

Université de Sherbrooke

**Exploration d'un modèle d'étude simplifié de la spermiogenèse
par l'utilisation de la levure à fission**

par

Marc-André Brazeau

Département de biochimie

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé (FMSS)
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie**

Sherbrooke, Québec, Canada

Août 2016

Membres du jury d'évaluation

Guylain Boissonneault, Biochimie, FMSS, Université de Sherbrooke

Xavier Roucou, Biochimie, FMSS, Université de Sherbrooke

Antonio Conconi, Microbiologie et infectiologie, FMSS, Université de Sherbrooke

RÉSUMÉ

Les cellules germinales mâles remodelent leur chromatine pour compacter leur noyau afin de protéger leur matériel génétique et assurer un transit optimal vers le gamète femelle. Il a été démontré que tous les spermatides de plusieurs mammifères, incluant l'homme et la souris, présentaient ce mécanisme de remodelage de la chromatine. Celui-ci est caractérisé par une augmentation transitoire de cassures d'ADN dont une quantité importante sont bicaténaires. Ce remodelage chromatinien a été étudié et semble être conservé chez plusieurs espèces, allant de l'algue à l'humain. Dans le contexte de la recherche fondamentale sur le phénomène de la spermiogenèse, il devient parfois très difficile d'investiguer certains aspects importants en vertu de l'impossibilité de réaliser des manipulations génétiques simples. Il est donc impératif de développer un nouveau modèle d'étude plus permissif afin de palier à ces difficultés encourues. Comme le processus de maturation des spores chez la levure à fission présente de grandes similitudes avec la spermiogenèse des mammifères, l'utilisation d'un modèle d'étude basé sur la sporulation de la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* a été proposée comme modèle comparatif de la spermatogenèse murine. À la suite de la synchronisation de la méiose de la souche *S. pombe pat1-114*, des analyses d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et de qTUNEL ont permis de déterminer la présence de cassures bicaténaires transitoires de l'ADN lors de la maturation post-méiotique des ascospores nouvellement formés ($t > 7h$). Des analyses par immunobuvardages dirigés contre le variant d'histones H2AS129p suggère la présence d'un remodelage chromatinien postméiotique dix heures suivant l'induction de la méiose, corroborant le modèle murin. Enfin, des analyses protéomiques couplées à l'analyse par spectrométrie de masse ont permis de proposer l'endonucléase Pnu1 comme candidat potentiellement responsable des cassures bicaténaires transitoires dans l'ADN des ascospores en maturation. En somme, bien que le processus de maturation des spores soit encore bien méconnu, quelques parallèles peuvent être tracés entre la maturation des ascospores de la levure à fission et la spermiogenèse des eucaryotes supérieurs. En identifiant un modèle simple du remodelage chromatinien au niveau de la spermiogenèse animale, on s'assurerait ainsi d'un outil beaucoup plus malléable et versatile pour l'étude fondamentale des événements survenant lors de la spermiogenèse humaine.

Mots clés : Cinétique méiotique, remodelage chromatinien, cassures bicaténaires de l'ADN, levure à fission, spermatogenèse, spermiogenèse

ABSTRACT

The male germ cells undergo a major chromatin remodeling process in order to protect their genetic material and ensure optimal transit to the female gamete. It has been demonstrated that all spermatids from several mammals, including humans and mice, require this structural transition in order to reach their full maturity and fertilizing potential. This mechanism is characterized by a transient surge in DNA breaks, including a significant number of double-stranded breaks. This feature has been studied and seems conserved in many species, ranging from algae to humans. In the context of basic research on the phenomenon of spermiogenesis, it is sometimes very difficult to investigate important aspects due to the impossibility of carrying out simple genetic manipulations. A more flexible model to overcome the incurred difficulties is therefore needed. Since the process of ascospore maturation of the fission yeast presents great similarities with mammal spermiogenesis, the use of a model based on the sporulation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has been proposed as a comparative model to the murine spermatogenesis. Following synchronization of meiosis in the *S. pombe* diploid strain *pat1-114*, pulsed field gel electrophoresis and qTUNEL assay were used to determine the presence of transient double-stranded breaks in DNA during the post-meiotic maturation of newly formed ascospores ($t > 7h$). Analyses by immunoblotting directed against the histone variant H2AS129p suggests the presence of a post-meiotic chromatin remodeling to $t=10h$, that may share similarities with higher eukaryotes. Finally, proteomic analyzes coupled with mass spectrometry allowed us to propose the Pnu1 endonuclease as a potential candidate responsible for the transient DNA double-stranded breaks during ascospore morphogenesis. In summary, although the spore maturation process is still under investigation, some parallels can be drawn between the maturation of ascospores of fission yeasts and higher eukaryotic spermiogenesis. Thus, identifying a simple eukaryotic model for chromatin remodeling in animal spermiogenesis would ensure a flexible genetic tool to decipher the molecular events occurring during human spermiogenesis.

Key words: Meiotic timecourse, chromatin remodeling, DNA double-strand breaks, fission yeast, spermatogenesis, spermiogenesis

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	VIII
1. INTRODUCTION.....	9
1.1. LA SPERMATOGENÈSE	10
1.2. REMODELAGE CHROMATINIEN	11
1.3. LES CASSURES BICATÉNAIRES ET TOPOLOGIE DE L'ADN	13
1.3.1. <i>Topoisomérases de type I</i>	13
1.3.2. <i>Topoisomérases de type II</i>	14
1.4. MARQUEURS IMPORTANTS DU PROCESSUS DE REMODELAGE CHROMATINIEN	15
1.4.1 <i>Phosphorylation du variant d'histone H2AFX</i>	15
1.4.2. <i>Hyperacétylation de l'histone H4</i>	16
1.5. CONSERVATION PHYLLOGÉNÉTIQUE	16
1.5.1. <i>La levure à fission Schizosaccharomyces pombe</i>	17
1.6. PROBLÉMATIQUE	19
1.7. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	20
1.7.1. <i>Objectif principal</i>	20
1.7.2. <i>Hypothèse</i>	21
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	21
2.1. INDUCTION DE LA DIPLOÏDIE CHEZ <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	21
2.1.1. <i>Souche pat1-114 m210</i>	21
2.1.2. <i>Souche azygotique</i>	22
2.2. CINÉTIQUES MÉIOTIQUES.....	22
2.2.1. <i>Souche pat1-114 m210</i>	22
2.2.2. <i>Cinétique azygotique</i>	23
2.3. DÉNOMBREMENT DE NOYAUX EN ÉPIFLUORESCENCE	23
2.4. EXTRACTION D'ADN.....	24

2.5. ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ ET ANALYSE INFORMATIQUE DE LA MIGRATION	24
2.6. DÉTERMINATION D'ACTIVITÉ APOPTOTIQUE <i>IN VIVO</i>	25
2.7. qTUNEL EN PUIXS D'AGAROSE	26
2.7.1. <i>Extraction de l'ADN génomique en puits d'agarose</i>	26
2.7.2. <i>qTUNEL</i>	26
2.8. IMMUNOBUVARDAGE	27
2.8.1. <i>Préparation des échantillons</i>	27
2.8.2. <i>Immunobuvardage</i>	28
2.9. ANALYSES PROTÉOMIQUES FONCTIONNELLES	29
2.9.1. <i>Extraction protéique fonctionnelle</i>	29
2.9.2. <i>Essai d'activité topoisomérase sur extraction protéique fonctionnelle</i>	29
2.9.3. <i>Essai «en gel» (In gel assay)</i>	30
2.9.3.1. <i>Électrophorèse des échantillons</i>	30
2.9.3.2. <i>Essai nucléase</i>	30
2.9.3.3. <i>Analyse par spectrométrie de masse</i>	30
3. RÉSULTATS	31
3.1. SYNCHRONISATION DE LA CINÉTIQUE MÉIOTIQUE	31
3.1.1. <i>Dénombrement des noyaux</i>	31
3.1.1.1. <i>Souche pat1-114 m210</i>	31
3.1.1.2. <i>Cinétique azygotique</i>	32
3.1.2. <i>Détermination de l'activité apoptotique post-méiotique</i>	33
3.1.2.1. <i>Souche pat1-114</i>	34
3.1.2.2. <i>Cinétique azygotique</i>	36
3.2. LA PRÉSENCE DES CASSURES BICATÉNAIRES TRANSITOIRES LORS DE LA SPORULATION DE LA LEVURE À FISSION	36
3.2.1. <i>Électrophorèse en champ pulsé</i>	36
3.2.1.1. <i>Souche pat1-114</i>	36
3.2.1.2. <i>Cinétique azygotique</i>	38
3.2.2. <i>Fragmentation relative par qTUNEL</i>	38
3.3. LES PROTÉINES RESPONSABLES DU REMODELAGE CHROMATINIEN.....	40
3.3.1. <i>Immunobuvardages</i>	40
3.3.2. <i>Test d'activité enzymatique des candidats à la fragmentation de l'ADN</i>	41
3.3.2.1. <i>Criblage par activité topoisomérase</i>	42
3.3.2.2. <i>Criblage par essai « en gel »</i>	43
4. DISCUSSION	45
4.1. CASSURES BICATÉNAIRES TRANSITOIRES DE L'ADN LORS DE LA MATURATION DES ASCOSPORES.....	45

4.1.1. Qualité de la synchronisation méiotique	45
4.1.2. <i>La fragmentation relative de l'ADN lors de la maturation des spores chez S. pombe</i>	46
4.2. REMODELAGE CHROMATINIEN	48
4.2.1. <i>Marqueurs importants du remodelage chromatinien</i>	48
4.2.2. <i>Implication des enzymes responsables des cassures bicaténares</i>	49
5. REMERCIEMENTS	52
6. LISTE DES RÉFÉRENCES	53
7. ANNEXE	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau des conditions d'incubation des anticorps primaires lors des immunobuvardages.....	28
Tableau 2 : Nucléases obtenues par spectrométrie de masse pour chacune des populations d'intérêt suite à l'essai nucléase « en gel ».....	44

Liste des figures

Figure 1 : La spermatogenèse murine.....	10
Figure 2 : Modèle proposé de l'activité topoisomérase IIB durant le remodelage chromatinien de la spermiogenèse murine	12
Figure 3 : Mécanismes d'action des topoisomérases IA et IB	14
Figure 4 : Mécanismes d'action des topoisomérases IIA et IIB.....	15
Figure 5 : Comparaison morphologique de la gamétogenèse chez la levure à fission et la spermatogenèse humaine.....	18
Figure 6 : Synchronisation méiotique à l'aide de la souche <i>pat1-114</i>	19
Figure 7 : Détermination de la fragmentation relative du génome de <i>S. pombe</i> par qTUNEL ..	27
Figure 8 : Dénombrement des noyaux d'une cinétique méiotique synchronisée <i>pat1-114 m210</i>	32
Figure 9 : Induction contrôlée de l'apoptose chez <i>S. pombe pat1-114 m210</i> lors d'une cinétique méiotique	34
Figure 10 : Vérification de l'activité apoptotique chez <i>S. pombe</i> lors d'une cinétique méiotique.....	35
Figure 11 : Électrophorèse en champ pulsé d'un timecourse méiotique	37
Figure 12 : Représentation graphique de la fragmentation relative de l'ADN par analyse de densitométrie	38
Figure 13 : Fragmentation relative de l'ADN d'une cinétique méiotique <i>pat1-114 m210</i> par marquage TUNEL radioactif (qTUNEL).....	39
Figure 14 : Immunobuvardage dirigé contre les variants d'histones importants de la spermiogenèse	41
Figure 15 : Essai de relaxation plasmidique avec différents cofacteurs	42
Figure 16 : Essai de relaxation plasmidique avec ou sans ATP	43
Figure 17 : Essai nucléase « en gel ».....	44

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
(d)ATP	(désoxy)Adénosine triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CoCl ₂	Chlorure de cobalt
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EMM2	Edinburgh Minimal Media
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HCl	Chlorure d'hydrogène
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MnCl ₂	Chlorure de manganèse
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 (complexe)
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFGE	Électrophorèse en champ pulsé
qTUNEL	quantitative Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
RNase A	Ribonucléase A
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
TDP1	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TE	Tris-EDTA
TOP2B	Topoisomérase IIB
TP	Température pièce (ambiante)
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Y-PER	Yeast Protein Extraction Reagent
ZnCl ₂	Chlorure de zinc

1. Introduction

Selon les récentes études publiées dans le domaine de la procréation assistée, près de 16% des couples canadiens en âge de procréation seraient affectés par un trouble de fertilité, soit près du double depuis le début des années 80 (Santé Canada, 2013). En décortiquant plus attentivement cette statistique, on peut imputer de 30% à 50% de la cause aux hommes selon divers facteurs, principalement la qualité des spermatozoïdes ainsi que leur concentration au niveau des éjaculats (Bhasin *et al.*, 1994). Au-delà des problèmes de fertilité, il est de plus en plus question du père comme élément de transmission de mutations vers sa descendance. Une récente étude parue dans la revue Nature en 2012 a révélé que le taux de mutations *de novo* est de $1,2 \times 10^{-8}$ mutations par nucléotide par génération, soit en moyenne 60 mutations par individu d'une nouvelle génération. Toujours selon cette étude, 75% de ces mutations *de novo* seraient imputables au père et l'âge de celui-ci aurait une incidence critique sur l'augmentation du taux de mutation, jusqu'à un ajout de deux mutations par année par individu (Kong *et al.*, 2012). Également, de récents développements dans notre laboratoire font état d'une première preuve d'instabilité génétique reliée au remodelage chromatinien survenant lors de la maturation des spermatides en élongation (Simard *et al.*, 2014). En effet, les cassures bicaténares transitoires dans l'ADN dans les spermatides en élongation semblent occasionner cette instabilité génétique qui mène à l'augmentation des répétitions trinuécléotidiques dans la maladie de Huntington, une maladie connue pour son anticipation paternelle (Kovtun et McMurray, 2001). Cette anticipation paternelle se définit comme étant une caractéristique et/ou maladie transmissible à la génération suivante, par l'entremise exclusive du père. Le lien entre la présence transitoire des cassures bicaténares, leur réparation et cette expansion trinuécléotidique est encore méconnu, mais tout semble pointer en direction d'un potentiel mutagène engendré par la spermiogenèse. Pour en connaître davantage sur le sujet, il est pertinent, voire essentiel, de développer un modèle d'étude qui permettrait de circonscrire les événements survenant lors de la spermiogenèse et ainsi pouvoir comprendre pleinement le rôle et l'incidence des cassures transitoires de l'ADN dans la maturation des spermatides en élongation.

1.1. La spermatogénèse

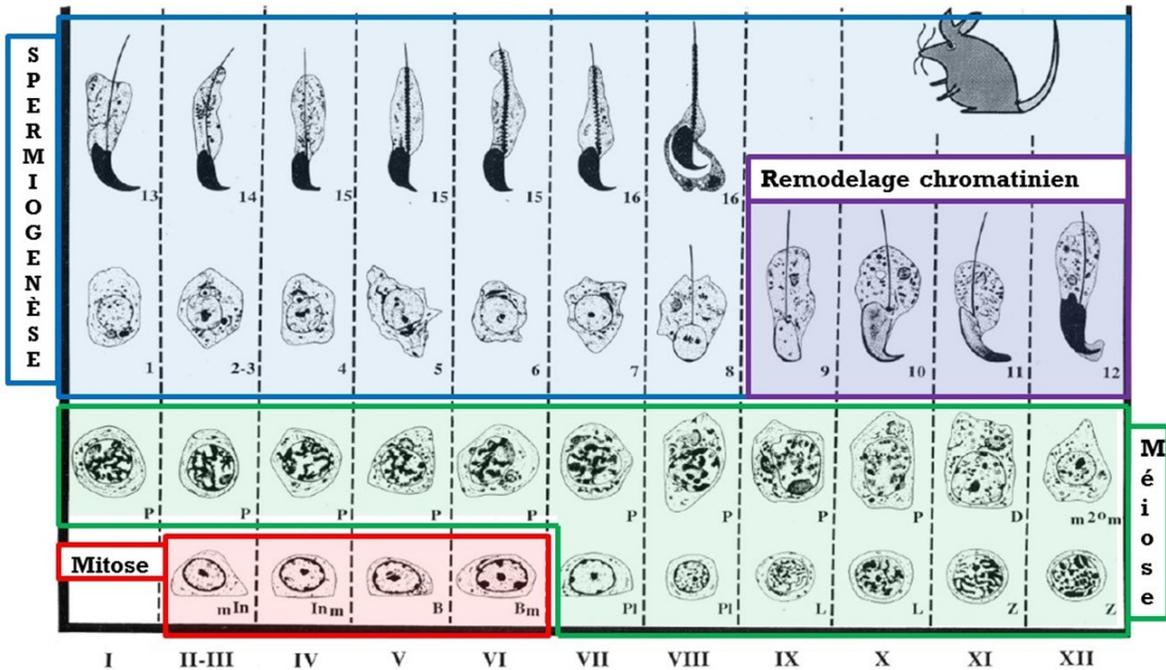


Figure 1 : La spermatogénèse murine. La spermatogénèse se divise en trois grande phase, soit la phase de prolifération ou mitose (rouge), la phase méiotique (vert) et la phase post-méiotique ou spermiogénèse (bleue). Le tableau se lit de gauche à droite, de bas en haut. La spermatogénèse comporte 12 stades distincts (chiffres romains) retrouvés le long du tubules séminifères de manière répétitive (Adaptée de Russell *et al.*, 1990)

La spermatogénèse des mammifères se décline en trois grandes étapes, soit les étapes de prolifération des cellules souches, la méiose et finalement, la spermiogénèse (Fig. 1). En premier lieu, les cellules souches à l'origine des spermatozoïdes, appelées spermatogonies, entrent dans un processus mitotique afin d'engendrer les spermatocytes primaires (Hermo *et al.*, 2010). À leur tour, ces cellules entreprendront un processus de division méiotique en amorçant la prophase I de la méiose. Cette étape est la plus importante au niveau évolutif car c'est à ce moment que la diversité génétique s'installe au niveau des pachytènes (Chowdhury *et al.*, 2009). Par la suite, les plaques équatoriales se forment dans les diplotènes et l'étape de la métaphase I s'enclenche, puis la télophase donne lieu à deux cellules diploïdes, les spermatocytes secondaires (Rolland *et al.*, 2008). Ceux-ci subiront rapidement une seconde division méiotique dans le but d'obtenir quatre cellules haploïdes encore liées entre elles par leur cytoplasme (syncytium), les spermatides rondes (Russell *et al.*, 1990). Ces cellules forment le point de départ du processus de spermiogénèse, processus durant lequel il y aura plusieurs changements morphologiques des spermatides afin de leur conférer une résistance physicochimique accrue et

un hydrodynamisme optimal à la fécondation ultérieure de l'ovule (Gomendio *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2011). En effet, les spermatides rondes vont subir un changement drastique dans leur configuration cellulaire : apparition d'un flagelle, disparition du cytoplasme et compaction génomique permettant la condensation jusqu'à dix fois plus intense de son bagage nucléaire par rapport aux cellules somatiques (Miller *et al.*, 2010). Il va sans dire que ces changements doivent être accompagnés d'une importante modification dans l'organisation de la chromatine afin de permettre la condensation suffisante du génome dans la tête du spermatozoïde. En fait, le point crucial de cette condensation survient dans les spermatides allongeantes où un remodelage quasi-complet de la chromatine survient (Kimmins et Sassone-Corsi, 2005).

1.2. Remodelage chromatinien

Dans la cellule eucaryote, le matériel génétique se retrouve associé à des protéines dans le noyau, sous une forme condensée portant le nom de chromatine. Celle-ci se compose principalement de l'ADN qui est enroulé autour d'un nucléosome. Ce dernier est constitué d'un octamère d'histones, soit un tétramère des histones H3 et H4, ainsi que de deux dimères des histones H2A et H2B (Felsenfeld et Groudine, 2003). Le nucléosome joue un rôle primordial non seulement dans la protection du bagage génétique, mais aussi au niveau des activités cellulaires, régulant des processus aussi importants que la transcription et la réplication (Annunziato, 2005; Workman, 2006). Afin de réguler l'efficacité des divers processus cellulaires, les histones subissent des modifications post-traductionnelles majeures, changeant ainsi leur nature et leur rôle au sein de la chromatine. Par exemple, l'acétylation des histones H4 et la méthylation des histones H3 sont associées de très près à la présence d'euchromatine et d'hétérochromatine, respectivement (Berger, 2002).

Bien que la chromatine soit présente majoritairement sous sa forme nucléosomale dans l'ensemble des cellules d'un organisme, il existe une autre conformation de la chromatine présente dans les noyaux des gamètes mâles des eucaryotes supérieurs, la forme protaminée. En fait, pour permettre la condensation optimale du matériel génétique dans les spermatozoïdes matures, les histones des cellules germinales en élongation sont remplacées par des protéines plus basiques, les protéines de transition (Lewis *et al.*, 2003). Ces protéines seront à leur tour substituées par les protamines, de très petites protéines encore plus basiques, très efficaces pour neutraliser le squelette phosphodiester de l'ADN. Cette modification de charge a pour

conséquence de former une structure linéaire de la chromatine, pour ensuite former une structure toroïdale (Ward, 1994). Le phénomène de protamination n'est cependant pas sans conséquence. Puisque la conformation nucléosomale confère à la chromatine des supertours négatifs en vertu de l'enroulement autour des histones, la cellule en cours de condensation doit impérativement

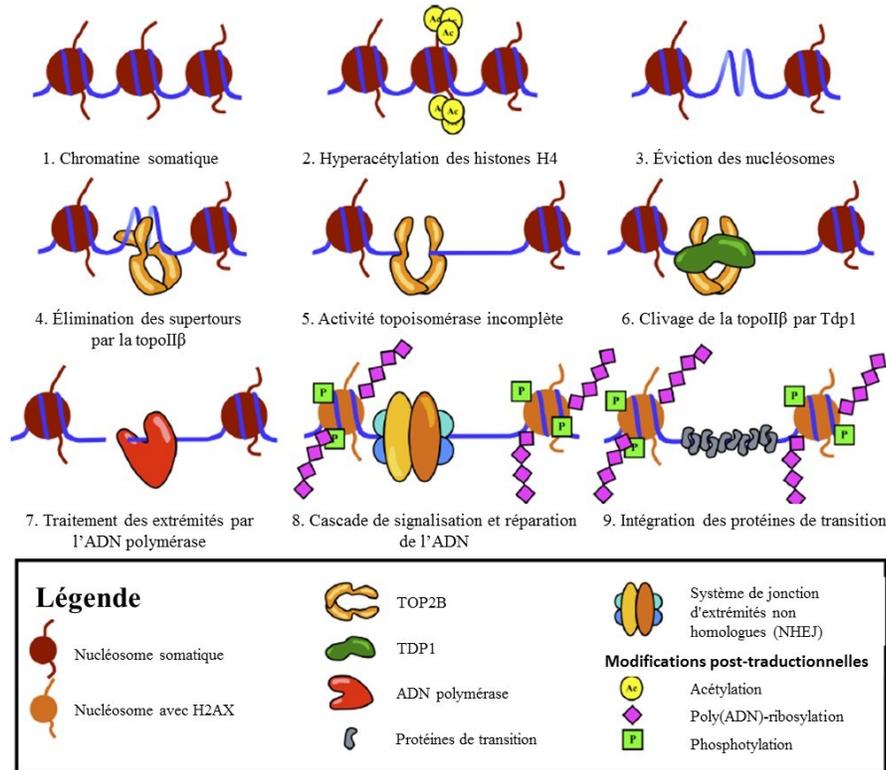


Figure 2 : Modèle proposé de l'activité topoisomérase IIB durant le remodelage chromatinien de la spermiogenèse murine. La topoisomérase IIB serait l'enzyme responsable des cassures bicaténares transitoires dans l'ADN lors de la maturation des spermatides en élongation durant la spermatogenèse murine. L'intervention de la protéine Tdp1 au niveau de l'intermédiaire de 3'-tyrosyl entre l'ADN et la topo IIB laisserait une cassure bicaténaire nécessaire à la relaxation des supertours engendrés par la compaction nucléosomale de la chromatine (Adaptée de Leduc *et al.*, 2008).

les éliminer afin de permettre une compaction linéaire de la chromatine par les protamines (Ward, 1994). Pour se faire, il a été démontré que la totalité des spermatides en élongation traversent un processus de fragmentation transitoire de leur génome sous forme de cassures bicaténares de l'ADN, permettant ainsi la relaxation des supertours cumulés (Fig. 2) (Marcon et Boissonneault, 2004; Laberge et Boissonneault, 2005).

1.3. Les cassures bicaténares et topologie de l'ADN

Les cassures bicaténares de l'ADN sont les dommages les plus cytotoxiques pouvant survenir au niveau du génome d'une cellule (Jackson, 2002). Dans le cas du remodelage chromatinien des spermatides en élongation, la fragmentation n'est que transitoire, alors que les cassures ne semblent plus détectables par essai TUNEL après les étapes 13-14 (Leduc *et al.*, 2008). La ou les enzyme(s) responsable(s) de ce types de cassures n'a (n'ont) pas été identifiée(s) de manière absolue. Par contre, de manière circonstancielle, les topoisomérases ont été proposées comme principales enzymes responsables de ces cassures bicaténares, en vertu de l'identification de la topoisomérase II β au niveau des spermatides en élongation (Leduc *et al.*, 2008; Meyer-Ficca *et al.*, 2011). Les topoisomérases se regroupent sous deux grandes classes soit les topoisomérases de type I et type II.

1.3.1. Topoisomérases de type I

À son tour, la classe des topoisomérases de type I peut être divisée en deux groupes, soit les topoisomérases IA et IB. La première agit sous forme de monomère par un attachement intermédiaire en 5'-tyrosyl-phosphate sur l'ADN superenroulé afin de procéder à la relaxation de l'ADN superenroulé négativement, ne pouvant pas intégrer de supertours positifs à celui-ci (caractéristique réservée à la topoisomérase IB) (Kirkegaard et Wang, 1985). Comme son nom l'indique, le mécanisme catalytique de ces enzymes se déroule par le clivage unique d'un seul brin de l'ADN, permettant ainsi la relaxation par glissement de l'ADN au travers l'ouverture produite (Viard *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2015) (Fig. 3). Cette activité catalytique ne permet le retrait que d'un seul supertour, étant donné que le mécanisme de relaxation implique un glissement de l'ADN plutôt qu'une rotation sur l'axe de l'ADN. Ce processus ne requiert aucune énergie, mais n'est seulement possible qu'en présence du cofacteur Mg²⁺ (Dekker *et al.*, 2002).

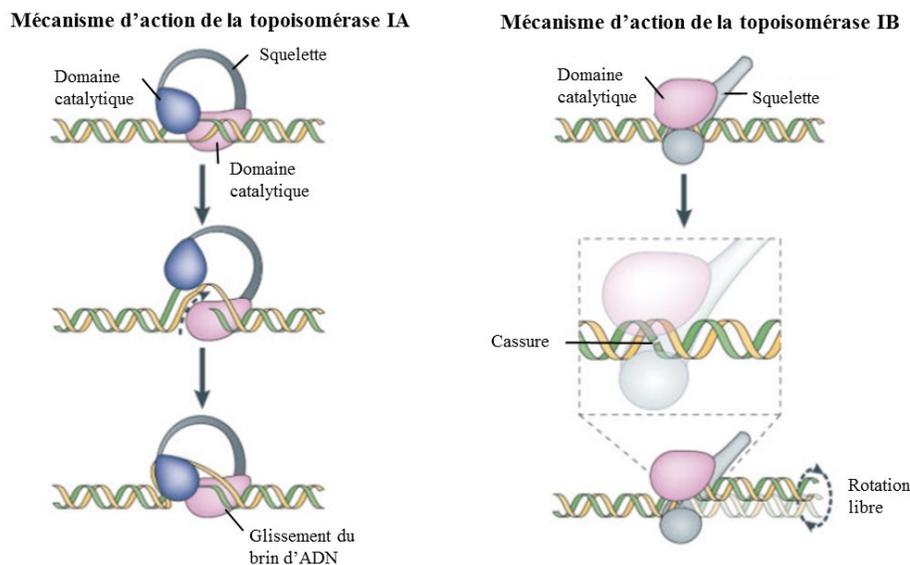


Figure 3 : Mécanismes d'action des topoisomérases IA et IB. Les topoisomérases de type I permettent la relaxation de l'ADN par (IA) glissement de l'ADN au travers du brin d'ADN matrice et (IB) par la rotation du brin matrice, suivant la cassure simple brin transitoire de l'hélice d'ADN (Adaptée de Vos *et al.*, 2015).

On distingue la topoisomérase IA de la topoisomérase IB en fonction de quelques caractéristiques, dont la formation d'un intermédiaire 3'-tyrosyl-phosphate au lieu de 5' (Forterre *et al.*, 2007). Également, le mécanisme de résolution est différent de celui de la topo IA, faisant plutôt intervenir une rotation sur l'axe afin de réduire d'un nombre « n » les supertours présents au niveau du substrat. La topo IB ne requiert pas d'énergie, mais au contraire de la topo IA, l'intervention du cofacteur Mg^{2+} n'est pas nécessaire (Dekker *et al.* 2002). C'est d'ailleurs cette sous-classe de topoisomérases qui est la cible antitumorale lors de chimiothérapie, utilisant par exemple la camptothécine afin de limiter la croissance cellulaire des cellules cancéreuses (Liu *et al.*, 2000).

1.3.2. Topoisomérases de type II

Quant aux topoisomérases de type II, on dénote également deux sous-classes, soit les topoisomérases IIA et IIB. Tout comme pour les topoisomérases de type I, leur classification provient de la résolution de l'enlacement de l'ADN par bonds de deux (Mizuuchi *et al.*, 1980). D'un point de vue global, les mécanismes de relaxation des topoisomérases IIA et IIB impliquent la présence d'un intermédiaire 5'-tyrosyl-phosphate sur les deux brins d'ADN, tout en pouvant relaxer et/ou induire deux supertours à l'ADN par réaction catalytique (Forterre *et al.*, 2007). Contrairement

aux topoisomères I, les topoisomères II agissent sous forme d'homodimère (type IIA) et hétérodimère (type IIB) nécessitant l'utilisation de l'ATP afin de rendre possible l'activité topoisomérase (Fig. 4) (Berger *et al.*, 1996). Finalement, ces enzymes sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires importants comme la recombinaison homologique et la réplication cellulaire, en plus d'être de très bonnes cibles pour la thérapie anticancéreuse (Aratani *et al.*, 1996).

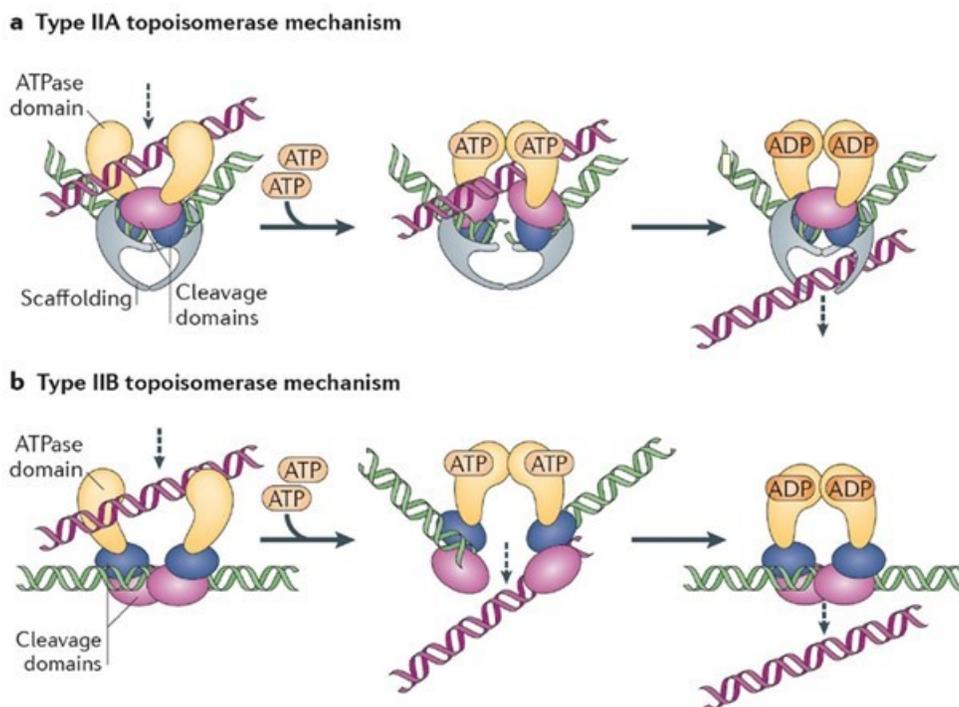


Figure 4 : Mécanismes d'action des topoisomères IIA et IIB. Les topoisomères de type II permettent la relaxation de l'ADN par la formation d'un intermédiaire 5'-tyrosyl-phosphate sur les deux brins d'ADN, permettant ainsi de faire glisser une hélice d'ADN au travers de la cassure transitoires dans l'ADN. Cette relaxation nécessite l'intervention d'énergie sous forme d'ATP (Adaptée de Vos *et al.*, 2015).

1.4. Marqueurs importants du processus de remodelage chromatinien

En plus de la présence des cassures bicaténales transitoires de l'ADN lors de la spermiogenèse, il existe d'autres marqueurs du remodelage chromatinien lors de la spermatogenèse des eucaryotes supérieurs, notamment la phosphorylation du variant d'histones H2AFX et la modification post-traductionnelle des histones canoniques.

1.4.1 Phosphorylation du variant d'histone H2AFX

Au cours de la spermatogenèse, plusieurs variants d'histones sont impliqués, jouant divers rôles tant au niveau signalitique que fonctionnel. Un des principaux variants est celui de

l'histone H2A, soit le variant H2AFX. En fait, lorsque phosphorylé au niveau de sa sérine 139 (γ -H2AFX), ce variant agit à titre de signal désignant la présence d'une cassure bicaténaire au niveau de l'ADN (Fillingham *et al.*, 2006; Lowndes et Toh, 2005). De plus, son rôle est primordial dans le recrutement actif des protéines de réponse à ces cassures (Nakamura *et al.*, 2010; Celeste *et al.*, 2003). Ce variant a d'ailleurs été localisé sur des coupes de tissus testiculaires et son apparition survient tout juste avant le marquage TUNEL traduisant la présence de cassures bicaténaires (Leduc *et al.*, 2008). Sans établir de corrélation directe, le variant d'histone γ -H2AFX semble temporellement lié à l'apparition éventuelle des cassures bicaténaires lors du remodelage chromatinien chez les spermatozoïdes en élongation, signifiant qu'il agit à titre de marqueur de remodelage.

1.4.2. Hyperacétylation de l'histone H4

Enfin, les modifications post-traductionnelles des histones canoniques sont des marqueurs importants du remodelage chromatinien au niveau de la spermiogenèse des eucaryotes supérieurs. Au niveau des modifications post-traductionnelles des histones H2A, H2B et H3, peu de choses sont connues à ce jour pouvant servir de marqueur de remodelage chromatinien au niveau des spermatozoïdes en élongation (Kimmins et Sassone-Corsi, 2005). Cependant, en amont de l'apparition des cassures bicaténaires de l'ADN aux étapes 9 à 13, on retrouve une hyperacétylation des histones H4 présente dans l'ensemble des spermatozoïdes 8 à 11 (Leduc *et al.*, 2011; Hazzouriet *et al.*, 2000). Cette modification a pour but de conférer à l'histone une charge plus négative afin de favoriser son retrait au niveau de la fibre chromatinienne. Chez la drosophile, en cas de défaut au niveau du retrait des histones en vertu d'un problème d'hyperacétylation des histones H4, il a été démontré que l'étape de protamination ne pouvait avoir lieu (Awe et Renkawitz-Pohl, 2010).

1.5. Conservation phylogénétique

Dans une optique évolutive, il est normal de considérer le phénomène de remodelage chromatinien comme étant un avantage au fil du temps. En fait, certains aspects décrits plus haut ont préalablement été observés chez des espèces moins évoluées phylogéniquement. Par exemple, la transition de la conformation nucléosomale vers celle protaminée a été recensée jusqu'à la drosophile (Awe et Renkawitz-Pohl, 2010; Rathke *et al.*, 2007), alors que la présence du variant d'histones γ -H2AFX est aussi présent dans les spermatozoïdes en élongation des

sauterelles (Cabrero *et al.*, 2007). Bien que ces espèces semblent très distantes au point de vue évolutif, il est permis de constater que certaines propriétés de la spermatogenèse des mammifères semblent conservées au niveau des différents paliers phylogénétiques. Considérant la levure (à fission dans le contexte présent) comme étant le plus simple eucaryote, il est pertinent de tracer les parallèles qui existent entre la formation des ascospores et la spermatogenèse des eucaryotes supérieurs telle que la souris.

1.5.1. La levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*

La levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* est un organisme unicellulaire qui comporte trois chromosomes, soit le I (5,7 Mb), le II (4,6 Mb) et le III (3,5 Mb), totalisant près de 13,8 millions de paires de bases par génome (Simth *et al.*, 1987). En tant que modèle expérimental eucaryote seul la levure à bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae* représente un organisme plus manipulable génétiquement que celui de la levure à fission. Ce faisant, l'utilisation de cette dernière au niveau de l'étude des cycles cellulaires mitotique et méiotique est très importante, en plus de présenter une banque de données très détaillée pour près de 1200 gènes (Davis et Smith, 2001; Fantes et Beggs, 2000). Également, le fait que cet organisme est très peu coûteux, possède un temps de génération très court et que de mutants de délétion sont facilement disponibles pour l'ensemble des gènes en fait un outil de prédilection pour les études fondamentales.

Dans son contexte homéostatique, la levure à fission est retrouvée sous sa forme haploïde, soit h⁺ ou h⁻ (P ou M, selon la nomenclature) dépendamment de la nature de leur sexe pouvant s'intervertir en phase S lors de l'enclenchement de la méiose. Cependant, lorsque celle-ci est transposée dans un milieu carencé en nutriments (glucose, azote, etc.), le processus de méiose s'enclenchera, permettra une diploïdie temporaire par la fusion de deux levures complémentaires (h⁺/h⁻) et par fission, en résultera 4 ascospores filles à l'intérieur d'un asque mère (Klar, 2007). Cette gamétogenèse est très similaire à la spermatogenèse, du moins plus que celle chez la levure à bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, une comparaison peut être décelée au niveau de l'asque mère chez la levure à fission et la membrane cytoplasmique reliant les premières cellules haploïdes lors de la spermiogenèse, alors qu'on attribue un cytoplasme mère aux cellules filles dans les deux types eucaryotes (Fig. 5). Aussi, lors de la formation des ascospores, on assiste à une certaine condensation du matériel génétique

de la levure, caractéristique similaire à ce que l'on retrouve lors de la maturation des spermatides en élongation.

Par ailleurs, bien que cela puisse paraître surprenant, la levure à fission possède plus de points en commun avec les métazoaires que la levure à bourgeonnement comme *Saccharomyces cerevisiae*. À titre d'exemples, *Schizosaccharomyces pombe* possède de grands complexes centromériques, utilise une régulation des gènes faisant intervenir la méthylation de H3K9 et des protéines à chromodomaine, possède des gènes comportant de multiples introns, des transposons mobiles et est capable de recombinaison méiotique, pour ne nommer que ces points communs (Pidoux et Allshire, 2005; Ellermeier *et al.*, 2010).

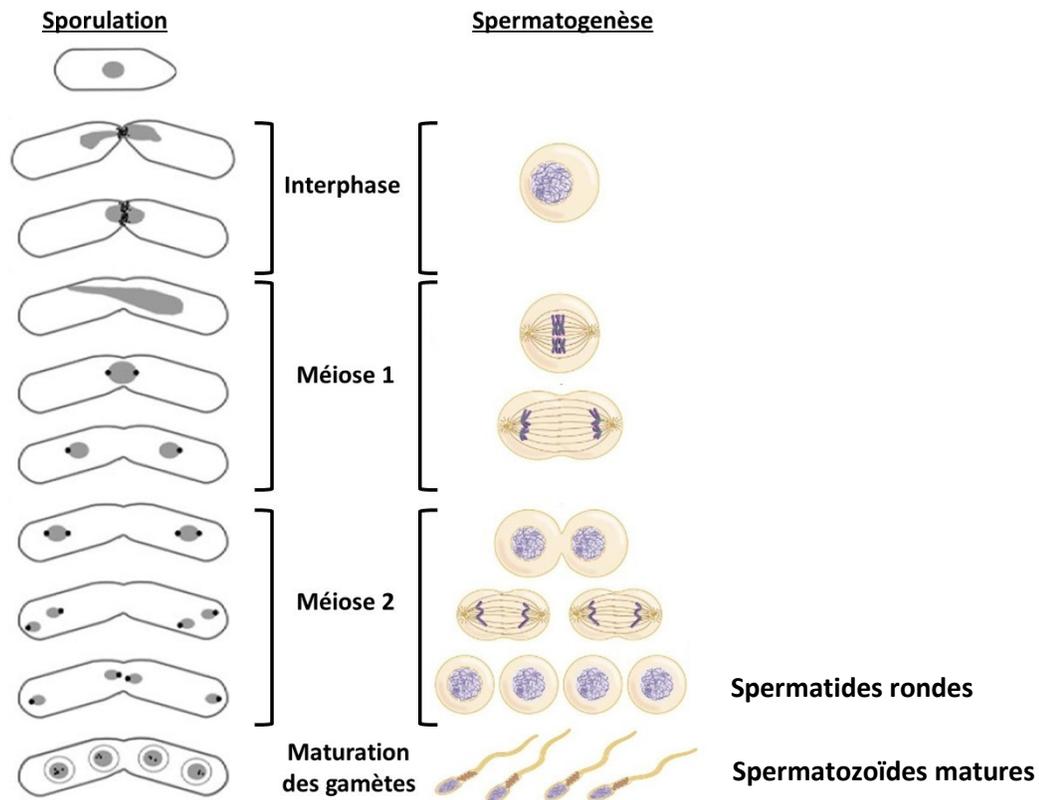


Figure 5 : Comparaison morphologique de la gamétogenèse chez la levure à fission et la spermatogenèse humaine. De manière comparative, les gamétogenèses de la levure à fission et de la souris sont très similaires au point de vue morphologique. Le développement des ascospores au sein d'un asque mère s'apparente à celui des spermatides ronds au sein d'un même complexe partageant le même syncytium (absent sur la figure ci-haute) (Adaptée de Doyle *et al.*, 2009 et http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-20/20_09.jpg).

La méiose de la levure à fission a été très bien étudiée au cours des dernières années, et ce, grâce à la synthèse du mutant thermosensible *pat1-114*. La particularité de cette souche se retrouve au niveau de la synchronisation de sa méiose alors que celle-ci est interrompue en phase G1-S en vertu de sa mutation thermosensible sur la kinase *pat1* sauvage (Fig 6) (Cromie *et al.*, 2007; Lino et Yamamoto, 1985). Ce modèle est à l'origine de beaucoup de découvertes scientifiques, notamment dans le domaine de la transcriptomique méiotique.

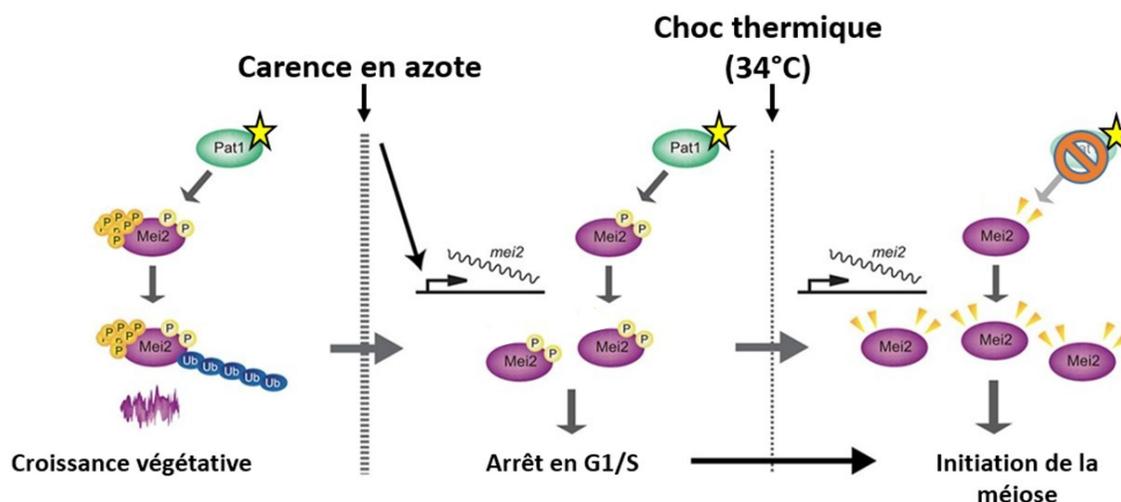


Figure 6 : Synchronisation méiotique à l'aide de la souche *pat1-114*. La kinase *pat1-114* phosphoryle et empêche la protéine Mei2 de démarrer la méiose dans un contexte de croissance végétative à 25°C. Suite à une carence en azote, les cellules sont bloquées en phase G1/S. La méiose est enclenchée par un choc thermique à 34°C, rendant le mutant thermosensible *pat1-114* inactif. (Adaptée de Otsubo *et al.*, 2014).

1.6. Problématique

Comme la capacité de reproduction et la transmission de maladies héréditaires à anticipation paternelle sont deux facteurs corrélés par la réparation adéquate des cassures transitoires de l'ADN durant la spermiogenèse, il est important de comprendre et de bien caractériser le ou les divers système(s) impliqué(s) dans le processus de réparation de ces cassures. À titre de projet primaire, je voulais établir une approche systématique qui avait pour but de déterminer les facteurs de réparation impliqués dans la réparation des cassures bicaténares de l'ADN lors de la spermiogenèse murine, un projet qu'une ancienne étudiante au laboratoire avait débuté au cours de sa maîtrise. Cependant, devant la complexité des procédures expérimentales telles que la co-immunoprécipitation et l'électrophorèse bidimensionnelle du

complexe MRN, j'ai dû développer une approche alternative afin de pouvoir mieux caractériser les conséquences de ces cassures transitoires lors de la gamétogenèse et d'identifier le(s) mécanisme(s) de réparation impliqué(s) lors de la réparation des cassures bicaténaires de l'ADN durant la spermiogenèse murine. L'élaboration d'une approche systématique basée sur l'utilisation de la levure à fission comme organisme modèle a été envisagée. Ainsi, en utilisant le pouvoir de la levure à fission, il serait possible de prédire, par homologie, la nature des systèmes de réparation impliqués dans la spermiogenèse en faisant un parallèle entre la maturation des ascospores avec la spermiogenèse murine. De plus, l'utilisation de la levure à fission permettrait de déterminer les conséquences génétiques de cassures bicaténaires mal réparées chez l'homme et la souris, tout en faisant fi des problèmes éthiques et expérimentaux engendrés par l'utilisation de modèles complexes comme la souris et la drosophile. L'utilisation de la levure pourrait ainsi confirmer le caractère hautement conservé du processus à travers le monde eucaryote.

1.7. Objectifs et hypothèses

1.7.1. Objectif principal

Caractériser le mécanisme de réparation des cassures endogènes de l'ADN issus de la spermiogenèse murine par l'utilisation d'un modèle comparatif de recherche impliquant la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*

- A. Caractériser le remodelage chromatinien impliqué lors de la maturation des ascospores
 - i. Déterminer la présence de cassures bicaténaires transitoire de l'ADN lors de la maturation post-méiotique des ascospores
 - ii. Identifier les marqueurs de remodelage chromatinien présents dans la spermiogenèse des eucaryotes supérieurs
- B. Déterminer, le cas échéant, la nature de(s) enzyme(s) responsable(s) de la fragmentation transitoire de l'ADN lors de la maturation des ascospores
- C. Identifier les facteurs de réparation impliqués dans la réparation des cassures endogènes découlant de la maturation des ascospores

1.7.2. Hypothèse

En utilisant le potentiel génétique de la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* à titre de nouveau modèle de la maturation post-méiotique des gamètes, il sera possible d'identifier le mécanisme de réparation des cassures transitoires de l'ADN lors de la spermiogenèse murine, en vertu de l'homologie existante entre la morphogenèse des ascospores et la spermiogenèse murine.

- On retrouve le même genre de cassures bicaténaires transitoires au début de la maturation post-méiotique des ascospores, de même que les marqueurs de remodelage chromatinien propre à la spermiogenèse murine.
- La fragmentation transitoire de l'ADN dans les ascospores est le résultat de l'activité partielle des topoisomérases tout comme dans le cas des spermatides en élongation chez la souris.
- Étant donné le caractère haploïde des ascospores, la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) serait le mécanisme de réparation impliqué lors de la maturation des ascospores chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* et serait ainsi le mécanisme homologue responsable de la réparation des cassures transitoire de l'ADN chez la souris.

2. Matériel et méthodes

2.1. Induction de la diploïdie chez *Schizosaccharomyces pombe*

2.1.1. Souche *pat1-114 m210*

Une préculture de 4 ml YES (5 g/L Bacto Yeast Extract, 225 mg/L des acides aminés adénine/histidine/leucine/uracile/lysine, 3% dextrose) de la souche haploïde de *S. pombe pat1-114 m210* a été incubée 16 heures à 25°C avec agitation à 250 rpm. Lorsque la DO₆₀₀ se situe entre 0,7 et 1,0, 1 ml a été transféré dans un microtube et 70 µl de carbendazime 300 µg/ml y ont été ajoutés. Après cinq heures d'incubation à TP avec légère agitation, les levures ont été diluées en série (10⁻³, 10⁻⁴ et 10⁻⁵) et 200 µl des dilutions ont été étalées sur plaque YES-phloxine B (YES liquide + 5 mg/L phloxine B). Les plaques ont été incubées pendant 2 à 3 jours à 25°C, sans exposition à la lumière afin d'empêcher la photodégradation de la phloxine B. Lorsque les colonies étaient suffisamment grosses, les colonies roses foncées ont été repiquées en duplicata

sur une plaque YES et une autre YES-Phloxine B. Une colonie rose pâle a aussi été repiquée en duplicata comme contrôle négatif de diploïdie. Les plaques YES et YES-Phloxine B ont été incubées à 25°C pendant 2 jours, à l'abri de la lumière. Les manipulations ultérieures ont été réalisées avec les levures diploïdes sur la plaque YES, la plaque YES-Phloxine B ne servant que de validation de la diploïdie.

2.1.2. Souche azygotique

Trente microlitres d'eau nanopure ont été inoculés avec les souches FY435 (h+) et FY436 (h-) puis déposés (sans étalement) au centre d'une plaque Malt Extract (ME) (3% Bacto Malt Extract, 225 mg/L des acides aminés adénine/histidine/leucine/uracile/lysine, 20 g/L agar). Après l'absorption du liquide sur la plaque, celle-ci a été incubée à 30°C pendant 16 heures. Un frottis de la plaque ME a été appliqué sur une lame de verre et la diploïdie h+/h- a été confirmée au microscope (bâtonnets plus allongés en forme de boomerang). À partir de la plaque ME, un étalement par épuisement a été réalisé sur une plaque SD-HULK (1X YNB w/o amino acid, 26 g/L agar, 3% dextrose, 225 mg/L des acides aminés adénine/histidine/leucine/uracile/lysine) et celle-ci a été incubée pendant 2 jours à 30°C. Afin de conserver les colonies diploïdes, les colonies obtenues sur la plaque SD-HULK ont été étalées sur une plaque YES et incubées pendant 16 heures à 30°C.

2.2. Cinétiques méiotiques

2.2.1. Souche *pat1-114 m210*

Vingt millilitres EMM2 Ade only (32 g/L Edinburgh Minimal Media, 225 mg adénine) a été inoculée avec une bouclée de *S. pombe pat1-114 m210* diploïde maintenu sur plaque YES (YES liquide + 23 g/L agar). Suite à une incubation de 24 heures à 25°C avec agitation à 250 rpm, la DO₆₀₀ a été prise grâce à un spectrophotomètre et une dilution de 40 ml de la culture à une DO₆₀₀ ~ 0,500 a été réalisée. Cette culture a été ensuite incubée pendant 6 à 8 heures à 25°C avec agitation à 250 rpm, de sorte à obtenir une DO₆₀₀ ~ 1,0. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 4 minutes, le culot de levures a été doublement lavé avec 50 ml d'eau nanopure stérile, puis resuspendu dans 100 ml de EMM2 sans azote (27,33 g/L L Edinburgh Minimal Media Nitrogen Free + 10 mg/L adénine) afin d'obtenir une DO₆₀₀ ~ 0,500. Afin de synchroniser les levures en phase G1-S, la culture a été incubée pendant 16 à 18 heures à 25°C avec agitation

à 250 rpm. La méiose a été déclenchée par un choc thermique dans un temps très court (< 30 secondes dans l'eau très chaude) et la culture a été incubée à 34°C pour la durée complète de la cinétique. Les prélèvements sont effectués aux heures, de manière stérile. Le volume récolté est centrifugé à 3000 rpm pendant 4 minutes et le culot est conservé pour les analyses ultérieures. Les levures échantillonnées lors d'une cinétique méiotique ont été fixées à l'éthanol-PBS 75% pendant 30 minutes sur glace.

2.2.2. Cinétique azygotique

4 ml de YES ont été inoculés avec une bouclée de *S. pombe* diploïde et incubés pendant 8 heures à 30°C avec agitation à 220 rpm. La culture a été ensuite diluée de sorte à obtenir une dilution ayant une $DO_{600} \sim 0,020$. La culture diluée a été incubée pendant 16 heures à 30°C avec agitation à 220 rpm. Après s'être assuré que la culture ne comporte aucune apparition de spores par microscopie, la culture a été diluée 10^{-3} dans 25 ml de YES, puis incubée pendant 24 heures à 30°C avec agitation à 220 rpm. En parallèle, 15 μ l de la culture ont été appliqués au centre d'une plaque ME afin de vérifier, après 16 heures d'incubation à 30°C, la sporulation des zygotes au microscope. Une nouvelle dilution de la culture a été réalisée afin d'obtenir une $DO_{600} \sim 0,100$ et incubée pendant 6 à 8 heures à 30°C avec agitation à 220 rpm. Suite à cette incubation, la DO_{600} a été prise, puis trois dilutions différentes ont été réalisées dans 500 ml EMM-HULK (1/100; 1/150 et 1/200) en prenant soin de faire deux lavages de 50 ml à l'eau nanopure avant de resuspendre les cellules dans le EMM-HULK. Les cultures ont été incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation à 220 rpm. Finalement, la culture se rapprochant le plus d'une $DO_{600} \sim 1,0$ a été complètement centrifugée à 3000 rpm pendant 4 minutes, lavée deux fois dans 50 ml d'eau nanopure et resuspendu dans 500 ml de EMM sans azote. La culture a été incubée à 30°C durant toute la durée de la cinétique méiotique. Les prélèvements sont effectués aux heures, de manière stérile. Le volume récolté est centrifugé à 3000 rpm pendant 4 minutes et le culot est conservé pour les analyses ultérieures. Les levures échantillonnées lors d'une cinétique méiotique ont été fixées à l'éthanol-PBS 75% pendant 30 minutes sur glace.

2.3. Dénombrement de noyaux en épifluorescence

À partir de l'échantillonnage de la cinétique, 10 millions de levures fixées ont été aliquotées dans des microtubes. Après une centrifugation à 5000 rpm pendant 4 minutes, les levures ont été lavées deux fois au PBS et resuspendu dans 100 μ l de PBS. 20 μ l de cette

resuspension ont été déposés sur une lame à cuvettes multiples (09LX177402A, MP Biomedicals) prétraitée à la poly-L-lysine (20µl de 0,1% par puit) pendant 5 minutes. Les cellules ont adhéré à la lame pendant 5 minutes avant d'aspirer l'excédent. Après avoir laissé sécher la lame pendant 5 minutes, 20 µl d'une solution de DAPI (1 µg/mL dans PBS) ont été déposés dans chaque cuvette afin de marquer l'ADN des cellules, puis incubés pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. Afin de limiter le photoblanchiment, 2 µl de Slowfade Gold (Invitrogen, S36936) ont été ajoutés à chaque puits après avoir enlevé le DAPI des cuvettes, puis la lame a été scellée avec une lamelle et du vernis à ongles. Les images d'épifluorescences ont été acquises en microscopie à épifluorescence. À partir des images, le dénombrement a été réalisé manuellement avec l'aide du logiciel Olympus FluoView FV1000 afin de traiter les expositions adéquatement.

2.4. Extraction d'ADN

250 millions de cellules ont par la suite été lavées deux fois au PBS avant d'être resuspendues dans 250 µl de Y-PER (78990, Thermo Fisher Scientific) et incubé pendant 30 minutes à TP. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes à TP, les levures ont été resuspendues dans 200 µl de CSE (20mM phosphate pH 5.8, 40mM EDTA, 1.2M sorbitol) contenant 5 µl de zymolyase 20T (Z1001, USBiological) et incubées pendant une heure à 30°C. Les sphéropastes ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 5 minutes à TP et lavés une fois dans 1 ml de PBS. Le culot cellulaire a été ensuite resuspendu dans 200 µl d'une solution de RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS) contenant 50 µg de RNase A. Après une incubation de quatre heures à 37°C, 0,1 mg de protéinase K ont été ajoutés à tous les échantillons et ceux-ci ont été incubés pendant 16 heures à 55°C. Afin d'isoler l'ADN extrait, une extraction au phénol-chloroforme a été réalisée (phénol : chloroforme : alcool isoamylique 25 :24 :1) suivi d'une précipitation à l'éthanol de la phase aqueuse. L'ADN précipité a été resuspendu dans un volume minimal de 25 µl d'eau nanopure, puis dosé en spectrofluorométrie à l'aide du Qubit (Q32854, Thermo Fisher Scientific).

2.5. Électrophorèse en champ pulsé et analyse informatique de la migration

Deux cents nanogrammes d'ADN de chaque temps de prélèvement de la cinétique ont été mis sur un gel d'agarose High Gel Strength 1% (AGA501.100, BioShop), en utilisant le EZ-

vision (N391-0.5ML, AMRESCO) comme tampon de chargement. Le gel a été placé dans l'appareil à électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DR II System, BioRad) et la migration a été effectuée pendant 10 heures selon les réglages suivants : 5 V/cm; 0,1-1,5 secondes de temps de commutation; 15°C. Après la migration, le gel a été exposé au rayon UV d'un transilluminateur et une photo monochrome a été prise. L'image a par la suite été analysée grâce au logiciel ImageQuant 5.0 afin de déterminer les intensités relatives de chaque piste. À l'aide d'un fichier Excel, l'intensité maximale de chaque piste a été déterminée et un graphique de l'intensité maximale en fonction des heures de prélèvement a pu être tracé. L'interpolation de la taille des fragments en fonction de l'intensité des pistes a été effectuée en utilisant le logiciel GelAnalyzer 2010.

2.6. Détermination d'activité apoptotique *in vivo*

Une cinétique a été amorcée tel que discuté au point 2.2., à l'exception de l'étape de la fixation à l'éthanol qui est absente. À chaque temps de prélèvement, 10 millions de cellules ont été aliquotées dans un microtube et centrifugées à 5000 rpm pendant 5 minutes. Dans le cas des contrôles positifs d'apoptose, une incubation de 20 minutes dans 1 ml d'acétate acétique 10% a été réalisée. Les cellules, tant les contrôles que les échantillons-tests, ont été lavées au PBS puis resuspendues dans 150 µl d'une solution de 10 µM CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker (G7461, Promega) dans du PBS. Suite à une incubation de 20 minutes à 30°C, les cellules sont lavées au PBS et resuspendues dans 100 µl de PBS frais. 10 millions de cellules sont ensuite déposées sur lame à cuvettes puis fixées avec 20 µl de formaline 10% pendant 30 minutes à TP et à l'abri de la lumière. Après le retrait de la formaline, les cuvettes sont lavées trois fois au PBS puis 20 µl d'une solution de DAPI (1 µg/ml dans PBS) ont été appliqués dans chaque cuvette pendant 5 minutes. 2 µl de Slowfade Gold ont été ajoutés à chaque puits après avoir enlevé le DAPI des cuvettes, puis la lame a été scellée avec une lamelle et du vernis à ongles. Les événements d'apoptose ont été observés au microscope à épifluorescence dans le canal FITC et DAPI.

2.7. qTUNEL en puits d'agarose

2.7.1. Extraction de l'ADN génomique en puits d'agarose

50 millions de cellules fixées des divers temps d'une cinétique méiotique *pat1-114 m210* ont été lavées une fois au PBS, suivi d'une fois au CSE. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 minutes à TP, le culot cellulaire a été resuspendu dans 100 µl CSE contenant 5 µl de zymolyase 20T et incubé une heure à 37°C. Après une centrifugation à 5000 rpm pendant 5 minutes à TP, le culot a été resuspendu dans 30 µl de TSE (10mM Tris HCl pH 7.5, 45mM EDTA, 0.9M sorbitol) et les microtubes ont été incubés à 55°C pendant 5 minutes. 30 µl d'agarose Low-Melting Point (5517UA, Gibco) 2% dans PBS préchauffé à 55°C ont été ajoutés à chaque microtube et la resuspension a été homogénéisée avant d'être déposée dans des moules à plugs d'agarose selon un volume de 80 µl/plug. Lorsque les plugs sont figés complètement, ceux-ci ont été transférés dans des microtubes de 2 ml contenant 500 µl d'un tampon de lyse primaire (0.25M EDTA, 50mM Tris HCl pH 7.5, 1% SDS). Suite à une incubation de 90 minutes à 55°C, le tampon de lyse primaire a été remplacé par 500 µl d'un tampon de lyse secondaire (0,5M EDTA pH 9.5, 1% N-lauryl sarcosine, 0,5 mg/mL de protéinase K), puis incubée pendant 48 heures (le tampon de lyse secondaire a été renouvelé après 24 heures). Suite à cette incubation, les plugs ont été lavés trois fois au TE 1X pendant 30 minutes, et conservés à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.7.2. qTUNEL

Les plugs contenant 50 millions de cellules ont été coupés en deux et une moitié a été transférée dans un microtube de 1,5 ml pour le marquage qTUNEL. À ce microtube, 70 µl de tampon d'équilibration (tampon TdT 1X, 5 mM CoCl₂) ont été ajoutés et le plug a été incubé pendant une heure à 4°C. Après avoir retiré le surnageant, 70 µl de tampon réactionnel qTUNEL (tampon TdT 1X, 5 mM CoCl₂, 5 µM dATP, 0,05 µM α-³²P-dATP, 400 U TdT) ont été ajoutés et les plugs y ont été incubés pendant 16 heures à 4°C, afin de permettre l'entrée de la TdT au sein du puits d'agarose. Ensuite, le radiomarquage d'une heure à 37°C a été réalisé et un lavage de 30 minutes avec 2 ml TE 1X a été fait. Après le retrait du tampon de lavage, 5 µl de tampon β-agarase 10X ont été ajoutés et le microtube a été placé à 65°C pendant 15 minutes afin de faire fondre le plug. Une équilibration de la température du plug a été nécessaire pendant 5 minutes à 42°C avant d'y incuber 1,5 U de β-agarase pendant 1h30. À chacun des microtubes,

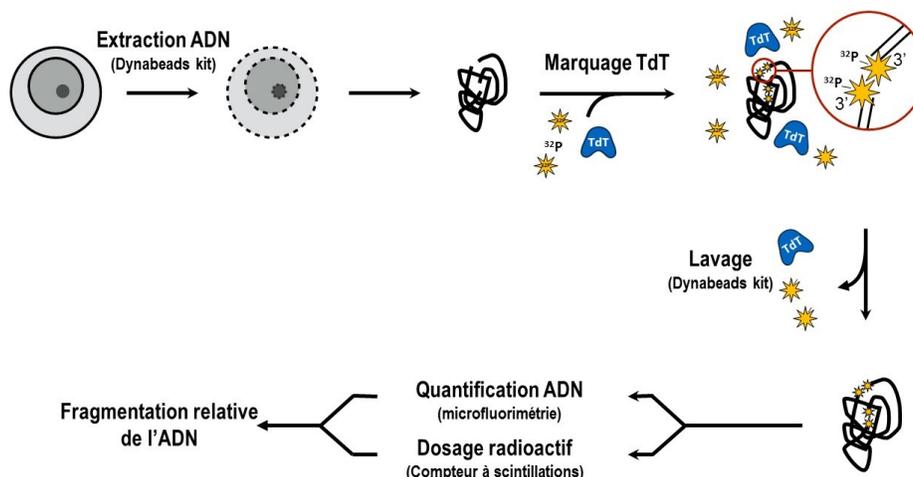


Figure 7 : Détermination de la fragmentation relative du génome de *S. pombe* par qTUNEL.

10 μ l de billes magnétiques de silane (37002D, Thermo Fisher Scientific) et 50 μ l de Lysis Buffer, Blood (MD1392, Promega) ont été ajoutés simultanément, puis 50 μ l d'isopropanol ont été incorporés au microtube. La liaison de l'ADN aux billes de silane a été effectuée pendant 8 minutes à TP, avec une légère rotation. Les billes ont par la suite été immobilisées en utilisant un support magnétique et le surnageant a complètement été enlevé. Un premier lavage a été effectué avec 700 μ l du tampon Lysis Buffer, Blood et un second avec 700 μ l du Alcohol Wash, Blood (MD1412, Promega). Suite au retrait du dernier tampon de lavage, les billes ont été séchées à l'air ambiant pendant 5 minutes, puis l'ADN a été élué suite à une incubation de 5 minutes après l'ajout de 40 μ l de buffer d'élué (37011D, Thermo Fisher Scientific) préalablement chauffé à 65°C. Un dosage de l'ADN par spectrofluorométrie a été réalisé en triplicata, en raison de 10 μ l par dosage. Les microtubes de dosage ont par la suite été déposés à l'intérieur de vials à scintillation comportant déjà 5 ml de liquide à scintillation, avant d'être acheminée à un compteur à scintillation automatisé.

2.8. Immunobuvardage

2.8.1. Préparation des échantillons

100 millions de cellules ont été prélevés à différents temps d'une cinétique méiotique de *pat1-114m210*. Ces cellules ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 4 minutes à TP puis lavées dans 1 ml d'eau distillée. Le culot a par la suite été resuspendu dans 100 μ l d'eau distillée et bouilli pendant 5 minutes. 120 μ l de 2X Laemmli + Urée (4% SDS + 20% glycérol + 0,6 M β -mercaptoethanol + 0,12 M Tris-HCl pH 6.8 + 8 M urée) ont été rajoutés à la resuspension, en

plus de 100 µl de billes de verre 0,5 mm. Les microtubes ont été placés dans le FastPrep-24(R) (MP Biomedicals) pendant trois cycles de 30 secondes à 6,5 M/s d'intensité. Les échantillons ont été rebouillis pendant 10 minutes et centrifugés à nouveau à 13000 rpm pendant 10 minutes afin de sédimenter les débris et les billes. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes.

2.8.2. Immunobuvardage

L'équivalent d'environ 15 millions de cellules de chaque temps ont été déposés sur gel d'acrylamide 15 % (par soucis d'espace sur le gel, les pistes ont été chargées à raison de deux échantillons par puits, pour un total équivalent de 30 millions de cellules par piste). Les protéines ont migré à un voltage ajusté entre 75 et 150V dans le tampon de migration SDS PAGE, puis les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert (glycine 38,63 mM, TRIS 47,88 mM, SDS 1,28 mM, éthanol 10%) à 100 V pendant une heure. La membrane a été immergée dans le tampon de blocage (5% lait dans PBS 1X) durant trente minutes puis incubée avec les divers anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage pendant 16 heures (Tableau 1). La membrane a ensuite été lavée 3 fois au PBS 1X pendant 5 minutes, puis incubée une heure avec les anticorps secondaires dilués dans le tampon de blocage (Goat anti-mouse IgG, DyLight 680, Thermo Fisher Scientific, # 35518 et Alexa Fluor® 790-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson Immuno Research, # 711-655-152). La membrane a finalement été lavée 3 fois au PBS 1X pendant 5 minutes et numérisée en utilisant l'appareil Odyssey Imaging system (LI-COR Biosciences) et son logiciel d'analyse.

Tableau 1 : Tableau des conditions d'incubation des anticorps primaires lors des immunobuvardages

Anticorps	Numéro de catalogue	Hôte	Dilutions (dans le bloqueur)
anti-H2A S129	Ab15083	Lapin	1/5000
anti-H4hAc	mab10430	Souris	1/5000
anti-H3Ac	06-599 (Upstate)	Lapin	1/5000

2.9. Analyses protéomiques fonctionnelles

2.9.1. Extraction protéique fonctionnelle

250 millions de cellules ont été échantillonnées à différents moments d'une cinétique méiotique *pat1-114 m210*. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 4 minutes à TP, le culot a été resuspendu dans 1 ml de PBS 1X et transféré dans un microtube à bouchon vissé. Une autre centrifugation a été réalisée et le culot a été resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 350 mM Na₂SO₄, 10% glycérol, 1X Protease Inhibitor Cocktail (B14001, Biotool). Les tubes ont été incubés sur glace pendant 30 minutes, puis 100 µl de billes de verre 0,5 mm ont été ajoutées avant de procéder à la lyse au Fastprep pendant 2 cycles de 30 secondes à 6,5 M/s, entrecoupés d'une incubation de 5 minutes sur glace. Le lysat cellulaire a été par la suite été centrifugé à 13200 rpm pendant 15 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Les protéines ont été dosées en spectrofluorométrie selon le protocole fourni par la compagnie (Q33211, Thermo Fisher Scientific).

2.9.2. Essai d'activité topoisomérase sur extraction protéique fonctionnelle

Un microgramme d'extrait protéique fonctionnelle de divers temps d'échantillonnage d'une cinétique méiotique *pat1-114 m210* a été incubée avec 500 ng de plasmide pBlueScript II SK + superenroulé afin de déterminer la présence d'activité topoisomérase dans les extraits protéiques. L'extrait protéique a été incubé dans 20 µl d'un tampon réactionnel (50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mg/ml BSA) dans lequel différents cofacteurs (sans cofacteurs, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM ZnCl₂, 10 mM CaCl₂ et 10mM CoCl₂) ont été rajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé 20 minutes à 30°C et 1 µl de protéinase K a été rajouté afin d'arrêter la réaction enzymatique (incubation pendant 30 minutes à 55°C). Les échantillons ont été migrés sur gel d'agarose 0,8%. À titre de contrôle, les enzymes commerciales topoisomérase I (M0301S, New England Biolabs) et topoisomérase II (TG2000H-1, TopoGEN) ont été utilisées dans les mêmes conditions, en ajoutant 1 µl du tampon de lyse (voir section 2.9.1.) afin de compenser l'influence de ce tampon sur l'activité enzymatique des extraits.

2.9.3. Essai «en gel» (*In gel assay*)

2.9.3.1. Électrophorèse des échantillons

Un gel d'acrylamide 10% d'une épaisseur de 1 mm avec 15 µg/ml d'ADN de thymus de veau (D1501-50mg, Sigma-Aldrich) a été préalablement préparé. 25 µg de protéines extraites de *S. pombe* (heures variables) ont été placés sur le gel, en utilisant un tampon de chargement Laemmli 2X à part égale (150 mM Tris-HCl pH 6,8, 1,2% SDS, 30% glycérol, 0,02 M DTT, bleu de bromophénol). À titre de contrôle, 5 U de topoisomérase I, 5 U de topoisomérase II, 10 U de Nt.BsmAI (nickase) et 0,05 U de DNase I ont été placées sur gel pour cet essai. La migration s'est effectuée dans le tampon de migration SDS-PAGE 1X entre 75 et 150 V pendant environ 2 heures, en prenant soin de garder le montage sur glace afin d'éviter la dénaturation thermique des protéines.

2.9.3.2. Essai nucléase

Après la migration, les protéines ont été lentement renaturées afin de retrouver leur capacité enzymatique. Dans le but d'éliminer l'effet dénaturant du SDS sur les protéines, le gel a été placé dans un contenant en verre, puis lavés deux fois au Triton X-100 1% froid pendant 10 minutes, sous une légère agitation à TP. Ensuite, le gel a été rincé puis lavés à l'eau nanopure froide pendant 10 minutes, sous une légère agitation à TP. Ensuite, le gel a été incubé dans 25 ml de tampon NEB4 1X (B7004S, New England Biolabs) + EZ-vision 1X (tampon de chargement), pendant 30 minutes à TP avec légère agitation. Le tampon a ensuite été changé au profit d'un tampon NEB4 1X (sans EZ-vision). L'apparition de « trou » au niveau des pistes, dû à l'activité nucléase, a été monitorée à partir d'observations périodiques (demi-heures) au transilluminateur, puis les « trous » d'intérêt ont été coupés et envoyés en spectrométrie de masse.

2.9.3.3. Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse a été confiée au laboratoire du professeur François-Michel Boisvert. Les bandes d'intérêt apparaissant au transilluminateur y ont été acheminées et l'analyse a été réalisée selon le protocole disponible dans Drissi *et al.*, 2015.

3. Résultats

3.1. Synchronisation de la cinétique méiotique

3.1.1. Dénombrement des noyaux

Afin d'assurer la possibilité de pouvoir utiliser la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* comme modèle fiable de la spermatogenèse des eucaryotes supérieurs, il était impératif de tracer un parallèle au niveau des points caractéristiques entre les deux processus méiotiques. En premier lieu, il est important, voire primordial, de pouvoir monitorer la synchronisation de la méiose chez la levure à fission. Dans cette optique, il était essentiel d'utiliser la souche synchronisable *pat1-114 m210* afin d'identifier les étapes pivots de la sporulation par rapport à la spermatogenèse. La méthode la plus courante est le dénombrement des noyaux en microscopie à épifluorescence, permettant de déterminer les étapes charnières des méioses I et II.

3.1.1.1. Souche *pat1-114 m210*

La souche mutant *pat1-114 m210* permet une synchronisation à près de 80% de toute sa population (Cipak *et al.*, 2014), soit la meilleure connue chez la levure à fission. Par mesure préventive, je voulais déterminer la qualité de la synchronisation en dénombrant les noyaux visibles en microscopie en fluorescence. Le dénombrement se divise en trois groupes, soit les cellules à « 1 noyau », à « 2 noyaux » et à « 4 noyaux » (Fig. 8A). La population représentée par les cellules à « 1 noyau » s'identifie comme étant pré-méiotique I, donc n'ayant pas encore procédé à la première division cellulaire (Fig. 8B). La population des « 2 noyaux » correspond à l'étape se situant entre la méiose I et l'anaphase II (Fig. 8D). Cette étape, d'une durée relativement rapide par rapport au reste de la méiose, est déterminante pour l'estimation de la précision de la cinétique. En fait, plus le temps passé à ces étapes est court, plus la stringence de la cinétique sera grande, se traduisant ainsi par une proportion de cellules synchronisée plus grande. Finalement, la catégorie de cellules à « 4 noyaux » (Fig. 8E) correspond à une méiose terminée alors que la cytokynèse est complétée, résultant ainsi d'un quatuor d'ascospores retrouvé à l'intérieur d'un asque. C'est à partir de ce moment que le phénomène de maturation des spores se produit.

Suite à une cinétique méiotique de la souche *pat1-114 m210*, j'ai dénombré les noyaux de levures provenant d'aliqouts d'une culture mère. Ce dénombrement permet de conclure que la fenêtre de synchronisation de la cinétique est adéquate, bien que les fenêtres habituelles reportées dans la littérature soient un peu plus petites (Pérez-Hidalgo *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2013). J'ai réalisé le même exercice avec une cinétique azygotique c'est à dire, une cinétique méiotique induite par l'entrée en méiose d'une cellule diploïde de type sauvage hétérogène *h+/h-*, dans les mêmes conditions d'analyse en microscopie à épifluorescence dans le but de déterminer si la qualité de la cinétique était dépendante de la méthode de synchronisation.

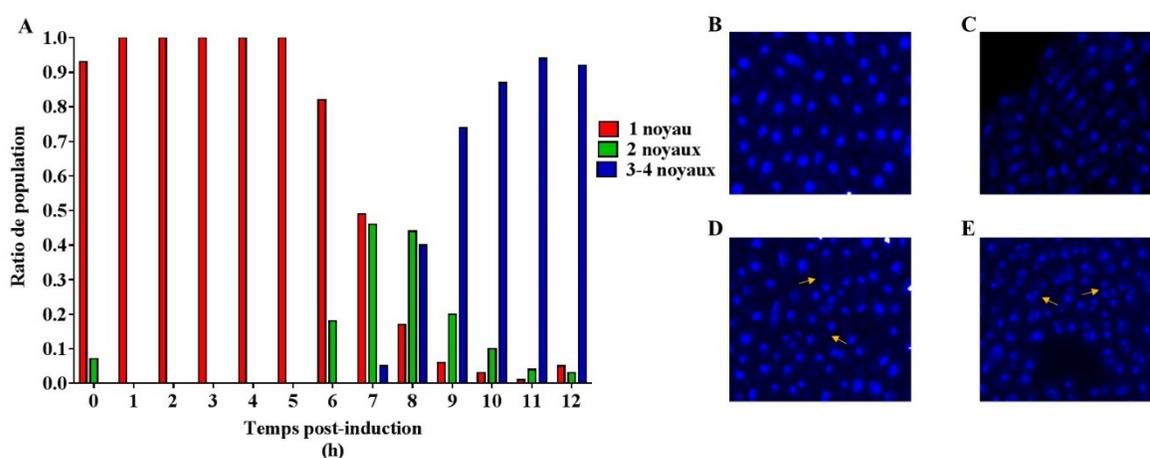


Figure 8 : Dénombrement des noyaux d'une cinétique méiotique synchronisée *pat1-114 m210*. A : Représentation des populations cellulaires aux différents temps de la méiose synchronisée. B : Épifluorescence des cellules « 1 noyau » à t=2h après induction de la méiose synchronisée; C : « horse-tail » à t=4h après induction de la méiose; D : Apparition des cellules « 2 noyaux » à t=7h après induction de la méiose; E : Apparition des cellules « 4 noyaux » à t=10h après induction de la méiose. Coloration au DAPI. Grossissement total : 1000 X.

3.1.1.2. Cinétique azygotique

Le dénombrement des noyaux de la cinétique azygotique a permis de caractériser cette synchronisation comme étant assez imprécise, alors que la fenêtre de la population « 2 noyaux » est beaucoup trop imposante par rapport à celle de la souche *pat1-114 m210* (résultats non représentés). Ce phénomène mènerait ainsi à une distribution plus étendue des événements méiotiques, ce qui diminuerait la précision et l'exactitude des résultats. Également, il est intéressant de voir à quel point l'apparition des « horse-tail » s'étendent sur plusieurs heures. Ce phénomène, qui est plutôt ponctuel dans le cas de la synchronisation des *pat1-114* (Fig. 8C),

laisse paraître que l'induction de la méiose azygotique est beaucoup plus lente que dans le cas d'une méiose synchronisée à l'aide de la souche *pat1-114 m210*.

Bien que la synchronisation azygotique ne soit pas optimale, il appert d'utiliser cette synchronisation à des fins de validation des résultats démontrés chez *pat1-114 m210* afin de mettre de côté l'hypothèse d'un phénotype particulier attribuable à l'utilisation de ce mutant.

3.1.2. Détermination de l'activité apoptotique post-méiotique

Comme l'un des objectifs de ce projet était de vérifier l'apparition de cassures transitoires de l'ADN lors de la maturation des ascospores, il était très important de démontrer que ces cassures n'étaient pas associées à l'apoptose. Pour ce faire, j'ai utilisé la trousse CaspACE FITC-VAD-FMK in situ marker, détectant les caspases actives présentes lors de l'entrée en apoptose (Roux *et al.*, 2006) par épifluorescence, j'ai vérifié la présence de ces facteurs apoptotiques actifs dans les diverses populations échantillonnées. À titre de contrôle, j'ai exposé les cellules à une concentration de 10% en acide acétique pendant vingt minutes afin d'induire une apoptose contrôlée (Fig. 9). On observe un signal assez franc dans toutes les populations cellulaires de la cinétique, confirmant à la fois que la trousse fonctionne bel et bien en contexte méiotique chez la levure à fission, mais également que l'inhibiteur de caspases semblent pouvoir pénétrer dans les cellules de tous types, faisant ainsi abstraction de la composition variable de la paroi cellulaire des populations cellulaires de la cinétique méiotique *pat1-114* ainsi qu'azygotique.

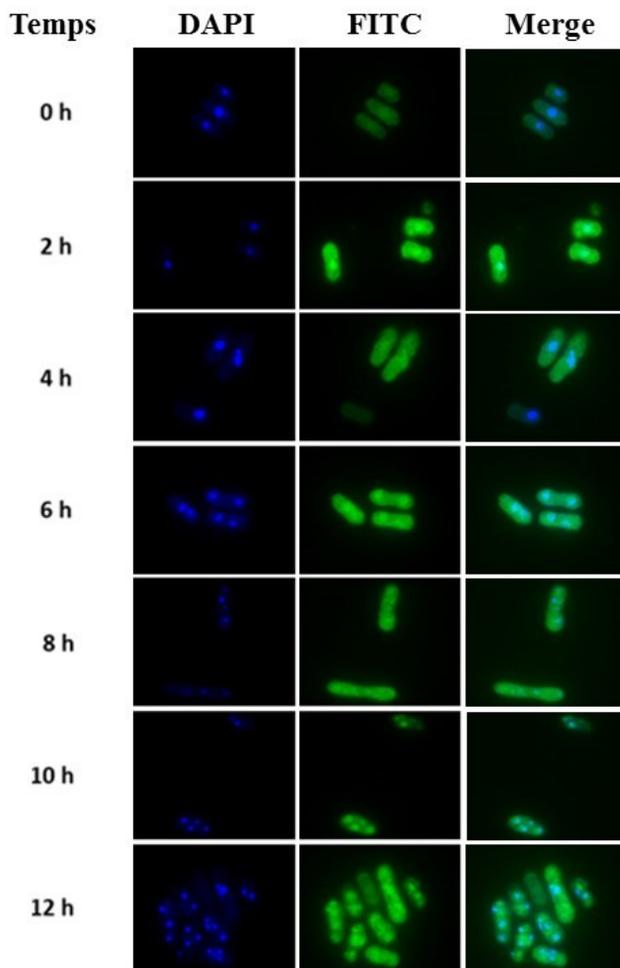


Figure 9 : Induction contrôlée de l'apoptose chez *S. pombe pat1-114 m210* lors d'une cinétique méiotique. Épifluorescence des caspases actives inhibées par CaspACE FITC-VAD-FMK in situ marker après induction de l'apoptose à l'acide acétique 10% pendant 20 minutes à 34°C. Grossissement total : 1000 X.

3.1.2.1. Souche *pat1-114*

Lors d'une cinétique méiotique synchronisée avec la souche *pat1-114 m210*, j'ai effectué un échantillonnage à toutes les heures, pendant 24 heures afin de déterminer la présence active des caspases (Fig. 10A). À priori, on distingue que les facteurs apoptotiques semblent actifs qu'à partir de 11 heures après l'induction méiotique, alors que le signal FITC n'est qu'à peine perceptible dans les heures précédentes. Cependant, il est à noter que ce phénotype ne se répercute pas dans l'entièreté de la population à $t \geq 11$ h, comme il en était le cas dans le contexte du contrôle positif à pareil temps (résultats non démontrés). De plus, si la souche *pat1-114 m210* avait entraîné un déséquilibre homéostatique lors de sa synchronisation (par exemple, le choc thermique), le signal apoptotique se serait fait sentir beaucoup plus tôt que $t=11$ h. Dans le but

de s'assurer que le processus méiotique sauvage ne diffère pas de celui de la souche *pat1-114 m210*, j'ai réalisé la même expérience dans un contexte de cynétique azygotique.

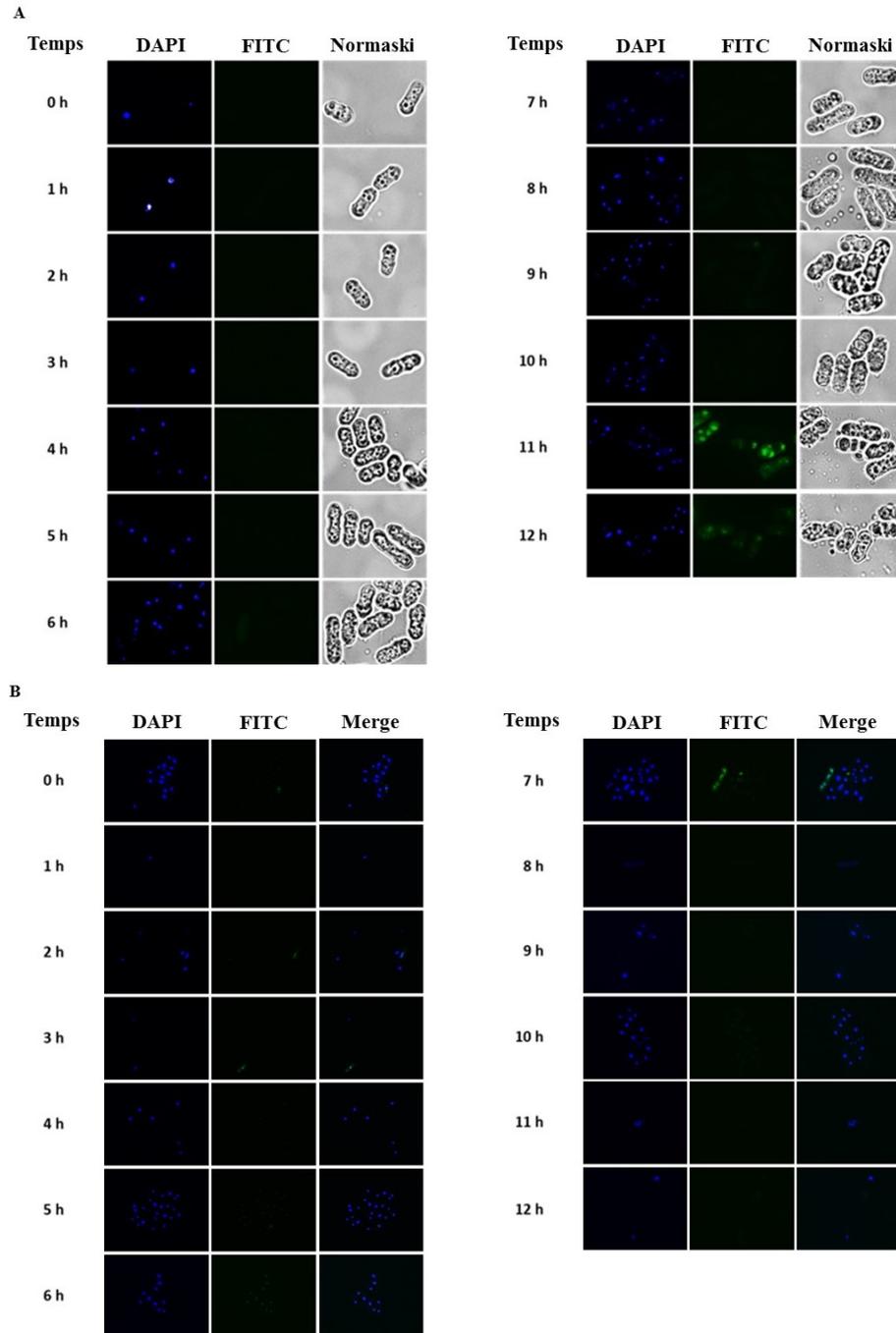


Figure 10 : Vérification de l'activité apoptotique chez *S. pombe* lors d'une cinétique méiotique. Épi-fluorescence des caspases actives inhibées par CaspACE FITC-VAD-FMK in situ marker lors de prélèvements ciblés d'une cinétique méiotique (A) synchronisé *pat1-114 m210*, (B) azygotique. Grossissement total : (A) 1000 X et (B) 400X.

3.1.2.2. Cinétique azygotique

Tout comme pour la souche *pat1-114 m210*, il ne semble pas y avoir présence d'une activité accrue des facteurs apoptotiques lors de la méiose de type sauvage. On distingue à peine un léger signal à $t=7h$, possiblement le fruit d'un marquage non-spécifique ou bien d'un lavage déficient de l'inhibiteur (Fig. 10B).

Somme toute, il appert que les résultats corroborant la présence de cassures à l'ADN à partir des cinétiques méiotiques, qu'ils soient synchronisés avec la souche *pat1-114 m210* ou azygotiques, ne pourront pas être confondus avec l'apoptose.

3.2. La présence des cassures bicaténaire transitoires lors de la sporulation de la levure à fission

3.2.1. Électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique permettant de faire migrer de gros fragments d'ADN avec une excellente résolution. Pour cette raison, j'ai utilisé cette technique afin de déterminer de manière directe la fragmentation relative de l'ADN à divers temps lors d'une cinétique méiotique.

3.2.1.1. Souche *pat1-114*

L'ADN qui a été extrait dans des conditions relativement douces a été mis sur un gel d'agarose et séparé pendant douze heures afin de permettre une résolution optimale des fragments de diverses tailles. À la suite de cette migration, une photo de l'exposition de ce gel a été prise et à partir de cette image, une analyse densitométrique de chaque puits a permis de déterminer le maximum d'intensité de chacun des puits (Fig. 11A). Étant donné que chacun des pixels correspond à une taille précise d'un fragment d'ADN, j'ai pu tracer un graphique de la taille dominante des fragments d'ADN en fonction du temps suivant l'induction de la cinétique méiotique (Fig. 12A), ainsi que celui du ratio de fragmentation relative de l'ADN normalisé par rapport à $t=0h$ (Fig. 12B). Ce faisant, on peut distinguer une tendance à la fragmentation du génome au fil du processus post-méiotique, soit vers $t \geq 7h$. C'est à partir de ce point que l'on retrouve le début de la maturation des ascospores. Ainsi, en observant un phénomène de

fragmentation relative au même titre que dans la spermiogenèse murine, il est permis d'avancer qu'on assiste à une conservation du remodelage chromatinien par l'entremise des cassures transitoire à l'ADN. Également, on distingue quelques tendances, comme un pic vers $t=3h$. Ce temps correspond vraisemblablement à la fin de la phase de réplication (phase S) où l'ADN se retrouve sous forme chromosomique quasi-non fragmentée. Cette étape devrait en quelque sorte comporter le plus faible taux de fragmentation dû à l'importante condensation sous une forme solénoïdale (Hyppa et Smith, 2009). Par ailleurs, l'augmentation de la fragmentation relative entre les heures 3 et 7 serait attribuable aux enjambements retrouvés lors de la métaphase. Il est connu que ces événements surviennent lors de la formation des « horse-tail » que l'on peut apercevoir durant la première phase méiotique chez la levure à fission (de Lange, 1998). Pour ce qui est des heures $t > 14h$, il semble que ces cassures transitoires, au même titre que celles impliquées lors de la spermiogenèse murine, semble se résorber alors qu'elles seraient possiblement réparées.

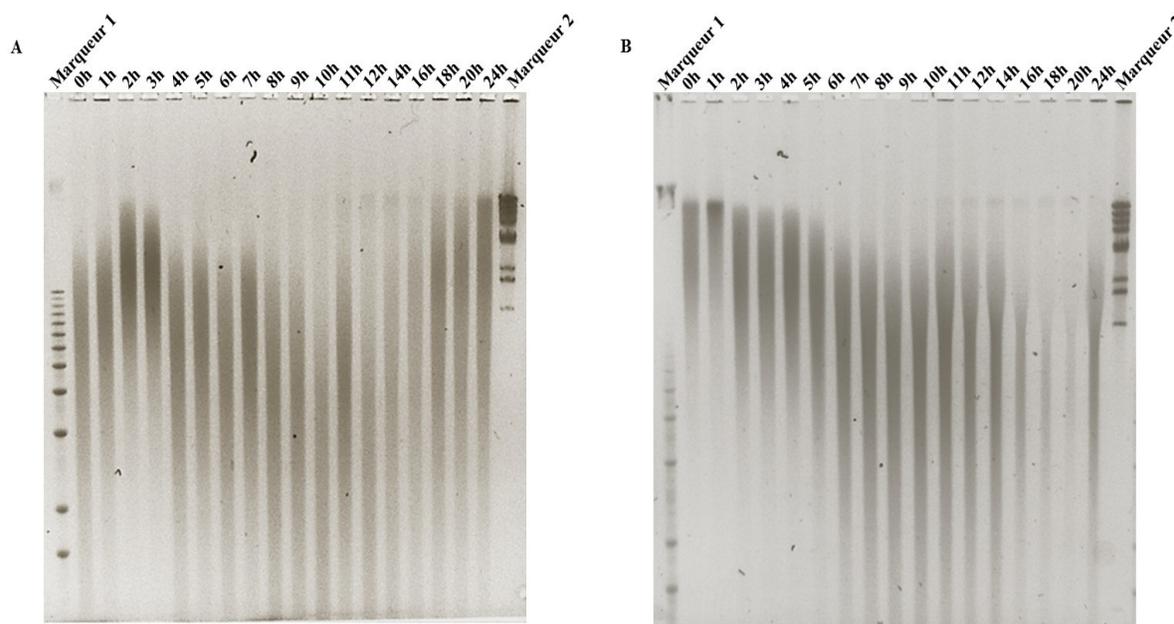


Figure 11 : Électrophorèse en champ pulsé d'un timecourse méiotique. Migration de l'ADN extrait de divers prélèvements d'une cinétique méiotique (A) synchronisé *pat1-114 m210* et (B) azygotique. La densitométrie a été réalisée sur le gel A grâce au logiciel ImageQuant 5.0. L'intensité relative des pistes détermine la fréquence à laquelle un fragment d'ADN de taille donnée se retrouve dans chaque population cellulaire. Marqueurs : (1) 1 kb Plus DNA ladder (10787-026, Invitrogen) et (2) Lambda DNA-MonoCut Mix (N3019S, New England Biolabs).

3.2.1.2. Cinétique azygotique

Afin de confirmer que la mutation de la protéine *pat1* de la souche *pat1-114* ne crée pas de faux-positifs dans le cas de la fragmentation relative de l'ADN dans une cinétique méiotique, j'ai réalisé le même genre d'analyse que discutée au point 3.2.1.1 en cinétique azygotique et j'ai comparé les patrons de migration à la suite de l'électrophorèse en champ pulsé (Fig. 11B). Sans même devoir réaliser une analyse par densitométrie, on s'aperçoit que la tendance semble similaire, quoique le phénomène semble est plus diffus dans le temps que pour ce qui est de la méiose synchronisée *pat1-114 m210*.

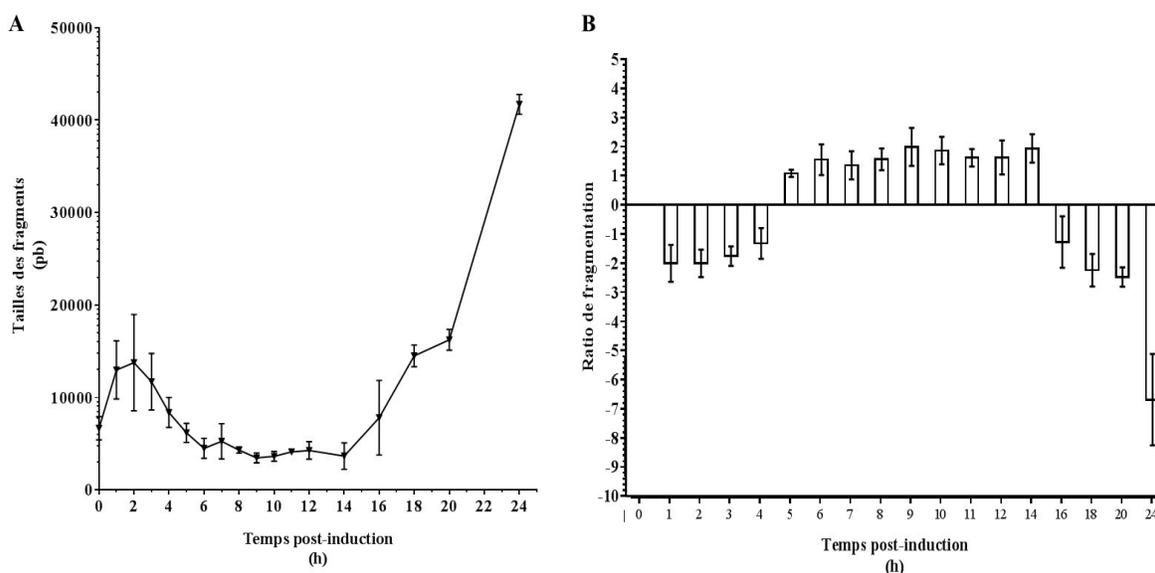


Figure 12 : Représentation graphique de la fragmentation relative de l'ADN par analyse de densitométrie. A. Un graphique de la fréquence modale de la taille de fragments d'ADN en fonction de la densitométrie des PFGE (n=3) a été tracé, (B) puis transposé en ratio de fragmentation par rapport à t=0h, comme valeur de référence. Une valeur positive se traduit par une fragmentation relative plus élevée que la valeur de référence, alors que l'opposé signifie la présence de fragments plus intacts.

3.2.2. Fragmentation relative par qTUNEL

Dans l'optique de pouvoir corroborer les résultats de PFGE, j'ai utilisé une méthode alternative afin de déterminer la présence de cassures transitoires dans l'ADN, et ce, en utilisant une approche par marquage radioactif d'extrémités 3'-OH. Cette technique, très similaire à l'approche TUNEL en raison de l'utilisation clé de la TdT, permet de radiomarquer les extrémités 3'-OH pouvant être laissées libres à la suite d'un clivage enzymatique au cours de la cinétique méiotique (Arzumanov *et al.*, 2000; Motea et Berdis, 2010). L'utilisation de la

radioactivité pour ce genre d'expérience permet d'augmenter considérablement la sensibilité et la validité des résultats obtenus, tout en permettant une quantification relative du nombre de cassures. En effet, la quantification relative des cassures peut s'effectuer en fonction de la quantité d'ADN utilisée pour l'essai, empêchant ainsi le biais lié à une quantité d'ADN inconstant entre tous les échantillons à doser au compteur à scintillations.

Le qTUNEL a été réalisé sur l'ADN extrait d'une cinétique *pat1-114 m210* synchronisée. Les résultats démontrent une augmentation de la fragmentation relative du génome de *S. pombe* entre les heures $t=8h$ et $t=12h$ avec un point culminant à $t=9h$, concordant ainsi avec la phase de maturation des ascospores suivant la fin de la méiose, environ vers $t=7h$ (Fig. 13). On perçoit également quelques autres points intéressants, par exemple à $t=7h$ où la grande fragmentation relative semble être le résultat des enjambements méiotiques présent lors des métaphases de la méiose. Aussi, la fragmentation relativement élevée de l'ADN à temps $t=0h$ et $t=2h$ est vraisemblablement le résultat du stress engendré par la réduction de l'azote lors de la synchronisation et des brins d'ADN marquables au niveau des fourches de réplication de

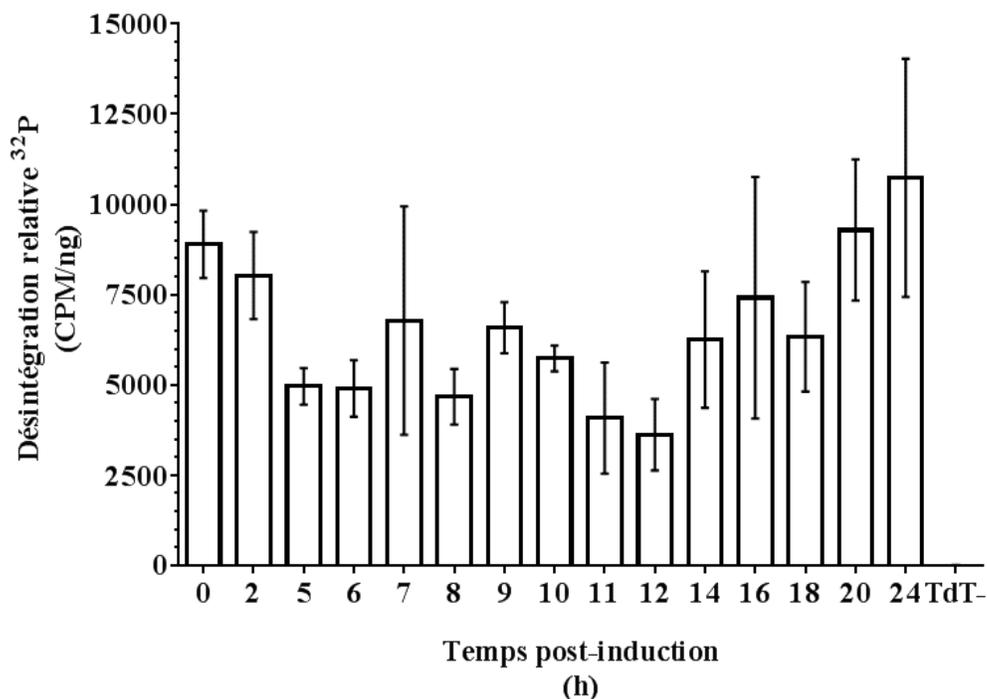


Figure 13 : Fragmentation relative de l'ADN d'une cinétique méiotique *pat1-114 m210* par marquage TUNEL radioactif (qTUNEL). Les fragments d'ADN ont été radiomarqué au ³²P et doser au compteur à scintillation et normalisation par rapport à leur quantité. Un haut ratio de désintégration/ng d'ADN démontre une présence accrue de fragments d'ADN, donc plus de cassures au niveau du génome.

la phase S, respectivement. On remarque une incohérence avec les résultats du PFGE à $t > 12h$, alors que les résultats de qTUNEL tendent à démontrer une augmentation de la fragmentation relative à ces heures, en contradiction du PFGE qui démontrent plutôt une diminution de cette fragmentation. Cette divergence sera expliquée dans la section discussion qui suit.

3.3. Les protéines responsables du remodelage chromatinien

Dans le but de déterminer la nature de la ou les protéine(s) responsable(s) du remodelage chromatinien chez la levure à fission, j'ai réalisé une série d'expérience pouvant déterminer la présence et/ou l'activité de certains de ces facteurs importants de la spermatogenèse, en considérant l'homologie retrouvée dans la phylogénie eucaryote.

3.3.1. Immunobuvardages

En premier lieu, j'ai réalisé des immunobuvardages dirigés contre les variants d'histones connus comme ayant un rôle clé dans la spermatogenèse murine. À ce niveau, les variants d'histones présentés dans le tableau _ ont été testé sur une cinétique *pat1-114 m210* (Fig. 14) ainsi que sur une cinétique azygotique (résultats non présentés), tous deux dans des conditions d'extraction protéique identique. La difficulté avec l'utilisation de l'immunobuvardage dans le contexte d'une cinétique méiotique est liée au changement morphologique et d'identité des cellules. En effet, au fur et à mesure que les cellules progressent dans ce processus, les composantes cellulaires varient à un point tel qu'aucun contrôle de chargement protéique objectif ne peut être utilisé pour fins de comparaison. Cependant, la déposition d'une quantité égale de cellules permet de contourner cette limitation

En ce qui a trait au variant d'histones de prédilection dans la spermatogenèse murine, c'est-à-dire γ H2AFX et son homologue H2AS129p chez la levure à fission, on dénote des signaux prépondérant vers 4h à 7h post-induction de la méiose, ainsi qu'à 10h à 14h. Pour ce qui est de la première augmentation notée, il appert qu'elle serait probablement associée aux cassures transitoires retrouvées au site d'enjambements des chromosomes lors de la méiose (Bailis *et al.*, 2000; Mets et Meyer, 2009). Dans le second cas, le marquage histonique de l'ADN avec ce variant d'histone pourrait concorder avec le remodelage chromatinien post-méiotique, tout comme dans le cas du remodelage chromatinien que l'on retrouve dans le processus normal

de la spermiogenèse chez les eucaryotes supérieurs (Fernandez-Capitello *et al.*, 2003; Broering *et al.*, 2015).

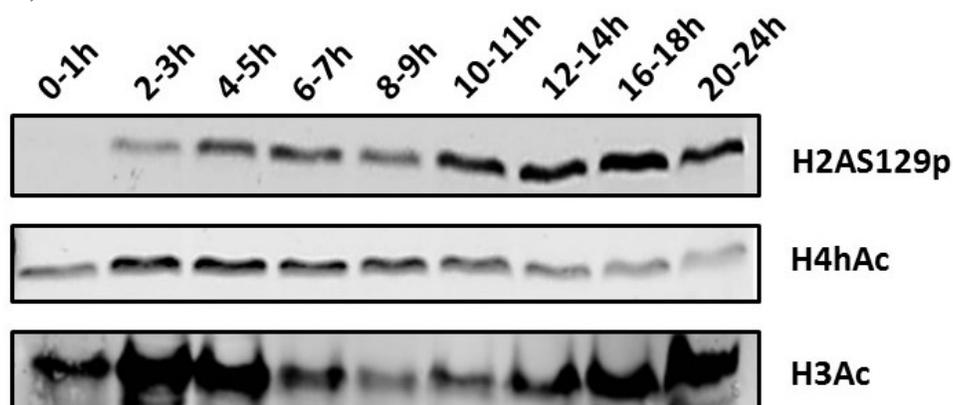


Figure 14 : Immunobuvardage dirigé contre les variants d'histones importants de la spermiogenèse. Les extraits protéiques provenant de divers prélèvements d'une cinétique méiotique *pat1-114 m210* ont été criblés afin de tracer une signature similaire à celle de la spermiogenèse murine. Seuls les variants d'histones comportant un haut taux d'homologie levure-souris au niveau de leur épitope cible ont été testés dans cet essai. Normalisation de chargement par nombre de cellules étant donné le caractère fluctuant de l'expression protéique lors d'une cinétique méiotique.

Au niveau de l'hyperacétylation de l'histone H4 (H4hAc), processus essentiel durant la maturation des spermatides rondes en spermatides allongées chez la souris, on la retrouve plus précisément vers la phase S ($t=2-3h$) chez la levure à fission, correspondant vraisemblablement à la modification nécessaire pour l'ouverture de la chromatine au niveau des fourches de réplication (Jasencakova *et al.*, 2000; Vogelauer *et al.*, 2002; Ruan *et al.*, 2015). Pour ce qui est de son implication dans le processus post-méiotique comparativement à la spermiogenèse, on ne semble avoir une augmentation notable dans la portion post-méiotique, si ce n'est que le signal semble plutôt constant.

Enfin, l'augmentation du niveau d'actétylation de l'histone H3 semble indiquer une augmentation de la réparation des cassures bicaténares dans l'ADN. En effet, l'actétylation ponctuelle de la lysine K56 de l'histone H3 est connu pour son rôle dans la signalisation suite à une réparation des cassures bicaténares dans l'ADN (Chen *et al.*, 2008).

3.3.2. Test d'activité enzymatique des candidats à la fragmentation de l'ADN

Afin de tracer un parallèle entre l'implication des topoisomérases dans la fragmentation transitoire de l'ADN lors de la maturation des ascospores et des spermatides murines, j'ai voulu

déterminer l'identité des topoisomérases et/ou nucléases impliquées dans le processus de maturation chez la levure à fission. Pour ce faire, j'ai réalisé des tests en utilisant des extraits protéiques fonctionnels qui ont été mis au point au laboratoire afin de préserver l'activité enzymatique des protéines et ainsi pouvoir réaliser des tests *in vitro* avec les protéines extraites à divers temps d'une cinétique méiotique synchronisée.

3.3.2.1. Criblage par activité topoisomérase

Après avoir extrait les protéines de divers prélèvements d'une cinétique méiotique, j'ai procédé à la relaxation plasmidique de pBlueScript II SK+ afin de déterminer s'il y a avait présence ou non d'activité topoisomérase, en utilisant divers cofacteurs afin de vérifier l'efficacité dans plusieurs contextes enzymatiques (Fig. 15). Une activité topoisomérase semble intervenir lorsque le cofacteur CaCl_2 a été ajouté dans l'essai *in vitro*, alors qu'on aperçoit la création de topoisomères. Les résultats avec les autres cofacteurs sont plutôt mitigés, alors que dans certains cas, une activité nucléase semble plutôt beaucoup plus impliquée puisqu'on ne discerne pas avec évidence les intermédiaires de réaction (topoisomères) (MnCl_2 par exemple).

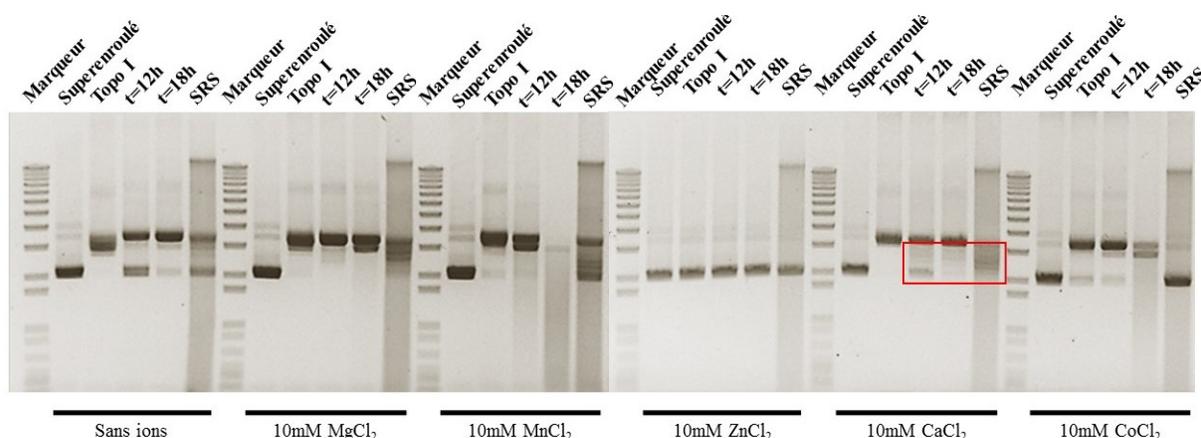


Figure 15 : Essai de relaxation plasmidique avec différents cofacteurs. Les extraits protéiques fonctionnels provenant de divers prélèvements d'un timecourse méiotique *pat1-114 m210* incubés avec différents cofacteurs afin de vérifier une activité enzymatique permettant la relaxation du plasmide pBlueScript II SK+. Les extraits protéiques fonctionnels de SRS et la topoisomérase I agissent à titre de témoins positifs d'activité enzymatique. Le plasmide superenroulé a été mis sur gel à titre de contrôle négatif. Marqueur : 1 kb Plus DNA ladder.

À partir de ces observations, j'ai refait le même processus avec un éventail plus large au niveau des extraits protéiques fonctionnels utilisés. Aussi, l'implication de l'ATP a été intégrée

à cet essai, puisqu'il est un cofacteur essentiel à la fonction des topoisomères de type II (Stuchinskaya *et al.*, 2009). De plus, seul le cofacteur CaCl_2 (10 mM) a été utilisé en raison du résultat préliminaire obtenu précédemment.

En absence d'ATP (Fig. 16A), on dénote la présence d'activité topoisomérase entre les heures $t=8\text{h}$ et $t=16\text{h}$ (difficilement perceptible dans la représentation ci-dessous), possiblement de nature topoisomérase de type I. Avec l'ajout de 1 mM ATP à la réaction, on conserve toujours l'activité topoisomérase, mais on s'aperçoit que celle-ci est toujours présente dans le contrôle « topo I » avec ajout de l'ATP (Fig. 16B). Donc, on ne peut discriminer s'il s'agit d'une activité nucléase partielle puisque la résolution des topoisomères est relativement faible.

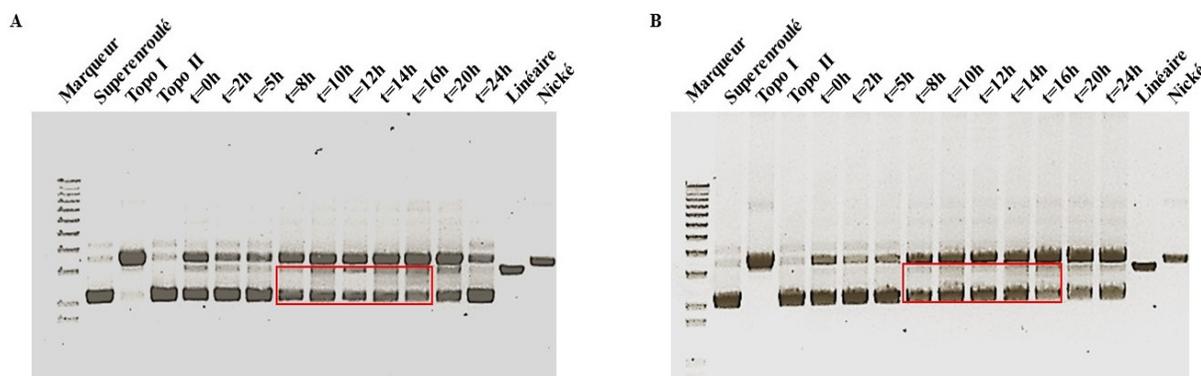


Figure 16 : Essai de relaxation plasmidique avec ou sans ATP. Les extraits protéiques fonctionnels provenant de divers prélèvements d'un timecourse méiotique *pat1-114 m210* incubés (A) sans ou (B) avec 1 mM ATP afin de vérifier la possibilité d'une activité topoisomérase permettant la relaxation du plasmide pBlueScript II SK+. Les topoisomères I et II commerciales agissaient à titre de témoins positifs d'activité enzymatique. Les plasmides superenroulé/linéaire/nické ont été mis sur gel à titre de contrôles négatifs. Marqueur : 1 kb Plus DNA ladder.

Considérant ce point, une approche secondaire a été utilisée afin de déterminer la nature de l'enzyme impliquée dans le processus de fragmentation transitoire de l'ADN. En effet, par « in gel assay » couplé à la spectrométrie de masse, il serait possible de déterminer avec plus de précision la nature de ou des enzyme(s) impliquée(s).

3.3.2.2. Criblage par essai « en gel »

L'essai nucléase « en gel » permet de dénoter la présence de nucléase susceptible de dégrader de l'ADN incorporé à même le gel. Étant donné la possibilité de renaturer les protéines sur gel, une incubation de celles-ci avec l'ADN contenu dans le gel permet d'obtenir des trous lorsque l'ADN est coloré au révélateur utilisé (dans le cas échéant, le EZ-vision). J'ai envoyé

des « trous » d'intérêt en spectrométrie de masse qui semblait intéressant de par leur présence ou non au niveau des pistes ainsi que leur poids moléculaire (Fig. 17). Les résultats qui me sont parvenus ont été criblés de manière à ressortir les nucléases potentielles selon les populations envoyées en spectrométrie de masse (tableau 2). À noter que seulement les désoxyribonucléases ainsi que les ribonucléases ont été comptabilisés dans ce tableau, sous forme de score attribué selon le nombre d'évènements identifiés en spectrométrie de masse.

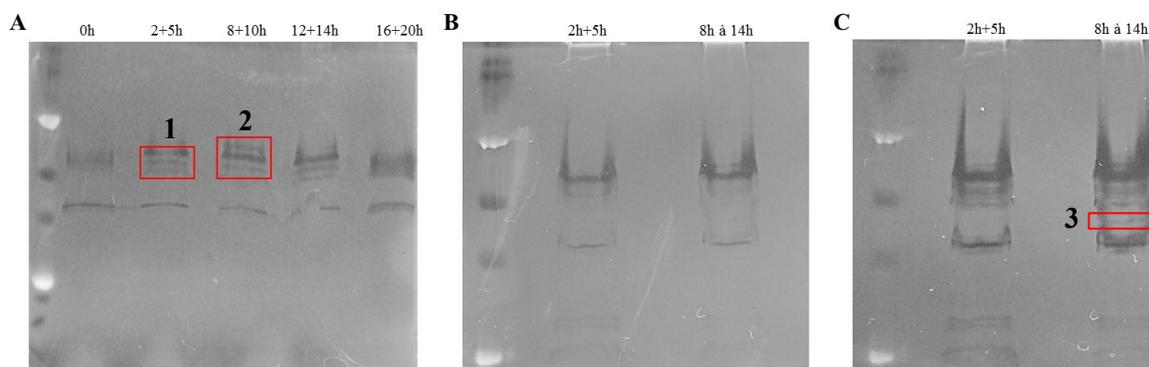


Figure 17 : Essai nucléase « en gel ». Les extraits protéiques fonctionnels ont été mis sur un gel comportant de l'ADN (15 µg/ml de pBlueScript II SK+) pour vérifier l'activité nucléase des extraits. Les échantillons ont été combinés à des fins de concentration et incubés pendant (B) 30 minutes (C) 1h30. Les bandes identifiées en rouge (rectangles) ont été analysées par spectrométrie de masse. Quantité de protéines par piste : (A) 25 µg/piste et (B et C) 60 µg/piste. Marqueur : Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Biorad).

Tableau 2 : Nucléases obtenues par spectrométrie de masse pour chacune des populations d'intérêt suite à l'essai nucléase « en gel »

Nucléases (ARN et ADN)	Score bande 1	Score bande 2	Score bande 3
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (Snd1)	8	16	9
Nuclease 1, mitochondrial (Pnu1)	6	6	1
5'-3' exoribonuclease 1 (Exo2)	1	4	0
Exosome complex exonuclease (Dis3)	1	4	2
Probable RNA exonuclease C9B6.11c (SPBC9B6.11c)	1	4	0
5'-3' exoribonuclease 2 (Dhp1)	1	2	0
Endoribonuclease ysh1 (Ysh1)	1	1	0

Bien qu'à première vue cette liste ne laisse paraître que des ribonucléases, il est intéressant de constater que la nucléase 1 Pnu1 est également capable de dégrader l'ADN au même titre que l'ARN, selon son implication physiologique. Cette observation sera discutée plus en profondeur dans la section discussion qui suit.

4. DISCUSSION

L'objectif initial de mon projet de maîtrise était d'identifier et de caractériser le ou les mécanisme(s) de réparation qui était(ent) responsable(s) de la réparation des cassures transitoires de l'ADN lors de la maturation des spermatides en élongation, en utilisant une approche protéomique permettant la capture des facteurs de réparation en utilisant le complexe MRN comme appât. La formation du complexe MRN comme appât en utilisant la protéine recombinante Mre11 comme pivot a représenté un défi colossal, si bien que la réalisation des expériences d'électrophorèse bidimensionnelle et de co-immunoprécipitation des facteurs de réparation ont été très ardues et n'ont pu permettre de tirer de conclusions satisfaisantes. Pour cette raison, nous avons décidé d'orienter mon projet de maîtrise vers l'élaboration d'un modèle flexible pour l'étude de la spermatogenèse murine en utilisant le pouvoir génétique de la levure à fission. En se basant sur un modèle d'étude simplifié qui permet une certaine latitude expérimentale grâce à son important pouvoir génétique, il sera possible d'élucider l'impact de la transmission des mutations induites par la réparation des cassures transitoires de l'ADN sur les futures générations. Dans ce contexte, l'utilisation de la levure à fission a été proposée afin de servir de modèle d'étude comparatif à la spermiogenèse murine. Par ailleurs, très peu de travaux sur l'intégrité génétique de la levure à fission ont été réalisés, ce qui ajoute un aspect novateur à ce projet.

4.1. Cassures bicaténaire transitoires de l'ADN lors de la maturation des ascospores

4.1.1. Qualité de la synchronisation méiotique

Étant donné les limitations techniques inhérentes à l'utilisation des spermatides dans le contexte de notre recherche, nous avons décidé d'utiliser la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* afin de bien circonscrire les événements méiotiques et post-méiotiques. De cette façon, il devenait intéressant de vérifier la conservation de ces événements à travers tout le monde eucaryote. Puisqu'il était primordial de synchroniser de manière optimale la méiose, nous avons opté pour l'utilisation de la souche *pat1-114 m210* diploïde. Les dénombrements cellulaires ont permis de conclure que la synchronisation de la levure à fission était efficace en comparant les dénombrements reportés dans la littérature (Krapp *et al.*, 2006; Pérez-Hidalgo *et al.*, 2008). Il est important de noter que la qualité de la synchronisation est étroitement liée à la précision des manipulations. De ce fait, la reproductibilité des expériences

a été un facteur très important à prendre en considération dans le présent projet et les cinétiques méiotiques comportant des anomalies au niveau des dénombrements cellulaires non pas été considérées. Bien que la levure soit un outil couramment utilisé dans la science fondamentale, très peu d'études ont été réalisées dans un contexte d'analyse d'intégrité du génome. Il est donc difficile de retracer des comparatifs dans la littérature scientifique en fait de synchronisation méiotique, surtout dans le but d'élucider les concepts post-méiotiques. En dépit de cela, il est possible de fixer la maturation des ascospores selon l'apparition des cellules à « 4 noyaux » ainsi que la disparition des cellules « 2 noyaux » en se rapportant à la figure 8A. Ainsi, dans le contexte expérimental de ce projet, la maturation des ascospores débute à partir de $t=8h$. À partir de cette observation, tous les résultats ont pu être normalisés à partir de ce temps charnière.

4.1.2. La fragmentation relative de l'ADN lors de la maturation des spores chez *S. pombe*

Lors de la formation des gamètes mâles chez les eucaryotes supérieurs, le génome se compacte dans la tête du spermatozoïde afin de favoriser une protection physicochimique optimale à la fécondation éventuelle d'un ovule. Ce changement morphologique s'accompagne d'un processus de fragmentation transitoire de l'ADN lors de la maturation des spermatides en spermatozoïdes. Les résultats obtenus chez la levure à fission indiquent que ce phénomène serait également en place lors de la maturation des ascospores chez *S. pombe*. En me basant sur deux techniques démontrant la présence de cassures dans l'ADN, j'ai pu déterminer pour la première fois que ce phénomène survenait chez la levure à fission, démontrant ainsi la conservation phylogénétique du phénomène et la possibilité d'utiliser la levure à fission à titre de modèle expérimental dans la recherche sur la spermatogenèse.

En premier lieu, l'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé permet de faire migrer de gros fragments d'ADN, voire des chromosomes entiers, permettant de déterminer la population des fragments d'ADN retrouvés dans les divers échantillons d'ADN de la cinétique méiotique (Hyppa et Smith, 2009; Avelar *et al.*, 2013). Il est important de noter qu'à partir de cette migration en condition neutre, on ne peut qu'analyser la présence de cassures bicaténaires de l'ADN, alors que les fragments simples brins (par exemple, les sites abasiques) ne seront pas résolus dans ces conditions. De ce fait, cette technique est toute désignée pour faire le parallèle avec le phénomène de fragmentation transitoire qui survient dans les spermatides en élongation. En observant le résultat de la migration de manière qualitative, on dénote une intensité relative

plus grande dans le cas d'une population plus importante de fragments d'ADN d'une même taille. En rapportant cette modalité sur un graphique et en normalisant par rapport au temps de référence $t=0h$ (Fig. 12), il est plus évident de déceler diverses tendances. Premièrement, une chute de la taille des fragments est perceptible entre 2 et 6 heures après l'induction de la méiose. Cette tendance est attribuable à l'apparition des enjambements méiotiques survenant lors de la métaphase, suivant la phase S qui s'étend sur les deux à trois premières heures suite à l'induction de la méiose. Ces enjambements sont transitoires mais lors de la fixation des échantillons à l'éthanol, le processus de recombinaison homologe permettant la réparation de ces cassures est inhibée et ces ouvertures dans l'ADN sont identifiables par PFGE (Hyppa et Smith, 2009). À la suite de ces enjambements, à $t=7h$, on assiste à une hausse de la taille des fragments d'ADN, une hausse qui coïncide avec la fin de la méiose. Logiquement, il serait pertinent que cette hausse se poursuive dans les heures suivant la fin de la méiose pour atteindre le niveau basal mais, au contraire, la taille moyenne des fragments tend à diminuer à $t>7h$, signe d'une fragmentation de l'ADN survient entre 8h et 12h après l'induction méiotique (Fig. 12A). Le phénomène de fragmentation transitoire de l'ADN attribuable à la maturation des ascospores se déroulerait donc entre ces heures, pour ensuite disparaître à $t>14h$ alors que les cassures s'estompent graduellement. Cette observation est donc nouvelle et pourrait indiquer que la formation du gamète s'accompagne de cassures bicaténaires transitoires dans l'ensemble du monde eucaryote. Les implications génétiques sont décrites plus loin.

En second lieu, une nouvelle méthode de quantification des cassures à l'ADN développée dans notre laboratoire a permis d'ajouter une deuxième technique afin de déterminer la présence des cassures transitoires dans l'ADN. Comme son nom l'indique, le qTUNEL est un dérivé de la technique classique de marquage des extrémités 3'-OH de l'ADN par un ajout de nucléotides à la TdT (TUNEL conventionnel). La variante de notre procédé réside dans la nature radioactive du nucléotide ajouté, qui permet une analyse quantitative du nombre de cassures et une sensibilité accrue. Comme notre hypothèse de recherche implique l'action de topoisomérases de type II comme responsable des cassures transitoire de l'ADN, il est possible de radiomarquer les fragments d'ADN résultant du clivage enzymatique des topoisomérases de type II alors que celles-ci produisent des extrémités 3'-OH au niveau de leur intermédiaires réactionnels dans le cas d'un clivage partiel (Leduc *et al.*, 2008). Dans le cadre de ce projet, il était important de marquer spécifiquement les cassures double-brin en excluant le biais des

cassures simple-brin. Cependant, dans le contexte préliminaire du qTUNEL, il était impossible d'exclure complètement ces dernières, ce qui biaise légèrement les résultats obtenus. Par conséquent, on dénote une divergence entre les tendances qui ressortent des graphiques du PFGE et du qTUNEL, fort possiblement en raison de la contamination des cassures simple-brin dans les extraits d'ADN. À titre d'exemples, la fragmentation perceptible à $t=0h$ et $t=2h$ serait attribuable à la présence des fragments d'Okazaki lors de la réplication de l'ADN en phase S (Alberts, 2003; Choe *et al.*, 2002). La tendance entre 8h et 12h est similaire à celle observée en PFGE, attribuable à l'apparition des cassures bicaténares de l'ADN durant la morphogénèse des spores, bien que la densitométrie réalisée sur le gel PFGE ne soit pas suffisamment sensible pour se comparer fidèlement au qTUNEL. Quant à l'augmentation de la fragmentation relative du génome à $t>14h$, il est difficile de l'attribuer à un processus bien défini puisque l'activité cellulaire dans les spores est quasi-nulle (Betz et Weiser, 1976). Possiblement qu'une accumulation des cassures simple-brin attribuables à une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) couplée à l'incapacité d'enclencher le mécanisme de réparation de ces cassures seraient responsables de cette tendance (Arcangioli & Ben Hassine, 2009). Il est permis de croire que les ROS peuvent effectivement être impliqués dans une distribution marquée de cassures simple brin dans des structures aussi étanches qu'un ascospore, au même titre que dans les spermatozoïdes matures de l'épididyme (Griveau et Le Lannou, 1997; Aitken *et al.*, 2010 ; Guthrie et Welch, 2012). Dans l'optique de discriminer la contamination des cassures simple-brin, une approche par « nick sealing/gap repair » a été planifiée afin de diminuer leur marquage par la TdT. Brièvement, en utilisant conjointement une ligase ainsi qu'une polymérase sur les extraits d'ADN, il est possible de réparer les cassures simple brin afin de masquer le biais de marquage. Par faute de temps, je n'ai pas eu le temps de compléter cette perspective, bien que j'ai activement participé à cette optimisation. C'est d'ailleurs une nouvelle étudiante au laboratoire qui aura pour mission d'appliquer cette optimisation cruciale afin de valider cette hypothèse.

4.2. Remodelage chromatinien

4.2.1. Marqueurs importants du remodelage chromatinien

Lors du remodelage chromatinien dans les spermatides en élongation, on assiste à plusieurs changements au niveau de la nature des nucléosomes, dont l'apparition du variant

d'histones γ H2AFX. Ce variant d'histones a été répertorié dans plusieurs organismes comme signal de la présence de cassures à l'ADN et de remodelage chromatinien. Au niveau de la cinétique méiotique, il est intéressant de constater à la figure 14 l'augmentation du signal de H2AS129p (homologue de γ H2AFX chez *S. pombe*) aux heures correspondant à la maturation des ascospores. Ainsi, ces observations suggèrent des similitudes dans les événements chromatiniens menant à la formation du gamète. Fait d'autant plus intéressant, à $t \geq 10$ h, l'augmentation du signal d'acétylation de l'histone H3 semble indiquer une réparation des cassures bicaténares de l'ADN. En effet, un des rôles de l'acétylation de la lysine K56 est de signaler la fin de la réparation des cassures bicaténares de l'ADN (Chen *et al.*, 2008). Il est à noter cependant que l'anticorps dont je disposais ne ciblait pas la lysine K56 en particulier, mais l'acétylation globale de la queue N-terminale de l'histone H3. Il serait donc pertinent de confirmer l'acétylation ponctuelle de cette lysine spécifiquement à l'aide d'un anticorps destiné à cet effet.

Enfin, la fonction de l'hyperacétylation au niveau de la maturation des spores chez *S. pombe* semble quelque peu différente de celle retrouvée dans les spermatides en maturation. Comme il a été mentionné en introduction, l'hyperacétylation des histones au niveau de la spermiogenèse est essentiel pour le retrait des histones afin d'incorporer les protéines de transition et finalement les protamines. Cependant, ces deux dernières ne sont pas présentes chez la levure à fission et ainsi, le rôle de l'hyperacétylation des histones H4 ne serait donc pas nécessaire. Ainsi, il est donc logique de ne pas obtenir une augmentation du signal dans les populations précédant la maturation des ascospores ($t \sim 7-8$ h). À titre comparatif, les spermatozoïdes du poisson zèbre (*Danio rerio*) subissent une compaction nucléaire, sans toutefois faire appel à la protamination comme mécanisme de compaction nucléaire puisque cette espèce ne dispose pas de protamines (Carrell, 2011). Il serait d'ailleurs pertinent d'établir un patron caractéristique des modifications épigénétiques des histones au cours de la maturation des ascospores de la levure à fission.

4.2.2. Implication des enzymes responsables des cassures bicaténares

Les analyses de relaxation plasmidiques ont permis de conclure qu'il semblait y avoir une faible activité topoisomérases dans les extraits protéiques fonctionnels en présence du cofacteur Ca^{2+} . Malgré la bivalence de cet ion, le cofacteur nécessaire à la catalyse enzymatique

des topoisomérases est l'ion Mg^{2+} (Vos *et al.*, 2015). Par contre, il a été démontré qu'au niveau des spermatozoïdes, la topoisomérase de type IIB pouvait être associée à une nucléase Ca^{2+} , favorisant le clivage de l'ADN en plusieurs fragments de 50 kb (Shaman *et al.*, 2006). Dans le contexte *in vitro* de l'essai de relaxation plasmidique, il serait surprenant que ce complexe soit responsable des topoisomères visibles sur gel à $t=12h$ (Fig. 15). Pour cette raison, un essai nucléase « en gel » a été réalisé, couplé à la spectrométrie de masse afin d'identifier une nucléase potentielle. Suite à cette analyse, la nucléase 1 (Pnu1) a été identifiée dans les populations. Cette nucléase mitochondriale « catabolise » la dégradation de nombreux ARN nécessaires à l'enclenchement de la méiose chez la levure à fission (Nakashima *et al.*, 2002). De plus, Pnu1 est également capable de cliver l'ADN lorsqu'elle est retrouvée hors de la mitochondrie (Oda *et al.*, 2006). Cette nucléase possède un homologue chez les eucaryotes supérieurs, soit l'endonucléase G (EndoG). Le rôle de cette nucléase au sein de la spermiogenèse humaine est encore nébuleux, mais une étude a démontré que la nucléase serait responsable de la disparition de l'ADN mitochondrial du spermatozoïde chez la drosophile, rendant sa transmission impossible à la future génération (DeLuca et O'Farrell, 2012). Chez la souris, l'activité nucléase d'EndoG intervient au niveau de la dégradation du génome dans un contexte apoptotique dans des cellules somatiques (van Loo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). À la lueur de ses observations, il est permis de spéculer que la nucléase Pnu1 puisse être impliquée au niveau des cassures bicaténaires lors du remodelage chromatinien dans les ascospores en maturation et offre une piste d'investigation intéressante.

En conclusion, ce projet avait pour but de démontrer le potentiel d'utilisation de la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* dans le but de déterminer le ou les mécanismes de réparation des cassures transitoires de l'ADN suite au remodelage chromatinien post-méiotique. Bien que le temps ait limité la finalité de ce projet, les résultats obtenus indiquent que la levure à fission possède les caractéristiques nécessaires à l'élaboration d'un modèle flexible de la spermiogenèse murine. Dans l'optique de solidifier cette découverte, il serait intéressant d'approfondir les bases de ce modèle en effectuant des immunofluorescence dirigées contre les variants d'histones ainsi que l'endonucléase Pnu1. Également, il est primordial de refaire le qTUNEL après une réparation des cassures simple brin afin de pouvoir réaliser un parallèle évident avec le PFGE. Finalement, il faudrait appliquer le modèle dans le but de trouver le mécanisme de réparation responsable de la réparation des cassures par l'utilisation de techniques

telles que l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et la co-immunoprécipitation. Ainsi, nous pourrions finalement être en mesure d'établir une approche intéressante afin de mieux comprendre l'impact génétique du remodelage chromatinien survenant lors de la maturation des spermatides.

5. Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Pr Guylain Boissonneault, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise au sein de son groupe de recherche. J'aimerais également le remercier pour son écoute, sa disponibilité et son implication dans mon travail de recherche.

Deuxièmement, mon passage à la maîtrise n'aurait jamais été le même sans le support et l'amitié que j'ai pu développer avec mes collègues de travail. J'aimerais remercier Mélina Arguin d'avoir vu en moi un potentiel pour la recherche à mon entrevue d'embauche, ainsi que tous les conseils pratiques qu'elle a su me prodiguer. Je désire remercier de manière toute spéciale Geneviève Acteau et Marie-Chantal Grégoire pour leur temps, leur dévotion, leur expertise et surtout leur passion envers mon projet de recherche. J'aimerais finalement remercier Frédéric Leduc, Olivier Simard, Jessica Leroux, Anne Gouraud, Julien Massonneau et tous les stagiaires que j'ai côtoyés au cours des dernières années.

Je souhaite également remercier mes parents et toute ma famille élargie de m'avoir soutenu dans mon cheminement, d'avoir été présent tout au long de ce parcours qui me tenait à cœur. Un remerciement tout spécial à ma copine Michaëlle Pelletier-Rivard d'avoir partagé les bons comme les mauvais moments durant ces derniers mois.

Je remercie tous les membres du laboratoire du Pr Simon Labbé qui m'ont épaulé et prodigué multiples conseils, tout spécialement Jude Beaudoin et Samuel Plante. Aussi, je remercie le laboratoire du Pr François-Michel Boivert pour l'analyse en spectrométrie de masse, ainsi que Catherine Desrosiers pour son expertise en protéomique.

Finalement, j'aimerais remercier l'Université de Sherbrooke et le RQR (Réseau Québécois et Reproduction) pour leur soutien financier.

6. Liste des références

- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: Development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25(10), 2415–2426. doi:10.1093/humrep/deq214
- Annunziato, A. T. (2005). Split decision: What happens to nucleosomes during DNA replication? *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12065–12068. doi:10.1074/jbc.R400039200
- Aratani, Y., Andoh, T., & Koyama, H. (1996). Effects of DNA topoisomerase inhibitors on nonhomologous and homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res.* 362(2):181-91.
- Arcangioli, B., & Hassine, S. Ben. (2009). Unrepaired oxidative DNA damage induces an ATR/ATM apoptotic-like response in quiescent fission yeast. *Cell Cycle*, 8(15), 2326–2331. doi:9147 [pii]
- Arzumanov, A. A., Victorova, L. S., Jasko, M. V, Yesipov, D. S., & Krayevsky, A. A. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase catalyzes the reaction of DNA phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 28(5), 1276–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Avelar, A. T., Perfeito, L., Gordo, I., & Ferreira, M. G. (2013). Genome architecture is a selectable trait that can be maintained by antagonistic pleiotropy. *Nature Communications*, 4, 2235. doi:10.1038/ncomms3235
- Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2010). Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(1), 44–61. doi:10.3109/19396360903490790
- Bailis, J. M., Smith, a V, & Roeder, G. S. (2000). Bypass of a meiotic checkpoint by overproduction of meiotic chromosomal proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4838–4848. doi:10.1128/MCB.20.13.4838-4848.2000
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., & Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*. doi:10.1038/379225a0
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), 142–148. doi:10.1016/S0959-437X(02)00279-4
- Broering, T. J., Wang, Y.-L., Pandey, R. N., Hegde, R. S., Wang, S.-C., & Namekawa, S. H. (2015). BAZ1B is dispensable for H2AX phosphorylation on Tyrosine 142 during spermatogenesis. *Biology Open*, 4(7), 873–884. doi:10.1242/bio.011734
- Cabrero, J., Palomino-Morales, R. J., & Camacho, J. P. M. (2007). The DNA-repair Ku70

- protein is located in the nucleus and tail of elongating spermatids in grasshoppers. *Chromosome Research*, 15(8), 1093–100. doi:10.1007/s10577-007-1183-5
- Carrell, D. T. (2011). Epigenetic marks in zebrafish sperm: insights into chromatin compaction, maintenance of pluripotency, and the role of the paternal genome after fertilization. *Asian Journal of Andrology*, 13(4), 620–621. doi:10.1038/aja.2011.37
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., ... Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology*, 5(7), 675–9. doi:10.1038/ncb1004
- Chen, C. C., Carson, J. J., Feser, J., Tamburini, B., Zabaronick, S., Linger, J., & Tyler, J. K. (2008). Acetylated Lysine 56 on Histone H3 Drives Chromatin Assembly after Repair and Signals for the Completion of Repair. *Cell*, 134(2), 231–243. doi:10.1016/j.cell.2008.06.035
- Choe, W., Budd, M., Imamura, O., Hoopes, L., & Campbell, J. L. (2002). Dynamic localization of an Okazaki fragment processing protein suggests a novel role in telomere replication. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4202–4217. doi:10.1128/MCB.22.12.4202-4217.2002
- Chowdhury, R., Bois, P. R. J., Feingold, E., Sherman, S. L., & Cheung, V. G. (2009). Genetic analysis of variation in human meiotic recombination. *PLoS Genetics*, 5(9). doi:10.1371/journal.pgen.1000648
- Cipak, L., Polakova, S., Hyppa, R. W., Smith, G. R., & Gregan, J. (2014). Synchronized fission yeast meiosis using an ATP analog-sensitive Pat1 protein kinase. *Nature Protocols*, 9(1), 223–31. doi:10.1038/nprot.2014.013
- Cromie, G. A., Hyppa, R. W., Cam, H. P., Farah, J. A., Grewal, S. I. S., & Smith, G. R. (2007). A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genetics*, 3(8), 1496–1507. doi:10.1371/journal.pgen.0030141
- Davis, L., & Smith, G. R. (2001). Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8395–8402. doi:10.1073/pnas.121005598
- de Lange, T. (1998). Ending up with the right partner. *Nature*, 392(6678), 753–754. doi:10.1038/33790
- Dekker, N. H., Rybenkov, V. V, Duguet, M., Crisona, N. J., Cozzarelli, N. R., Bensimon, D., & Croquette, V. (2002). The mechanism of type IA topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12126–31. doi:10.1073/pnas.132378799
- DeLuca, S. Z., & O'Farrell, P. H. (2012). Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Developmental Cell*, 22(3), 660–668. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.021
- Doyle, A., Martín-garcía, R., Coulton, A. T., Bagley, S., & Mulvihill, D. P. (2009). Fission

- yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 23), 4330–40. doi:10.1242/jcs.055202
- Drissi, R., Dubois, M.-L., Douziech, M., & Boisvert, F.-M. (2015). Quantitative proteomics reveals dynamic interactions of the MCM complex in the cellular response to etoposide induced DNA damage. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 2002–2013. doi:10.1074/mcp.M115.048991
- Ellermeier, C., Higuchi, E. C., Phadnis, N., Holm, L., Geelhood, J. L., Thon, G., & Smith, G. R. (2010). RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8701–5. doi:10.1073/pnas.0914160107
- Fantes, P., & Beggs, J. (2000). *The yeast nucleus*. Oxford University Press: Oxford.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D., Bonner, W. M., ... Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell*, 4(4), 497–508. doi:10.1016/S1534-5807(03)00093-5
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gabelle, D., & Serre, M.-C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 89(4), 427–446. doi:10.1016/j.biochi.2006.12.009
- Gatzeva-topalova, P. Z., Warner, L. R., Pardi, A., & Carlos, M. (2009). Condensins Regulate Meiotic DNA Break Distribution, thus Crossover Frequency, by Controlling Chromosome Structure. *Cell*, 139(1), 73–86. doi:10.1016/j.str.2010.08.012.Structure
- Gomendio, M., Malo, A. F., Garde, J., & Roldan, E. R. S. (2007). Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction*, 134(1), 19–29. doi:10.1530/REP-07-0143
- Griveau, J. F., & Le Lannou, D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*, 20, 61–69. doi:10.1046/j.1365-2605.1997.00044.x
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78(8), 1700–1708. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.002
- Hall, J. A., & Georgel, P. T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 28th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review proces. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(4), 463–476. doi:10.1139/O07-063
- Hammer, D. A. (2005). Leukocyte adhesion: What's the catch? *Current Biology*, 15(3), 99–102. doi:10.1016/j.cub.2005.01.028
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, a K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., ... Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *European Journal of Cell Biology*, 79, 950–960.

doi:10.1078/0171-9335-00123

- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., & Smith, C. E. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 73(4), 279–319. doi:10.1002/jemt.20787
- Hood, L., & Galas, D. (2003). The digital code of DNA. *Nature*, 421(6921), 444–448. doi:10.1038/nature01410
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687–696. doi:10.1093/carcin/23.5.687
- Jasencakova, Z., Meister, a, Walter, J., Turner, B. M., & Schubert, I. (2000). Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell*, 12(11), 2087–2100. doi:10.1105/tpc.12.11.2087
- Johnson, G. D., Lalancette, C., Linnemann, A. K., Leduc, F., Boissonneault, G., & Krawetz, S. a. (2011). The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(1), 21–36. doi:10.1530/REP-10-0322
- Kimmins, S., & Sassone-Corsi, P. (2005). Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 434(7033), 583–589. doi:10.1038/nature03368
- Kirkegaard, K., & Wang, J. C. (1985). Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *Journal of Molecular Biology*, 185(3), 625–637. doi:10.1016/0022-2836(85)90075-0
- Klar, A. J. S. (2007). Lessons learned from studies of fission yeast mating-type switching and silencing. *Annual Review of Genetics*, 41, 213–236. doi:10.1146/annurev.genet.39.073103.094316
- Kovtun, I. V., & McMurray, C. T. (2001). Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nature Genetics*, 27(4), 407–11. doi:10.1038/86906
- Krapp, A., Collin, P., Cokoja, A., Dischinger, S., Cano, E., & Simanis, V. (2006). The Schizosaccharomyces pombe septation initiation network (SIN) is required for spore formation in meiosis. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 14), 2882–91. doi:10.1242/jcs.03025
- Laberge, R.-M., & Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biology of Reproduction*, 73(2), 289–296. doi:10.1095/biolreprod.104.036939
- Le, A.-H., Mastro, T. L., & Forsburg, S. L. (2013). The C-terminus of S. pombe DDK subunit Dfp1 is required for meiosis-specific transcription and cohesin cleavage. 362(2):181-91. doi:10.1242/bio.20135173
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G. B., & Boissonneault, G. (2008). DNA damage

- response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology of Reproduction*, 78(2), 324–32. doi:10.1095/biolreprod.107.064162
- Leduc, F., Acteau, G., Grégoire, MC, Simard, O., Leroux, J., Carrier-Leclerc, A., Arguin, M., & Boissonneault, G. (2011). Post-Meiotic DNA Damage and Response in Male Germ Cells, DNA Repair, Dr. Inna Kruman (Ed.), ISBN: 978-953-307-697-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/dna-repair/post-meiotic-dna-damage-and-response-in-male-germ-cells>
- Lewis, J. D., Abbott, D. W., & Ausió, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 81(3), 131–140. doi:10.1139/o03-045
- Lino, Y., & Yamamoto, M. (1985). Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Mol Gen Genet*. 198:416-421.
- Liu, L. F., Duann, P., Lin, C. T., D'Arpa, P., & Wu, J. (1996). Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 803, 44–49. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb26375.x
- Ma, Q., Teter, B., Ubeda, O. J., Morihara, T., Dhoot, D., Nyby, M. D., ... Cole, G. M. (2009). NIH Public Access Author Manuscript *J Mol Biol*. Author manuscript; available in PMC 2015 February 27. Published in final edited form as: *J Mol Biol*. 2009 February 6; 385(5): 1397–1408. doi:10.1016/j.jmb.2008.11.056. How do type II topoisomerases use ATP h. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), 1397–1408. doi:10.1523/JNEUROSCI.3593-07.2007.Omega-3
- Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Wong, W., Sigurdsson, G., ... Thorsteinsdottir, U. (2012). Rate of de novo mutations, father's age, and disease risk Augustine. *Natu*, 488(7412), 471–475. doi:10.1038/nature11396.Rate
- Marcon, L., & Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of Reproduction*, 70(4), 910–8. doi:10.1095/biolreprod.103.022541
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J. D., Ihara, M., Meistrich, M. L., Austin, C. a, & Meyer, R. G. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 84(5), 900–9. doi:10.1095/biolreprod.110.090035
- Miller, D., Brinkworth, M., & Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(2), 287–301. doi:10.1530/REP-09-0281
- Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. H., & Gellert, M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 1847–1851. doi:10.1073/pnas.77.4.1847
- Motea, E. A., & Berdis, A. J. (2010). Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a

- misguided DNA polymerase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(5), 1151–1166. doi:10.1016/j.bbapap.2009.06.030
- Nakamura, A. J., Rao, V. A., Pommier, Y., & Bonner, W. M. (2010). The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 9(2), 389–397. doi:10.4161/cc.9.2.10475
- Nakashima, A., Yoshida, M., Nakayama, K., Kato-Furuno, A., Ueno, M., Ushimaru, T., & Uritani, M. (2002). Genes for a nuclease and a protease are involved in the drastic decrease in cellular RNA amount in fission yeast cells during nitrogen starvation. *J Biochem (Tokyo)*, 131(3), 391–398. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003114
- Oda, K., Kawasaki, N., Fukuyama, M., & Ikeda, S. (2007). Ectopic expression of mitochondria endonuclease Pnu1p from *Schizosaccharomyces pombe* induces cell death of the yeast. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(6), 1095–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047809>
- Otsubo, Y., Yamashita, A., Ohno, H., & Yamamoto, M. (2014). *S. pombe* TORC1 activates the ubiquitin-proteasomal degradation of the meiotic regulator Mei2 in cooperation with Pat1 kinase. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 12), 2639–46. doi:10.1242/jcs.135517
- Patterns, C. (1976). Protein Degradation during Yeast Sporulation. *Eur. J. Biochem*, 70, 385–395.
- Perez-Hidalgo, L., Rozalen, A. E., Martin-Castellanos, C., & Moreno, S. (2008). Slk1 is a meiosis-specific Sid2-related kinase that coordinates meiotic nuclear division with growth of the forespore membrane. *J Cell Sci*, 121(Pt 9), 1383–1392. doi:10.1242/jcs.023812
- Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2005). The role of heterochromatin in centromere function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1455), 569–579. doi:10.1098/rstb.2004.1611
- Rappa, K. L., Rodriguez, H. F., Hakkarainen, G. C., Anchan, R. M., Mutter, G. L., & Asghar, W. (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.01.007
- Rathke, C., Baarends, W. M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., & Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 120, 1689–1700. doi:10.1242/jcs.004663
- Rolland, A. D., Jégou, B., et Pineau, C. (2008). Testicular Development and Spermatogenesis : Harvesting the Postgenomics Bounty. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Chapitre 2, 17-41.
- Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, 5(4), 345–357. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00225.x
- Ruan, K., Yamamoto, T. G., Asakawa, H., Chikashige, Y., Kimura, H., Masukata, H., ...

- Hiraoka, Y. (2015). Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Scientific Reports*, 5(12720). doi:10.1038/srep12720
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.P.S. et Clegg, E.D. (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1st édition, Clearwater, FL, Cache River Press, 286 p.
- Santé Canada. (2013). Qu'est-ce que l'infertilité? <http://canadiensensante.gc.ca/healthy-living-vie-saine/pregnancy-grossesse/fertility-fertilite/fert-fra.php>, 28 mars 2016.
- Seeman, N. C. (2003). DNA in a material world. *Nature*, 421(6921), 427–431. doi:10.1038/nature01406
- Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., ... Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77(5), 873–882. doi:10.1016/S0015-0282(02)03105-9
- Simard, O., Grégoire, M.-C., Arguin, M., Brazeau, M.-A., Leduc, F., Marois, I., ... Boissonneault, G. (2014). Instability of trinucleotidic repeats during chromatin remodeling in spermatids. *Human Mutation*, 35(11), 1280–4. doi:10.1002/humu.22637
- Smith, C. L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J. B., Yanagida, M., & Cantor, C. R. (1987). An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15(11), 4481–4489. doi:10.1093/nar/gkn942
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., ... Vandenameele, P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation*, 8(12), 1136–1142. doi:10.1038/sj.cdd.4400944
- Viard, T., Cossard, R., Duguet, M., & Bouthier De La Tour, C. (2004). Thermotoga maritima-Escherichia coli chimeric topoisomerases: Answers about involvement of the carboxyl-terminal domain in DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30073–30080. doi:10.1074/jbc.M309692200
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B. J., & Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Molecular Cell*, 10(5), 1223–1233. doi:10.1016/S1097-2765(02)00702-5
- Wang, H., Ramakrishnan, A., Fletcher, S., Prochownik, E. V., & Genetics, M. (2015). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(12), 827–841. doi:10.14440/jbm.2015.54.A
- Ward, W. S. (1994). The structure of the sleeping genome: Implications of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(1), 77–82. doi:10.1002/jcb.240550109
- WOLGEMUTH, D. J., & Hsu, M.-T. (1981). Recombination intermediates (reply). *Nature*, 289(4), 97–97. doi:10.1038/289097d0

Workman, J. L. (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes and Development*, 20(15), 2009–2017. doi:10.1101/gad.1435706

Zhang, J., Dong, M., Li, L., Fan, Y., Pathre, P., Dong, J., ... Xu, M. (2003). Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15782–7. doi:10.1073/pnas.2636393100

7. Annexe

PRESENTATIONS

Marc-André BRAZEAU, Geneviève Acteau, Olivier Simard, Guylain Boissonneault. Caractérisation du mécanisme de réparation des cassures endogènes de l'ADN dans la spermatide en élongation. 5e symposium du RQR, Québec, Canada, November 14-15th 2012.

Marc-André BRAZEAU, Geneviève Acteau, Olivier Simard, Guylain Boissonneault. La réparation de l'ADN lors de la spermatogenèse : quand infidélité rime avec infertilité. Journée de la Recherche, Sherbrooke, Canada, February 12th 2013.

Marc-André BRAZEAU, Jean-Philippe Bourgeois-Chamberland, Julien Massonneau et Guylain Boissonneault. Étude de la conservation du remodelage chromatinien post-méiotique dans le domaine Eucaryote. Journée scientifique de la FMSS, Sherbrooke, Canada, May 27th 2014.

Marc-André BRAZEAU, Jean-Philippe Bourgeois-Chamberland, Julien Massonneau et Guylain Boissonneault. Exploration d'un modèle d'étude simplifié de la spermatogenèse par l'utilisation de la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*. 7e symposium du RQR, Québec, Canada, November 11-12th 2014.

PUBLICATIONS

Simard, O., Leduc, F., Acteau, G., Arguin, M., Grégoire, M.-C., **Brazeau, M.-A.**, Marois, I., Richter, MV., Boissonneault, G. (2015). Step-specific Sorting of Mouse Spermatids by Flow Cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. (106), e53379, doi:10.3791/53379 (2015).

Simard, O., Grégoire, M.-C., Arguin, M., **Brazeau, M.-A.**, Leduc, F., Marois, I., Richter, MV., Boissonneault, G. (2014). Instability of trinucleotidic repeats during chromatin remodeling in spermatids. *Human Mutation*, 35(11), 1280–4.

Grégoire, M.-C., Massonneau, J., Simard, O., Gouraud, A., **Brazeau, M.-A.**, Arguin, M., Leduc, F., Boissonneault, G. (2013). Male-driven de novo mutations in haploid germ cells. *Molecular Human Reproduction*, 19(8), 495–9.

Gouraud, A., **Brazeau, M.-A.**, Grégoire, M.-C., Simard, O., Massonneau, J., Arguin, M., & Boissonneault, G. (2013). “Breaking news” from spermatids. *Basic and Clinical Andrology*, 23(1), 11.