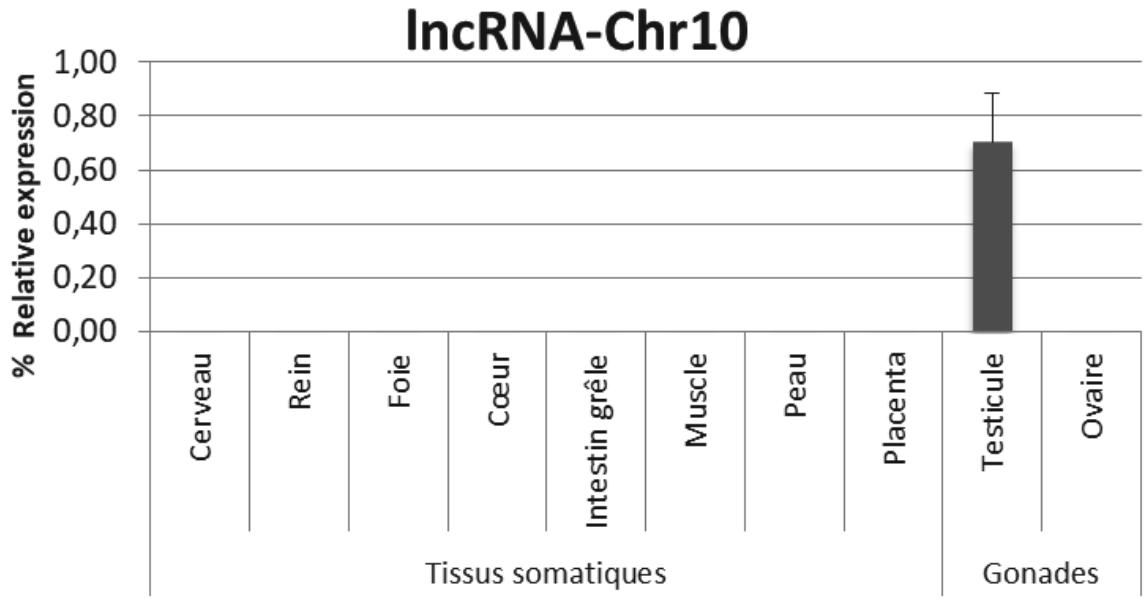


Figure 28.

Expression relative de Topaz1 (A) et du LncRNA-Chr10 (B) chez la souris WT de la naissance au stade adulte. Les tests de statistiques sont effectués entre souris WT et *Topaz1*$^{-/-}$ à un même stade, et représentés sous forme de moyenne avec ± *S.E.M (standart Error of the Mean)* $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$.

A.



B.

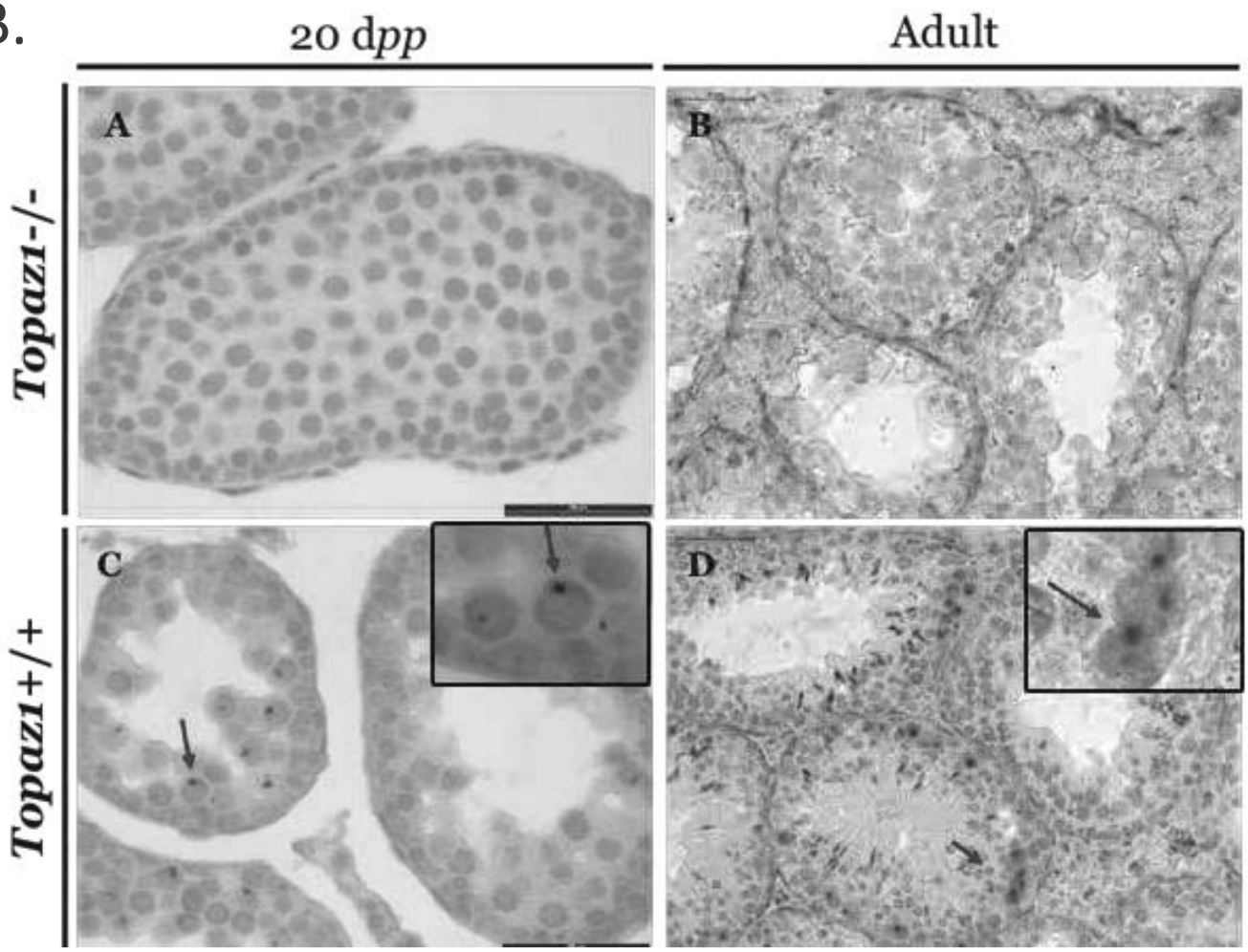


Figure 29.

Expression relative de LncRNA-Chr10 dans différents tissus chez la souris WT (A). et Hybridation *in situ* de LncRNA dans les testicules de 20 j*pp* et adultes de souris Topaz1$^{+/+}$ et Topaz1$^{-/-}$(B).

c) Caractérisation moléculaire du LncRNAChr10.

Dans de but de confirmer la présence des 4 exons prédits dans les bases de données publiques, des PCR quantitative (qPCR) ont été réalisées avec des couples d'amorces s'hybridant sur chacun des 4 exons du gène. L'ARN extrait, puis rétro-transcrit en ADNc, est issu de testicules de souris WT adultes. Les résultats de qPCR sont présentés sur la Figure 30A. Ainsi, nous mettons en évidence que le *lncRNA-chr10* présent dans les testicules de souris WT adulte, contient les 4 exons prédits. Le témoin positif de l'expérience est représenté par l'exon 2 de *Topaz1*. Ainsi, les 4 exons prédits par les bases de données sont bien présents dans l'ADNc rétrotranscrit, attestant que ces fragments amplifiés sont bien présents dans l'ARN mature.

Par la suite, des qPCR ont été réalisées à partir d'ADNc issus de testicules de souris adultes WT mais avec des couples d'amorces s'hybridant de part et d'autre des différents exons du gène lncRNA-Chr10 afin de s'assurer que les séquences introniques prédites ne possèdent pas d'exon supplémentaire non prédit (Figure 30B). Ainsi, une courbe d'amplification est détectée si les introns sont épissés comme attendu. Dans nos conditions d'amplification, le temps d'élongation de l'amplicon néo-synthétisé ne permet pas d'amplification supérieur à 120pb. Si les séquences considérées comme introniques ne sont pas épissées, la longueur du fragment entre chaque paire d'amorces sera trop importante pour qu'il y ait amplification par qPCR. Les résultats des qPCR ont mis en évidence des courbes d'amplification correspondant aux fragments amplifiés pour chaque paire d'amorces utilisés (Figure 30B). De plus la migration sur gel des produits de PCR réalisés avec des couples d'amorces s'hybridant de part et d'autre des différents exons du gène lncRNA-Chr10 montre que la taille obtenue de ces fragments est bien celle attendue (Figure 31 A-B), même si la possibilité d'amplifier le pré ARN messager, donc non épissé, reste possible. Ainsi, les séquences prédites comme introns entre les exons 1-2, 2-3 et 3-4 sont bien épissés lors de la maturation du lncRNA.

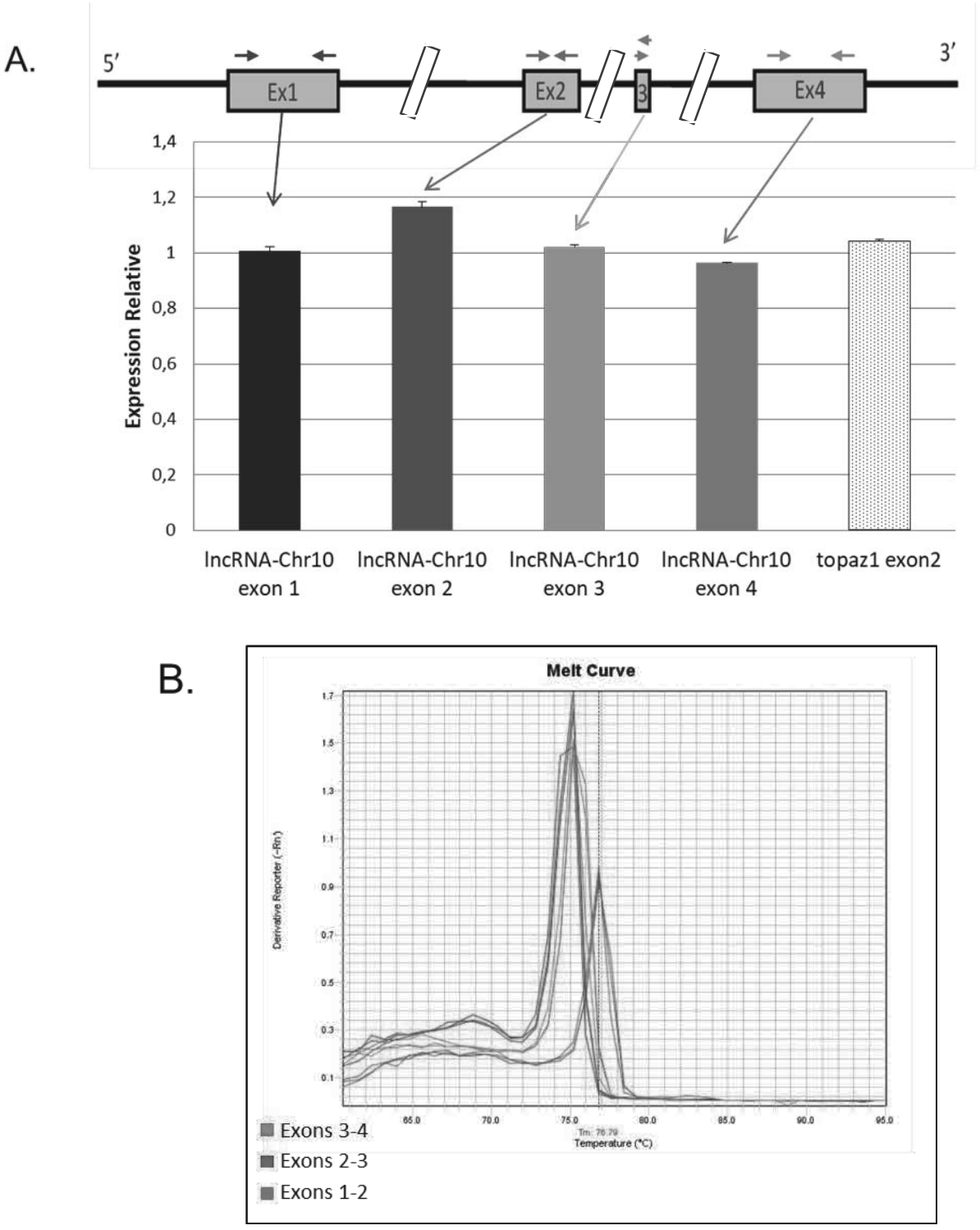


Figure 30.

Expression relative des 4 exons du lncRNA-Chr10 et de l'exon 2 de Topaz1 (témoin positif) dans les testicules de souris adultes WT (A). Courbes d'amplification des qPCR obtenues à partir d'ADNc de testicules de souris adultes WT et visant à amplifier les exons consécutifs deux à deux (B).

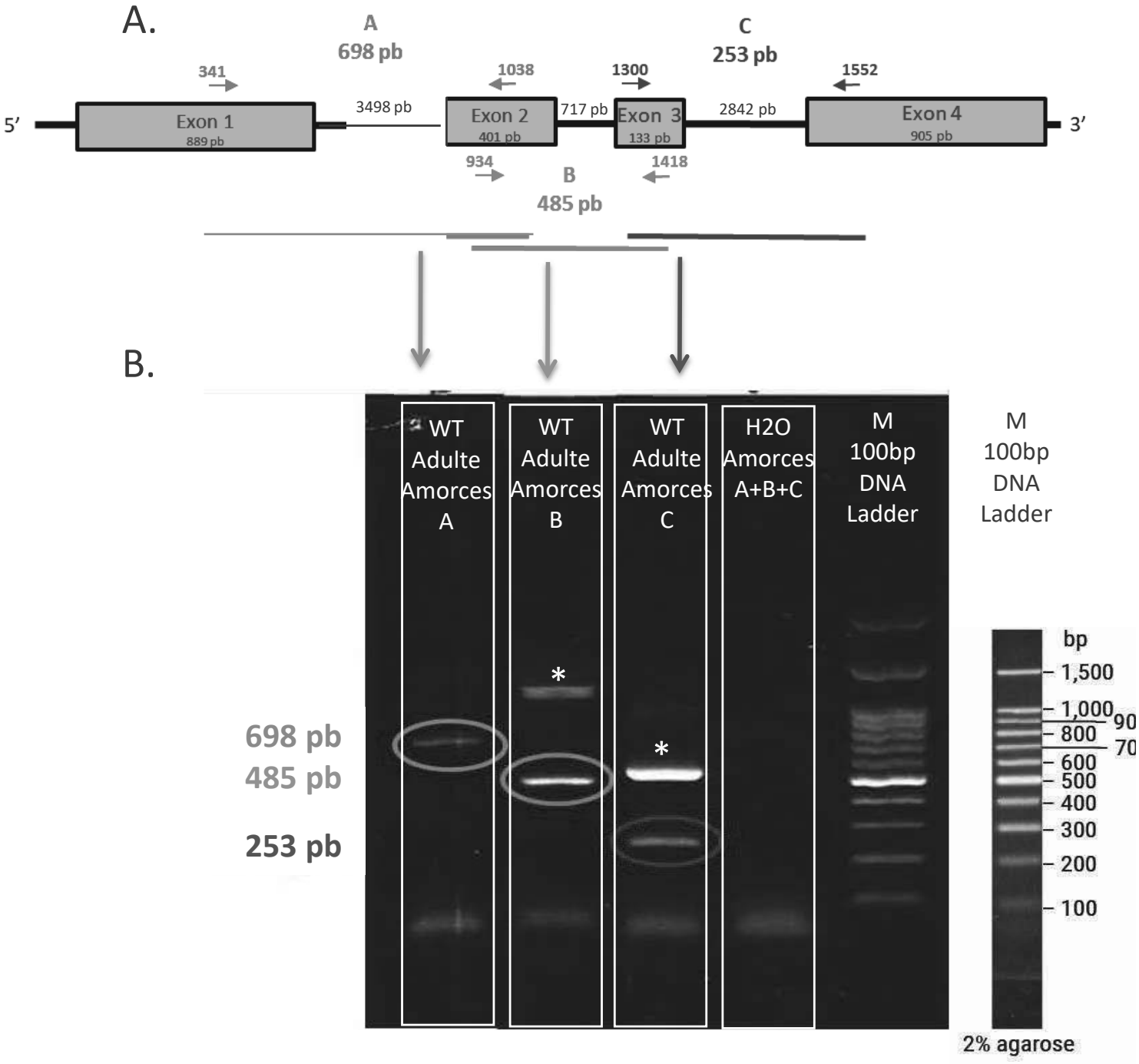


Figure 31.

Représentation schématique de l'ADNg du lncRNA-Chr10 et des couples d'amorces utilisées pour les PCR (A). Produits de PCR obtenus à partir d'ADNc issu de rétrotranscription de testicules de souris WT avec les couples d'amorces A, B et C permettant d'amplifier les exons deux à deux (B). Les produits de PCR de taille supérieure désignés par * ont été séquencés et sont aspécifiques.

L'ensemble de ces résultats confirme qu'il y a donc une amplification par qPCR entre les différents exons démontrant une absence d'exons supplémentaires entre les exons prédits 1 à 4.

Le but est maintenant de déterminer plus précisément les sites d'initiation de la transcription et de terminaison de la transcription du gène lncRNA-Chr10 afin de connaitre le début de l'exon 1 (5') et la fin (3') de l'exon 4 de ce gène non codant. Pour ceci, des PCR ont été réalisées avec différents couples d'amorces répartis en 5' de l'exon 1 putatif et en 3' de l'exon 4 putatif, et en comparant les résultats obtenus à partir d'ADNc, issu de la rétrotranscription du lncRNA-Chr10, ou d'ADNg. Ainsi si un fragment de PCR est amplifié à la taille attendue à partir de l'ADNc et de l'ADNg, ceci signifie qu'il y a bien eu transcription de ce fragment (via l'ADNc); si un fragment de PCR n'est pas amplifié à partir de l'ADNc alors il n'y a pas eu transcription, l'amplification de l'ADNg servant de témoin positif de PCR.

Des PCR sont réalisées avec des couples d'amorces permettant de remonter en 5' du gène et de comparer l'ADNc à l'ADNg. Ainsi le premier couple d'amorce testé est le couple Y qui possède sa séquence oligonucléotidique ("anti-sens") sur l'extrémité 5' putative de l'exon 1 (début de l'exon putatif = +1) et un oligonucléotide "sens" à -305 pb en amont de l'extrémité 5' putative de l'exon 1 (Figure 32A). Le même principe est réalisé avec deux autres couples d'amorces X et Z décalés davantage en amont de l'exon 1 putatif.

Les résultats des PCR sont présentés sur la Figure 32B et montrent:

- Une amplification de 351 pb pour le couple d'amorces Y pour l'ADNg et l'ADNc WT.
- Une amplification de 304 pb pour le couple d'amorces Z pour l'ADNg et l'ADNc WT.
- Une amplification de 371 pb pour le couple d'amorces X pour l'ADNg mais pas pour l'ADNc.

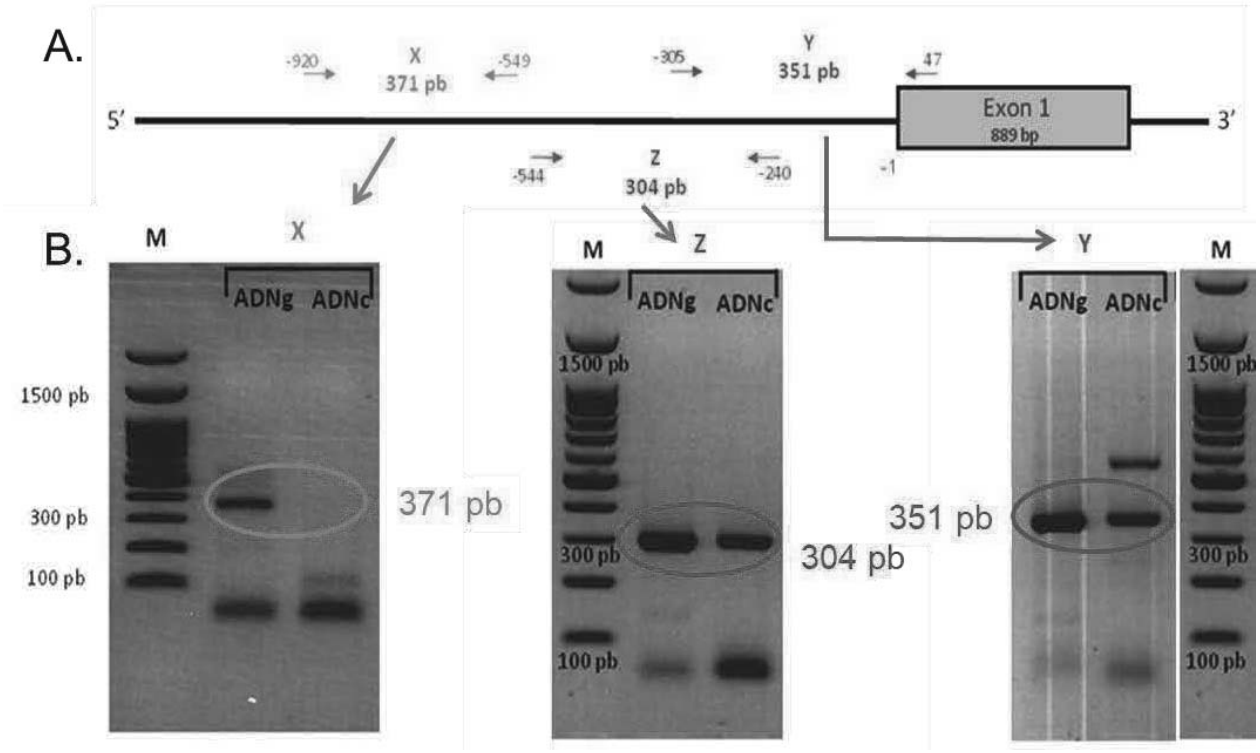


Figure 32.
Représentation schématique de l'extrémité 5' de l'ADNg du lncRNA-Chr10 et des couples d'amorces utilisées pour les PCR (A). Produits de PCR obtenus à partir d'ADNg ou d'ADNc issus de testicules de souris WT avec les couples d'amorces X, Y et Z (B).

Les couples d'amorces Y et Z mettent en évidence une amplification avec l'ADNc. Ceci démontre que le gène *LncRNA-Chr10* est transcrit en ARN au moins à partir de -544pb par comparaison au site d'initiation putatif de la transcription des bases de données. Au contraire, le couple d'amorces X montre une absence d'amplification sur l'ADNc. Ainsi, la transcription de l'ADNg commence entre -920 pb et -544 pb. Le début de la transcription effective dans les testicules de souris est donc situé dans ces 376 pb et correspond au début de l'exon1.

Pour l'ensemble de ces expériences, des témoins négatifs (matrice=H_2O) et des témoins positifs de PCR (amplification des échantillons avec des amorces ciblant la GAPDH, gène ubiquitaire) ont été réalisés et les résultats sont en accord avec ce qui est attendu (résultats non présentés dans ce rapport).

Dans la séquence génomique en 3' de l'exon 4 prédit, nous avons identifié deux sites potentiels de polyadénylation (séquence consensus AATAAA). Ces séquences pourraient induire, 20-40 pb en aval, l'arrêt de la transcription, (Figure 33A). Les ARN

non codants longs ne sont pas tous polyadénylés (42). Ces sites nous ont permis de positionner des amorces de PCR situés de part et d'autre de ces sites (couples W et U, Figure 33B). Il a donc été déterminé si l'un de ces deux sites pouvait déclencher un arrêt de la transcription du lncRNA.

Le couple d'amorces W qui entoure un premier signal de polyadénylation, le plus proche de la fin putative de l'exon 4, permet une amplification par PCR à partir de l'ADNg et de l'ADNc. Ainsi cette séquence est bien transcrite et l'exon 4 a donc une taille qui peut être rallongée à minima de 239 pb par rapport à ce qui est actuellement disponible dans les bases de données.

La séquence entourée par le couple d'amorces U contenant le second signal de polyadénylation n'a été amplifié qu'à partir d'ADNg. Il n'y a pas d'amplification de l'ADNc. Cette séquence d'ADNg (ou une partie) n'a donc pas été transcrite en ARN (et donc pas rétrotranscrite en ADNc), ce empêche l'amplification à partir d'ADNc. Ce résultat permet de supposer que la fin de transcription du gène d'intérêt est situé à l'intérieur de la séquence amplifiée par les amorces du couple U.

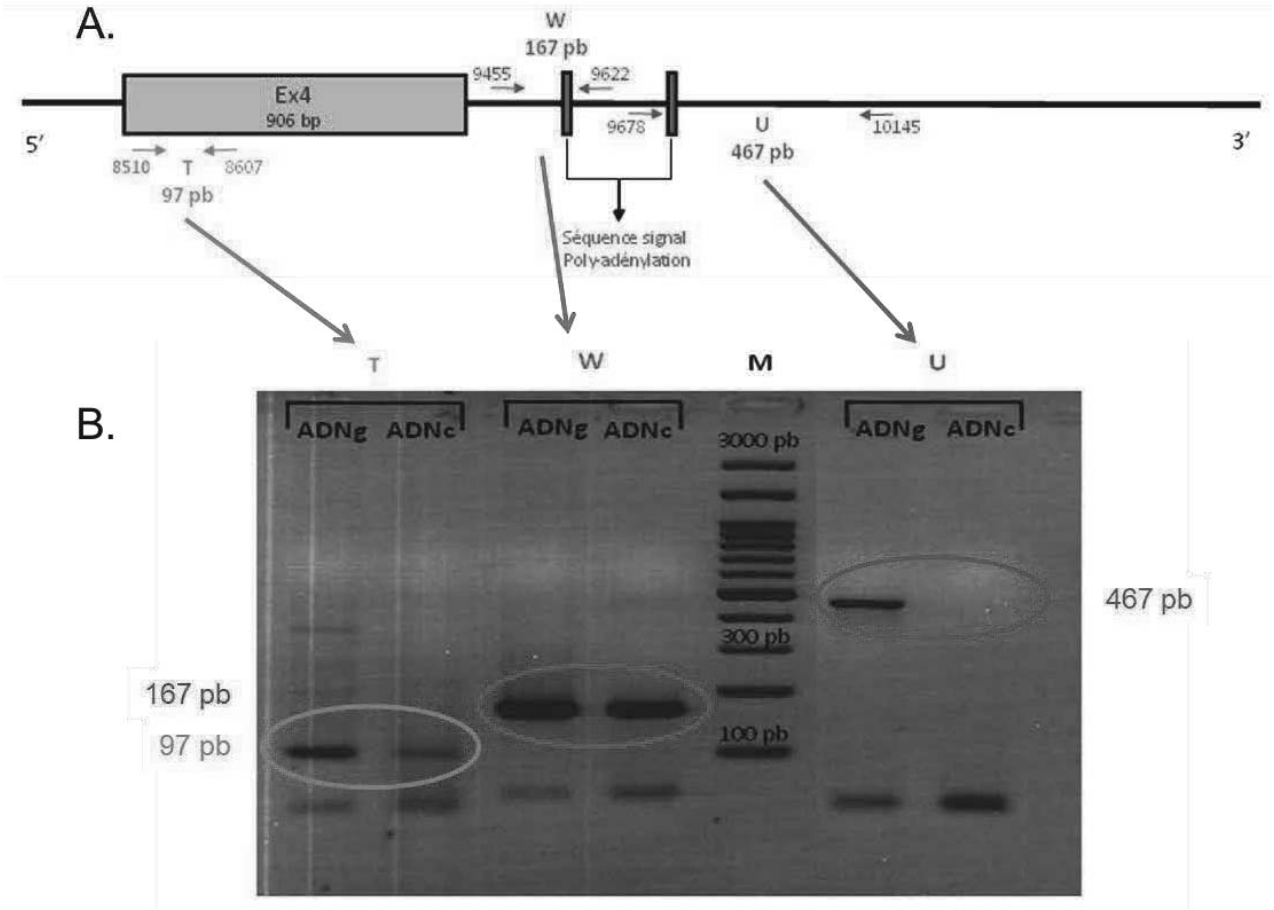


Figure 33.
Représentation schématique de l'extrémité 3' de l'ADNg du lncRNA-Chr10 et des couples d'amorces utilisées pour les PCR (A). Produits de PCR obtenus à partir d'ADNg ou d'ADNc issus de testicules de souris WT avec les couples d'amorces nommés T, W et U (B).

Là encore, pour ces expériences, des témoins négatifs et positifs de PCR ont été réalisés et les résultats sont en accord avec ce qui est attendu (résultats non présentés dans ce rapport). Le couple d'amorces T, situé dans l'exon 4, est aussi un témoin positif permettant l'amplification de l'ADNc et de l'ADNg à la taille attendue.

d) Suppression du LncRNAChr10, dans une lignée de souris.

Afin de découvrir le rôle du lncRNA-Chr10, nous avons établi des lignées de souris (C57BL6NRJ) dépourvues d'une partie ou de toute la longueur du gène du *LncRNA-Chr10*. Ces lignées ont été établies par utilisation du système Crispr/Cas9. Des guides-ARN ont été dessinés au laboratoire puis produits par l'équipe de JP Concordet (MNHN - CNRS UMR 7196 / INSERM U1154 - Sorbonne Universités).

Les micro-injections ont été réalisées par une collaboration avec l'équipe MoDit de l'UMR-GABI de l'INRA de Jouy en Josas. Deux stratégies sont déployées. La première consiste à cibler la totalité du gène (les 4 exons et introns, pour une délétion de 10kb environ), alors que la seconde cible uniquement l'exon 4 de ce LncRNA (délétion de 1700pb) (Figure 34). Cet exon 4 est ciblé préférentiellement car c'est celui qui est retrouvé le plus conservé entre différentes espèces de mammifères. Chaque micro-injection a été effectuée avec un mélange de deux guides-RNA en amont et deux guides-RNA en aval de la séquence à cibler. En effet, il a été démontré que l'utilisation d'un doublé de guide-ARN tend à augmenter l'efficacité du système CrispR/Cas9 (43). Nous avons ainsi pu établir plusieurs lignées indépendantes dont le phénotype a été étudié.

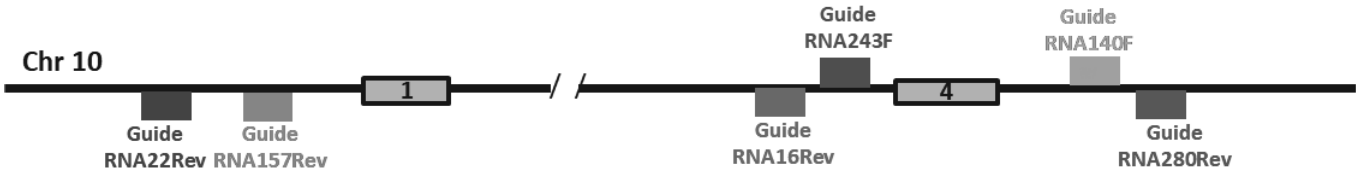


Figure 34.
Représentation schématique de la stratégie d'invalidation du gène LncRNA-Chr10.
Stratégie 1 : suppression de la totalité du gène LncRNA (guides RNA22Rev/157Rev + guides RNA140F/280Rev).
Stratégie 2 : suppression de l'exon 4 du gène LncRNA (guides RNA16Rev/243F + guides RNA140F/280Rev).

Deux lignées par stratégies (présentées schématiquement dans la figure 34) ont été établies. Afin de déterminer le génotype des animaux obtenus, une PCR est effectuée entre l'exon 1 et l'exon 4 du *lncRNA-Chr10* pour identifier la délétion de la stratégie 1, ou effectuée dans l'exon 4 pour identifier la délétion de la stratégie 2 (Figure 35.A). Le contrôle du génotype WT est effectué grâce à l'amplification par PCR d'un fragment de 352pb situé dans l'exon 2 du *lncRNA-Chr10* (Figure 35.B).

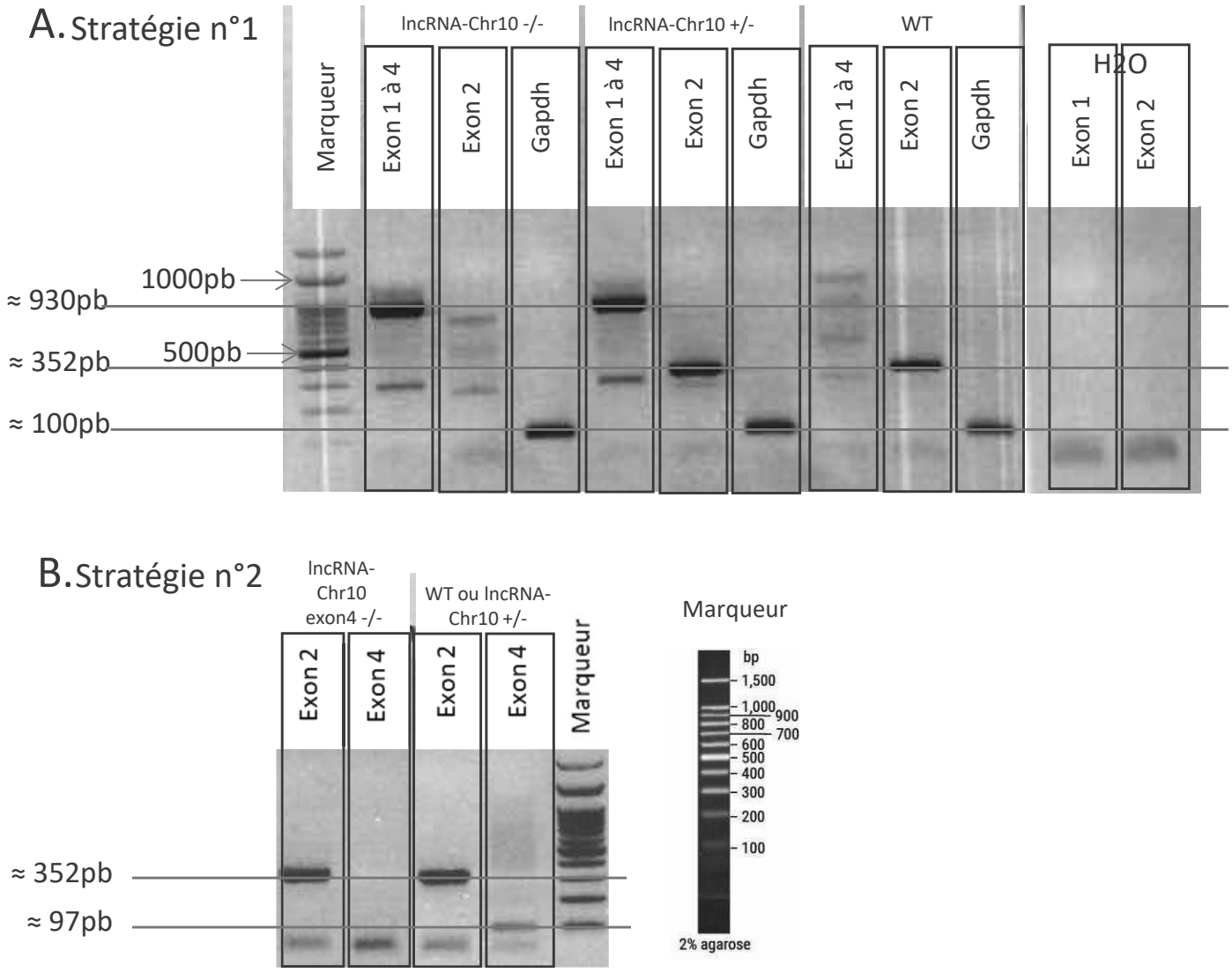


Figure 35.
Exemple de génotypage des souris obtenues selon la stratégie 1 (A.) et la stratégie 2 (B.) des lignées dépourvues de lncRNA-Chr10 (A.) ou de l'exon 4 du lncRNA-Chr10 (B.). Pour la stratégie 1, un produit de PCR à environ 930pb est obtenue pour une délétion de l'exon 1 à 4. Un produit de PCR à 352pb, est obtenue lorsque la délétion n'a pas eu lieu et correspondant à une amplification dans l'exon 2 (A.). Pour la stratégie 2, un produit de PCR à 97pb est absent lorsque l'exon 4 é été. L'amplification de l'exon 2 de 352pb sert de contrôle positif (B.)

Les différents oligonucléotides utilisés pour permettre la réalisation de toutes ces analyses transcriptionnelles, sont présentés dans le tableau suivant :

gène	oligonucléotide sens	oligonucléotide anti-sens	figure N°
Topaz1	5' - CACCGGAGAAGCAACCTTTTACAGA - 3'	5' - TTTGCACCCTGGCTCCTTGGT - 3'	4
LacZ	5' - CACCGGAGAAGCAACCTTTTACAGA - 3'	5' - GCGGAATTCCGGAAAACTTTATCCAT - 3'	4
GAPDH	5' - GCATCTCCCTCACAATTTCCA - 3'	5' - TGCAGCGAACTTTATTGATGGT - 3'	4
4930463o16Rik exon 4	5' - CAGAAAGGAAGCCATCTTGC - 3'	5' - GATGGTGGTTGTTGTTGGTG - 3'	23
4930463o16Rik exon 1	5' - GTCCTTCCTTTGCGACATTG - 3'	5' - TTGGTGTTTCTGCTCAGTGG - 3'	24 A
4930463o16Rik exon 2	5' - TGTGAAGATGGTTCCAGAGG - 3'	5' - CCTTTTCTTCCATCAGTCTGG - 3'	24 A
4930463o16Rik exon 3	5' - GTCAGCCTGCAAGAAATCC - 3'	5' - AATGAGGGCAGTGCCTAAGAC - 3'	24 A
4930463o16Rik exon 1/2	5' - TTTGGTCCTTGTTCCCTTCA - 3'	5' - GCTCAGGCAGTTCTCATGGT - 3'	24 C,D
4930463o16Rik exon 2/3	5' - GCTCCCAGACTGATGGAAGA - 3'	5' - CTGCTTGAGCATCTCCCTCT - 3'	24 C,D
4930463o16Rik exon 3/4	5' - CAAGCAGGCATGACGAATTA - 3'	5' - GCAAGATGGCTTCCTTTCTG - 3'	24 C,D
4930463o16Rik X	5' - GCTTAGTCACCAGGGAGTGG - 3'	5' - TCAGAGCTAAGGGCTGGAAA - 3'	25
4930463o16Rik Y	5' - CTCAAGGCAGGTTTGAGGAC - 3'	5' - ATACAGGGCGTGGAGAAATG - 3'	25
4930463o16Rik Z	5' - GAGGCCTGTGACATTTGGTT - 3'	5' - TGGGCCGTTAGAGAAATCTG - 3'	25
4930463o16Rik T	5' - CAGAAAGGAAGCCATCTTGC - 3'	5' - GATGGTGGTTGTTGTTGGTG - 3'	26
4930463o16Rik W	5' - TAGCAAATTCCAGGCAATCC - 3'	5' - CCTCCCAGAATGCACTTGAT - 3'	26
4930463o16Rik U	5' - GTCCTTGCCTGGGACAGTAA - 3'	5' - TGTGACTTCACGTGGTGGAT - 3'	26
gRNA22rev	-	5' - GTCTATGGCAAGGAAGTCCGGCT - 3'	27
gRNA157rev	-	5' - GTTAGAATATGACCGTTAGGG - 3'	27
gRNA16rev	-	5' - GCTCTAGGATGGGATTAATTGTC - 3'	27
gRNA243fw	5' - GAGAGCTAACCTTATGAATG - 3'	-	27
gRNA140fw	5' - GCCAGGTATGTGCTATTTGCT - 3'	-	27
gRNA280rev	-	5' - TTTCATGTACTCCCCGTGCA - 3'	27

Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés.

B. Discussion :

L'analyse transcriptomique par RNAseq permettant d'effectuer une comparaison d'expression entre testicules de 18,5j*pp* de souris WT et de souris *Topaz1*$^{-/-}$ a permis de mettre en évidence 2294 gènes différentiels dans nos conditions (pval<0,01 et Log2FC±1). Parmi ces gènes dérégulés, dans la, on trouve les gènes *maëlstrom* et *piwiL1* (aussi nommé Miwi chez la souris), qui sont situés, selon la répartition ontogénique du logiciel Panther, dans la sous-catégorie "reproduction sexuée". Ces

gènes sont effectivement connus par avoir un rôle fondamental dans les spermatocytes de souris au cours de la méiose I (15).
De plus, parmi les gènes différentiellement exprimés entre testicules de souris Topaz1$^{-/-}$ *versus* souris WT, 28% sont des lncRNAs (ARN non codants longs). Parmi eux, un lncRNA situé sur le chromosome 10 (lncRNA-Chr10). Cet ARN non codant long est également retrouvé sous exprimé dans les KO *Mov10L1,* qui code pour une *RNA* helicase essentielle pour la fertilité mâle chez la souris (44), ainsi que dans le KO de *Mybl1* , facteur de transcription indispensable à l'initiation de la production de piRNA au stade pachytène de méiose I (45) dans les spermatocytes de souris. Bien que la suppression de l'expression de *Topaz1* ne perturbe pas l'expression de *Mov10L1* et de *Mybl1* dans les testicules de souris à 18,5 j*pp*, l'absence des protéines TOPAZ1, MYBL1 et MOV10L1 entraine une absence d'expression ou une régulation négative de l'expression de *lncRNA-Chr10* dans les testicules de souris.

Les lncRNA sont des ARN qui ne sont jamais traduits en protéines. Les longs ARN non codants agissent à travers divers mécanismes pour réguler l'expression des gènes codants.

- Ils peuvent être des compétiteurs (ou obstructeurs) de certaines protéines liant des acides nucléiques. C'est le cas de certains lncRNAs qui empêchent la fixation de DNMT1 (DNA méthyl transférase 1) sur(46). L'état de méthylation d'une région cible d'ADN peut ainsi être affecté, ce qui entraine, par exemple, une activation de la transcription.
- Ils peuvent être dégradés par certaines RNases (comme Dicer) pour produire des petits ARNs non codants (microARNs). C'est le cas par exemple de H19 et de HongrES2(47,48).
- Ils peuvent renter en compétition avec des microARNs et ainsi protéger des ARNm de la dégradation par ces petits ARNs…

La transcription des lncRNAs semble particulièrement associée à des phénotypes cellulaires et tissulaires complexes (cerveau, testicule) et plastiques (système immunitaire, développement embryonnaire). Des études ont montré que, en général, les lncRNAs pourraient jouer un rôle important dans le développement testiculaire et la spermatogenèse (49). Ils sont exprimés de façon équivalente sur les différents

chromosomes de la souris (39). Cependant, peu de lncRNA ont un rôle établi dans le testicule.

Afin de découvrir le rôle du lncRNA-Chr10, nous avons établi des lignées de souris (C57BL6NRJ) dépourvues d'une partie (de l'exon 4) ou de toute la longueur du gène du *LncRNA-Chr10*.
Les animaux mutants sont viables. La capacité de reproduction de chacune de ces lignées ne semble pas être perturbée par l'absence de soit 10Kb (stratégie 1), soit 1700 pb (stratégie 2). Aucune différence phénotypique notable n'a pu être observée entre les lignées de souris dépourvues de 10kb du LncRNA-Chr10, ou dépourvu de l'exon 4 du LncRNA-Chr10, par comparaison avec des souris sauvages du même fond génétique.
Aussi, le lncRNA ne semble pas être indispensable à la spermatogénèse murine (sa suppression n'a pas d'effet sur la fertilité). Il est possible que la suppression du lncRNA-Chr10 est déclenché un système de compensation de fonction par d'autres ARNs non codants longs. Il a récemment été montré que la suppression de certains lncRNA, spécifiquement exprimés dans les testicules, est sans effet sur la fertilité mâle (50). Cependant, le profil d'expression du *lncRNA-Chr10*, la spécificité testiculaire du *lncRNA-Chr10* et son potentiel d'interaction avec la protéine TOPAZ1 en font un bon candidat pour la recherche des acteurs de la spermatogénèse murine.

V. Conclusions et perspectives :

Le gène Topaz1 est indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse murine et plus particulièrement joue un rôle essentiel en fin de prophase et début de métaphase de la première division de méiose de cette spermatogenèse. La suppression de ce gène dans une lignée de souris entraine une stérilité mâle par arrêt de la spermatogenèse avec blocage méiotique.

Au laboratoire, avant le début de ce diplôme EPHE, toutes les différentes étapes qui interviennent pendant la prophase I de méiose ont été comparées entre testicules de souris Topaz1$^{+/+}$ et Topaz1$^{-/-}$ (par des techniques de biologie moléculaire, d'histologie, immunochimie...). En effet, pour beaucoup de gènes où la délétion entraine une stérilité mâle murine, le point de blocage se situe plutôt au cours de la prophase I, voire même au stade pachytène. Ainsi l'appariement des chromosomes (complexe synaptonémal), la formation de la vésicule sexuelle (au niveau des chromosomes X et Y) et la répression des rétrotransposons ont été vérifiés au laboratoire, et sont comparables à des testicules de souris sauvages (15). La prophase I semble évoluer normalement chez les souris Topaz1$^{-/-}$. L'arrêt de la spermatogenèse se fait avant l'obtention des cellules germinales haploïdes (aucune cellule haploïde détectée dans les testicules de souris Topaz1$^{-/-}$).

Aussi, nous nous sommes donc intéressés à l'étape qui suit la prophase I, à savoir la métaphase I. L'immunofluorescence réalisée sur des coupes de testicules de souris mutées a montré un défaut de mise en place du réseau de microtubules. Dans une cellule germinale normale, chaque paire de centrioles commence à se déplacer à un pôle de la cellule (pro-métaphase), formant ainsi, à la métaphase, deux asters permettant la formation d'un fuseau de microtubules entre ces deux extrémités. Dans les cellules germinales en méiose I des testicules de souris Topaz1$^{-/-}$, le marquage immunologique de la tubuline-α montre un "hémi-fuseau" de microtubules qui semble partir d'un unique point central de la cellule, mis en évidence par un marquage de la γ-tubuline (révélateur du centre organisateur des microtubules).

Ces observations permettent d'émettre des hypothèses d'une mauvaise duplication des centrioles, ou de non-séparation des centrioles ou encore une mauvaise migration des centrioles aux pôles opposés de la cellule dus à l'absence de Topaz1.

Ainsi TOPAZ1 semble indispensable à la mise en place du fuseau de microtubules lors de la métaphase de méiose I de la spermatogenèse murine. Ce défaut, associé avec une persistance anormale de la triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4, pourrait expliquer le défaut d'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale des souris mâles Topaz1$^{-/-}$ vu par histologie (7). De plus, Topaz1 n'est pas indispensable lors de la méiose femelle murine puisque les souris femelles Topaz1$^{-/-}$ sont fertiles. Ceci conforte le dogme selon lequel la formation du fuseau est donc sexe-spécifique comme il a déjà été montré chez la souris et d'autres espèces (Drosophile, xénope) (51).

Par ailleurs, l'immunofluorescence a également permis d'observer un réseau de microtubules normal dans des cellules au stade métaphase de mitose dans les tubes séminifères de souris Topaz1$^{-/-}$. La présence de Topaz1 ne semble donc pas indispensable au bon déroulement de la mitose. En conséquence, il existe donc une différence dans la dynamique du fuseau mitotique par rapport au fuseau méiotique. Cette différence impliquerait Topaz1 seulement pour les cellules germinales en méiose I lors de la spermatogenèse murine. De telles différences ont déjà été montrées, notamment chez la levure. Ainsi, lors de la mitose, les kinétochores restent de part et d'autre des centromères des chromosomes. Par contre au cours de la méiose de levure, avant la séparation des chromosomes homologues, on observe une rotation de 90° des kinétochores contrôlée par une protéine spécifique (monopolin) (52). On sait également que des protéines du kinétochore sont spécifiques de la division méiotique, comme la protéine MEIKIN.

De plus, l'ensemble de ce travail a montré que *Topaz1* est un gène indispensable à la spermatogenèse chez la souris et qu'une régulation fine de lncRNAs semble être essentielle au cours de cette spermatogenèse pour une production adéquate des gamètes mâles. Contrairement aux petits ARN non codants, il n'y a pas de familles protéiques spécifiques identifiées clairement dans le processus de transcription des lncRNAs. Les LncRNAs présentent aussi une

multitude de rôles de régulations moléculaires qui restent à élucider. Certains lncRNAs pourraient être impliqués dans la régulation de la spermatogenèse comme Mrhl (Meiotic Recombination hot spot locus). Le transcrit du lncRNA Mrhl, monoexonique, se localise dans le noyau des spermatogonies (53). Mrhl régulerait la spermatogenèse selon deux mécanismes possibles: en inhibant la voie Wnt en interaction avec p68 (54) ou en étant clivé par la protéine Drosha pour donner un ARN intermédiaire qui pourrait interagir avec la chromatine (55). Cependant, dans notre étude, nous avons démontré que, bien que le *LncRNA-Chr10* est très largement sous exprimé dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$, il n'est pas indispensable à la spermatogénèse murine. Les ARN non codants longs étant retrouvés en grande quantité dans les testicules (au moins chez la souris), on peut émettre l'hypothèse qu'il y aurait une compensation d'effets et que la suppression d'un seul *lncRNA* est sans effet sur la fertilité des animaux. Le LncRNA-Chr10 aurait des homologues de structure en acide nucléique et/ou en conformation spatiale, leurs permettant d'assurer un rôle potentiel dans la spermatogénèse murine.

Prochainement, et afin de préciser la mécanique d'action de TOPAZ1 dans l'établissement de la métaphase, nous souhaitons créer une lignée de souris "TOPAZ1-*FLAG*" (avec introduction, dans une lignée de souris normale, d'une étiquette *FLAG* juste avant le codon STOP, etiquette immuno-détectable). Ne disposant toujours pas d'anticorps spécifique anti-TOPAZ1, cette lignée nous permettra de localiser la protéine de fusion TOPAZ1-F*LAG* sur coupe ou étalement chromosomique de testicule de souris, et, par ailleurs, de rechercher les partenaires et cibles de TOPAZ1.

En effet, le gène *Topaz1* possède un site de liaison aux acides nucléiques en doigt de zinc. Au laboratoire, nous venons de montrer que TOPAZ1 possède aussi une répétition de 7 domaines structuraux tétratricopeptides (TPR) dans la partie C-terminal de la protéine TOPAZ1. Ces domaines sont connus pour permettre des interactions protéine-protéine. Un complexe protéique: le complexe de promotion de l'anaphase (ACP), est composé d'un ensemble de protéines comportant des domaines TPR. L'ACP active l'anaphase lorsque chacun des kinétochores des chromosomes est attaché, par accrochage amphitélique, aux microtubules. Cette activation va provoquer la neutralisation d'Aurora B, responsable de l'attachement des microtubules kinétochoriens, et l'activation de CDC20. CDC20 lié à l'ACP va

former un complexe protéique capable d'activer la séparase et permettre ainsi la séparation des kinétochores frères d'où l'étape d'anaphase.

C'est pour toutes ces raisons, que la génération de souris *TOPAZ1-FLAG* nous permettra de rechercher les partenaires potentiels de TOPAZ1, comme par immunoprécipitation (par des anticorps commerciaux spécifiques du *FLAG*). Ces partenaires pourraient être impliqués, notamment, dans la mise en place des chromosomes sur le plan équatorial des plaques métaphasiques.

Références bibliographiques

1. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972;(Janv;52):198-236.

2. Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. Development. 11 avr 2007;134(10):1823-31.

3. Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. :12.

4. Parra MT. Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. J Cell Sci. 15 mars 2003;116(6):961-74.

5. Prieto I, Pezzi N, Buesa JM, Kremer L, Barthelemy I, Carreiro C, et al. STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. EMBO Rep. juin 2002;3(6):543-50.

6. Biswas U, Hempel K, Llano E, Pendas A, Jessberger R. Distinct Roles of Meiosis-Specific Cohesin Complexes in Mammalian Spermatogenesis. PLoS Genet. oct 2016;12(10):e1006389.

7. Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, et al. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. Nat Cell Biol. janv 2008;10(1):42-52.

8. Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SBC, Michaelis C, Nairz K, et al. A Central Role for Cohesins in Sister Chromatid Cohesion, Formation of Axial Elements, and Recombination during Yeast Meiosis. Cell. juill 1999;98(1):91-103.

9. Baillet A, Mandon-Pépin B, Cabau C, Poumerol E, Pailhoux E, Cotinot C. Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. BMC Genomics. 23 sept 2008;9:436.

10. Baillet A, Mandon-Pépin B, Veitia R, Cotinot C. [Genetics of early ovarian differentiation: recent data]. Biol Aujourdhui. 2011;205(4):201-21.

11. Song J-J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science. 3 sept 2004;305(5689):1434-7.

12. Höck J, Meister G. The Argonaute protein family. Genome Biol. 2008;9(2):210.

13. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. Nature. 30 oct 2008;455(7217):1193-7.

14. Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, Elbaz C, Delouis C, Panthier JJ. Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos. Dev Camb Engl. oct 1996;122(10):3023-33.

15. Luangpraseuth-Prosper A, Lesueur E, Jouneau L, Pailhoux E, Cotinot C, Mandon-Pépin B. TOPAZ1, a germ cell specific factor, is essential for male meiotic progression. Dev Biol. 15 oct 2015;406(2):158-71.

16. Terajima M, Taga Y, Chen Y, Cabral WA, Hou-Fu G, Srisawasdi S, et al. Cyclophilin-B Modulates Collagen Cross-linking by Differentially Affecting Lysine Hydroxylation in the Helical and Telopeptidyl Domains of Tendon Type I Collagen. J Biol Chem. 29 avr 2016;291(18):9501-12.

17. O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol. juin 2014;30:45-54.

18. Wu J, Akhmanova A. Microtubule-Organizing Centers. Annu Rev Cell Dev Biol. 2017;33(1):51-75.

19. Nishiyama S, Kishi T, Kato T, Suzuki M, Bolor H, Nishizawa H, et al. A rare synaptonemal complex protein 3 gene variant in unexplained female infertility. Mol Hum Reprod. avr 2011;17(4):266-71.

20. Dai X, Otake K, You C, Cai Q, Wang Z, Masumoto H, et al. Identification of novel α-N-methylation modification of CENP-B that regulates its binding to the centromeric DNA. J Proteome Res. 6 sept 2013;12(9):4167-75.

21. Scherthan H, Schöfisch K, Dell T, Illner D. Contrasting behavior of heterochromatic and euchromatic chromosome portions and pericentric genome separation in pre-bouquet spermatocytes of hybrid mice. Chromosoma. déc 2014;123(6):609-24.

22. Page J, de la Fuente R, Manterola M, Parra MT, Viera A, Berríos S, et al. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? Chromosoma. juin 2012;121(3):307-26.

23. Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callén E, et al. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. Genes Dev. 1 août 2008;22(15):2048-61.

24. Goetz' P, Chandley AC, Speed RM. MORPHOLOGICAL AND TEMPORAL SEQUENCE OF MEIOTIC PROPHASE DEVELOPMENT AT PUBERTY IN THE MALE MOUSE. :15.

25. Fawcett DW. The Cell. 2nd Revised edition. W B Saunders Co Ltd; 1981. 862 p.

26. Bettencourt-Dias M, Glover DM. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. Nat Rev Mol Cell Biol. juin 2007;8(6):451-63.

27. Nigg EA, Raff JW. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. Cell. 13 nov 2009;139(4):663-78.

28. Chambon J-P, Hached K, Wassmann K. Chromosome Spreads with Centromere Staining in Mouse Oocytes. In: Homer HA, éditeur. Mammalian Oocyte Regulation: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 1 juill 2019]. p. 203-12. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-191-2_14

29. Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, et al. Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. Nat Commun. 8 janv 2016;7:10324.

30. Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, Dennefeld C, Feret B, Vernet N, et al. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. J Cell Sci. 1 oct 2008;121(19):3233-42.

31. Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. Nat Genet. déc 1998;20(4):377.

32. Panigrahi SK, Manterola M, Wolgemuth DJ. Meiotic failure in cyclin A1-deficient mouse spermatocytes triggers apoptosis through intrinsic and extrinsic signaling pathways and 14-3-3 proteins. PLoS ONE [Internet]. 16 mars 2017 [cité 22 juill 2019];12(3). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354389/

33. Wolgemuth DJ, Lele KM, Jobanputra V, Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. Int J Androl. août 2004;27(4):192-9.

34. Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, et al. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. Cell. 28 juin 1996;85(7):1125-34.

35. Eaker S, Cobb J, Pyle A, Handel MA. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. Dev Biol. 1 sept 2002;249(1):85-95.

36. Kim J, Ishiguro K, Nambu A, Akiyoshi B, Yokobayashi S, Kagami A, et al. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. Nature. 22 janv 2015;517(7535):466-71.

37. Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, et al. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. Nat Cell Biol. juin 2004;6(6):555-62.

38. Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GTJ, McKay MJ. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. Dev Cell. juin 2005;8(6):949-61.

39. Ohzeki J, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. De novo formation and epigenetic maintenance of centromere chromatin. Curr Opin Cell Biol. 1 juin 2019;58:15-25.

40. Xiong K, Wu W, Wang X, Ma X, Chen J, Liu H. Mouse oocyte meiosis is disturbed by knockdown of Suv4-20h. Reprod Fertil Dev. 2013;25(3):503-10.

41. Kallio M, Mustalahti T, Yen TJ, Lähdetie J. Immunolocalization of alpha-tubulin, gamma-tubulin, and CENP-E in male rat and male mouse meiotic divisions: pathway of meiosis I spindle formation in mammalian spermatocytes. Dev Biol. 1 mars 1998;195(1):29-37.

42. Luk AC-S, Chan W-Y, Rennert OM, Lee T-L. Long noncoding RNAs in spermatogenesis: insights from recent high-throughput transcriptome studies. Reprod Camb Engl. mai 2014;147(5):R131-141.

43. Han J, Zhang J, Chen L, Shen B, Zhou J, Hu B, et al. Efficient in vivo deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. RNA Biol. 2014;11(7):829-35.

44. Frost RJA, Hamra FK, Richardson JA, Qi X, Bassel-Duby R, Olson EN. MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. Proc Natl Acad Sci. 29 juin 2010;107(26):11847-52.

45. Bolcun-Filas E, Bannister LA, Barash A, Schimenti KJ, Hartford SA, Eppig JJ, et al. A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. Development. 1 août 2011;138(15):3319-30.

46. Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. Nature. nov 2013;503(7476):371-6.

47. Keniry A, Oxley D, Monnier P, Kyba M, Dandolo L, Smits G, et al. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. Nat Cell Biol. juill 2012;14(7):659-65.

48. Ni M-J, Hu Z-H, Liu Q, Liu M-F, Lu M, Zhang J-S, et al. Identification and Characterization of a Novel Non-Coding RNA Involved in Sperm Maturation. Mata J, éditeur. PLoS ONE. 12 oct 2011;6(10):e26053.

49. Sun J, Lin Y, Wu J. Long non-coding RNA expression profiling of mouse testis during postnatal development. PloS One. 2013;8(10):e75750.

50. Lu Y, Oura S, Matsumura T, Oji A, Sakurai N, Fujihara Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice†. Biol Reprod. 1 août 2019;101(2):501-11.

51. Kallio M, Weinstein J, Daum JR, Burke DJ, Gorbsky GJ. Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. J Cell Biol. 15 juin 1998;141(6):1393-406.

52. Nasmyth K. A meiotic mystery: How sister kinetochores avoid being pulled in opposite directions during the first division. BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. juin 2015;37(6):657-65.

53. Nishant KT, Ravishankar H, Rao MRS. Characterization of a mouse recombination hot spot locus encoding a novel non-protein-coding RNA. Mol Cell Biol. juin 2004;24(12):5620-34.

54. Arun G, Akhade VS, Donakonda S, Rao MRS. mrhl RNA, a long noncoding RNA, negatively regulates Wnt signaling through its protein partner Ddx5/p68 in mouse spermatogonial cells. Mol Cell Biol. août 2012;32(15):3140-52.

55. Ganesan G, Rao SMR. A novel noncoding RNA processed by Drosha is restricted to nucleus in mouse. RNA N Y N. juill 2008;14(7):1399-410.

Résumé :

Ce diplôme EPHE décrit le rôle indispensable du gène *Topaz1* dans la spermatogenèse murine. Ce gène, hautement conservé chez les vertébrés, est spécifique des cellules germinales et possède deux domaines conservés: le motif en doigt de zinc et PAZ. Le domaine PAZ est retrouvé dans les protéines PIWI impliquées dans la voie des piRNAs. Afin d'étudier le rôle de *Topaz1*, nous avons généré un modèle murin dépourvu de ce gène. L'absence de la protéine TOPAZ1 ne perturbe ni le développement, ni la fertilité des souris hétérozygotes et des femelles homozygotes. Par contre, les mâles *Topaz1*$^{-/-}$ sont stériles dû à un arrêt de la spermatogenèse lors de la première division méiotique. Ce blocage méiotique n'est ni dû à un défaut de formation du complexe synaptonémal, ni à une dérégulation de l'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels, ou à une régulation de l'expression des rétrotransposons. D'un point de vue histologique, les différences observées entre les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ et *Topaz*$^{+/+}$ apparaissent entre 15 et 20 jours après la naissance. Une absence de cellules germinales haploïdes et une augmentation de l'apoptose sont détectées dans les testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$. C'est au stade métaphase I que ces différences phénotypiques deviennent visibles. En effet, les spermatocytes I des testicules de souris *Topaz1*$^{-/-}$ sont bloqués en pro-métaphase I, et ne rentrent jamais en métaphase I. Ce blocage est corrélé à un défaut de formation du réseau de microtubules et à une perturbation de la triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 des centromères des chromosomes en pro-métaphase. Les testicules de ces souris *Topaz1*$^{-/-}$, comparés à ceux d'animaux normaux, montrent des transcriptomes différents avec notamment une dérégulation de l'expression de nombreux ARNs non codants longs. L'invalidation, par CripsR/Cas9, d'un de ces longs ARNs non codants ne perturbe cependant pas la spermatogénèse des souris *Topaz1*$^{-/-}$.

Cette étude a permis de démontrer que TOPAZ1 est indispensable à la spermatogenèse de souris. Une mutation dans le gène *Topaz1* pourrait être impliquée dans des cas d'infertilités azoospermiques non obstructives chez l'Homme. La poursuite de l'étude de *Topaz1* pourrait permettre de caractériser de nouveaux acteurs de la spermatogenèse, notamment, des ARN non codants longs et/ou des protéines nécessaires à la formation du fuseau de microtubules lors de la première étape de la méiose.