



Université de Strasbourg
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : *Sciences du Vivant*
Spécialité : *Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie*

par

Céline GRABER

Soutenue publiquement le 30 Septembre 2011

*Caractérisation fonctionnelle de la protéine de
l'hétérochromatine HP1 γ chez la souris*

Membres du jury :

Directeur de thèse : **Dr. Florence CAMMAS**
Rapporteur externe : **Dr. Claire FRANCASTEL**
Rapporteur externe : **Dr. Jean-Pierre QUIVY**
Rapporteur interne : **Dr. Daniel METZGER**

Merci...

Je souhaite remercier les membres du jury, le Dr. Claire Francastel, le Dr. Jean-Pierre Quivy et le Dr. Daniel Metzger, d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse.

Le bilan de ces trois années ne peut évidemment pas se faire sans une pensée pour Régine Losson, qui nous a quittés au mois de février 2010. Au fil des mois passés à travailler à ses côtés, j'ai pu apprécier sa profonde rigueur scientifique ainsi que son investissement quotidien dans les projets du laboratoire. En m'accueillant dans son laboratoire et en contribuant à initier les projets ambitieux auxquels j'ai participé, elle m'a permis de réaliser ce travail et m'a donné la chance de pouvoir faire une expérience concrète du travail de recherche.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Florence Cammas, pour son soutien, sa disponibilité et la confiance qu'elle m'a témoignée depuis mon premier jour au laboratoire. J'ai particulièrement apprécié son enthousiasme pour les thématiques dans lesquelles elle est engagée, qui m'a plus d'une fois aidée à surmonter des moments de découragement, ainsi que son optimisme indéfectible, que le ciel -scientifique- nous tombe sur la tête ou non. Je lui suis également très reconnaissante de la patience et de l'indulgence qu'elle a montrées face à mes erreurs de chercheuse débutante, et je me souviendrai longtemps, avec un sourire, du florilège de phrases cultes émaillant nos journées de laboratoire. Je lui souhaite une belle réussite et beaucoup d'épanouissement dans cette nouvelle étape de sa carrière qui s'annonce.

J'ai eu la chance de réaliser mon travail de thèse aux côtés de collègues formidables, que je voudrais ici remercier. Un grand merci à Raphaël Riclet, mon voisin de paillasse tout au long de ces années, pour m'avoir supportée avec une imbattable égalité d'humeur, ainsi que pour sa gentillesse, son soutien et de nombreux moments de fou rire partagés au laboratoire. Tous mes remerciements à Margarita Cervino Rendic, qui a réalisé pour moi un nombre impressionnant de génotypes ; sa gentillesse, sa disponibilité ainsi que sa rigueur scientifique ont été d'une grande aide dans mon travail quotidien. Merci à Khalid-man Ouararhni pour son oreille attentive et les moments de discussion qui ont agrémenté de longs week-ends de manips, ainsi qu'à Benjamin Herquel pour ses conseils au cours de ces derniers mois. Cette année, un vent de fraîcheur a également soufflé sur le laboratoire en la personne de Ghislain Auclair, notre stagiaire M2 ; sa gentillesse et sa bonne humeur inaltérable ont été un vrai rayon de soleil. Un très grand merci également à Thierry-man Lerouge, dont le soutien et l'amitié ont été vraiment précieux dans mon quotidien au laboratoire et particulièrement dans les moments de découragement. Je remercie enfin les membres passés de l'équipe Losson, Marielle Herzog, Mariam Chendeb et Johan Tisserand, pour avoir contribué à l'atmosphère conviviale du laboratoire. D'autre part, je garderai de très bons souvenirs de mes relations avec nos collègues de l'équipe Davidson : Igor, Gabrielle, Sylvia, Daniel, un grand merci à vous pour votre soutien et pour tous les bons moments passés ensemble. Je suis également reconnaissante envers mes deux camarades

de rédaction de thèse, Sara et Agathi, et envers Henri, pour l'ambiance d'amitié et d'entraide qu'ils ont su créer dans notre petit coin de bibliothèque, et qui m'ont rendu ces semaines de rédaction considérablement plus faciles.

Le travail réalisé au cours de ma thèse a pu bénéficier d'une grande richesse de points de vue, à travers de nombreuses collaborations. Le moment est donc venu de remercier le Pr. Manuel Mark pour sa disponibilité, ses conseils méthodologiques et son expertise en matière de spermatogenèse, ainsi que les membres de son équipe, en particulier Muriel, Christine et Olivia pour son enthousiasme et son énergie jamais prise en défaut. Un grand merci à Susan Chan pour ses conseils en immunologie, et à Claudine pour m'avoir initiée avec beaucoup de compétence à la pratique du Calibur. Mes remerciements vont également à Bernardo Reina-San-Martin pour ses conseils concernant nos phénotypes ainsi que pour sa superbe définition de l'activité de recherche : « se taper la tête contre un mur jusqu'à ce que le mur tombe », et à Beena et Isabelle pour leur gentillesse et leur expertise technique dans les expériences de CSR. Je suis aussi très reconnaissante envers Maria-Elena Torres-Padilla et toute son équipe, pour avoir apporté un autre éclairage sur mon travail. Enfin, tous mes remerciements à Florian Guillou pour l'intérêt porté à ma thématique, et ses conseils techniques concernant la purification des cellules de Sertoli.

Je tiens à remercier les membres des services communs de l'IGBMC pour la qualité de leur travail : merci à Isabelle et Bruno, du service d'histopathologie, pour les nombreuses coupes de testicules réalisées, ainsi qu'à tous les membres du service d'imagerie et le personnel de l'animalerie. En particulier, merci à Hafid d'avoir fourni le gîte et le couvert à mes souris durant ces trois ans, à William pour son inestimable expertise en « gynécologie murine », et à Sabine pour son sourire quotidien et sa gentillesse.

Mes plus vifs remerciements à mes amis pour leur soutien précieux au cours de ces années, qu'ils se trouvent à Strasbourg ou à 8000 km, et pour les bons moments passés ensemble qui m'ont permis de prendre du recul et de décompresser. Bien entendu, une place de choix revient dans ces remerciements à ma double cousine, Anne-Laure ; pour son soutien, pour tout ce que nous partageons depuis tant d'années et pour sa présence tout simplement irremplaçable : merci. Un grand merci également à Nicolas pour sa présence et son soutien lors de ces dernières semaines. Je tiens aussi à remercier ma famille, et en particulier ma sœur et mon beau-frère, pour leurs encouragements et leurs pensées, ainsi que les deux petits soleils qui illuminent nos réunions de famille.

Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents pour leur appui inébranlable au cours de ces années mouvementées. Leurs encouragements et leur confiance indéfectible ont réellement porté ce travail jusqu'à son achèvement. Qu'ils sachent que je leur suis profondément reconnaissante de l'amour et du soutien dont ils m'entourent ; en témoignage de ma gratitude, ce travail leur est dédié.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	7
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	10
INTRODUCTION.....	15
I. Mécanismes généraux de la transcription chez les eucaryotes	16
1. La machinerie transcriptionnelle de base.....	16
2. Les facteurs de transcription séquence-spécifiques.....	16
3. Les cofacteurs	17
II. Compaction chromatinienne et régulation de la transcription	18
1. La structure de la chromatine	18
a. Le nucléosome	18
b. Les histones de la particule cœur.....	19
c. Les histones de liaison	20
d. Les variants d'histones	20
i. Les variants de l'histone H3.....	21
ii. Les variants de l'histone H2A.....	21
iii. Les variants des histones H2B et H4.....	22
2. Les différents niveaux de compaction de la chromatine.....	22
III. Remodelage et modifications de la structure de la chromatine.....	23
1. Introduction à l'épigénétique	23
2. Les modifications de la chromatine	24
a. Les modifications des histones	24
i. Les différents types de modifications des histones	25
- L'acétylation des histones	26
- La méthylation des histones	26
ii. Interdépendance des modifications des histones.....	27
- Exemples de régulations en cis.....	27
- Exemples de régulations en trans	28
iii. Les enzymes de modification des histones.....	28
- Les histones acétyltransférases (HAT) et déacétylases (HDAC).....	29
- Les histones méthyltransférases (HMT) et déméthylases (HDM)	29
b. La méthylation de l'ADN	31
i. Les méthylases de l'ADN	33
ii. Les médiateurs de l'information	33
iii. Les rôles biologiques de la méthylation de l'ADN	34
c. Mécanistique de la dynamique chromatinienne	35
3. Le remodelage de la chromatine.....	37
IV. Chromatine et organisation nucléaire.....	38
1. Chromatine et positionnement nucléaire	38
a. Les territoires chromosomiques.....	38
b. Rôle de la périphérie nucléaire	40
c. Dynamique et régulation du positionnement nucléaire	42
2. La chromatine : différents domaines structuraux et fonctionnels.....	43
a. Caractéristiques de l'euchromatine et de l'hétérochromatine	44

b.	Hétérochromatine constitutive et facultative	45
i.	L'hétérochromatine constitutive	45
ii.	L'hétérochromatine facultative	45
c.	Frontières euchromatine/hétérochromatine	46
V.	La famille des protéines HP1	47
1.	Présentation.....	47
a.	L'extinction par effet de position	47
b.	Conservation et diversité des protéines HP1	48
2.	Organisation structurale	49
a.	Le chromodomaine.....	50
b.	La région charnière	51
c.	Le chromoshadowdomaine	51
3.	Localisation et dynamique sub-nucléaire des protéines HP1	52
4.	Fonctions moléculaires des protéines HP1	53
a.	Rôle des HP1 dans la formation de l'hétérochromatine	54
i.	Chez la levure.....	54
ii.	Chez les mammifères	55
b.	Implication des HP1 dans la fonction des centromères et télomères.....	56
i.	Au niveau des centromères	56
ii.	Au niveau des télomères	57
c.	Rôle des HP1 dans la réplication de l'ADN	57
d.	Rôle des HP1 dans la réparation de l'ADN	58
e.	Implication des HP1 dans la régulation transcriptionnelle	59
i.	Régulation négative de la transcription.....	59
ii.	Régulation positive de la transcription.....	59
5.	Fonctions physiologiques des protéines HP1	60
6.	Aspects pathologiques liés aux protéines HP1	61
VI.	La spermatogenèse chez la souris.....	61
1.	Anatomie de l'appareil génital mâle.....	62
a.	Organisation générale du système uro-génital.....	62
b.	Le testicule.....	62
2.	Les tubes séminifères.....	63
a.	Structure.....	63
b.	Déroulement de la spermatogenèse	64
i.	Phases de la spermatogenèse.....	64
ii.	Stades de l'épithélium séminifère	66
iii.	Initiation de la spermatogenèse	67
3.	La cellule de Sertoli	68
a.	Structure de la cellule de Sertoli chez la souris adulte	68
i.	Structure générale.....	68
ii.	Structure du noyau	69
b.	Fonctions de la cellule de Sertoli.....	70
i.	Mise en place de la barrière hémato-testiculaire.....	70
ii.	Activité de phagocytose	72
iii.	Activité de sécrétion.....	72
c.	Cycle de la cellule de Sertoli	73
d.	Développement de la cellule de Sertoli	73
i.	Prolifération des cellules de Sertoli.....	73
ii.	Etablissement du ratio cellules germinales/cellules de Sertoli	74

e.	Aspects pathologiques liés aux cellules de Sertoli	74
4.	Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique	75
5.	Mécanismes épigénétiques liés à la spermatogenèse.....	77
a.	Modifications de la chromatine dans les cellules germinales pré-méiotiques.	77
b.	Modifications de la chromatine dans les cellules germinales méiotiques	78
c.	Modifications de la chromatine dans les cellules germinales post-méiotiques	80
VII.	Présentation du projet de thèse	82
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	83
	RÉSULTATS	91
	<u>Partie I</u> : Etude des conséquences de l'inactivation de <i>Cbx3</i> sur le système immunitaire	92
I.	Inactivation ciblée du gène <i>Cbx3</i> chez la souris	93
1.	Cartographie du gène <i>Cbx3</i> et stratégie générale d'inactivation	93
2.	Génération des souris <i>Cbx3</i> ^{+/-}	94
II.	Etude de la viabilité, de la croissance et de l'anatomie des souris <i>Cbx3</i>^{-/-}	98
1.	Viabilité des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	98
2.	Croissance des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	99
3.	Nécropsie des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	100
III.	Implication d'HP1γ dans le système immunitaire	101
1.	Histologie splénique des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	101
2.	Rôle d'HP1γ dans l'hématopoïèse.....	103
a.	Notions générales d'hématopoïèse	103
i.	Organisation du système hématopoïétique.....	103
ii.	La maturation des lymphocytes B.....	104
iii.	La maturation des lymphocytes T	105
b.	Implication d'HP1γ dans l'hématopoïèse	106
i.	Analyse de souris <i>Cbx3</i> ^{-/-} adultes	106
ii.	Analyse d'embryons <i>Cbx3</i> ^{-/-} à E18,5	107
3.	Rôle d'HP1γ dans la recombinaison de classe.....	109
a.	Généralités sur la recombinaison de classe	109
b.	Rôle d'HP1γ dans la CSR.....	111
i.	Analyse des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	111
ii.	Analyse des souris <i>Cbx3</i> ^{LB/-}	113
-	Obtention des souris <i>Cbx3</i> ^{LB/-}	113
-	Analyse de la CSR chez les souris <i>Cbx3</i> ^{LB/-}	114
IV.	Discussion	115
1.	Rôle d'HP1γ dans la survie des souris.....	115
2.	Rôle d'HP1γ dans la croissance des souris.....	117
3.	Rôle d'HP1γ dans la migration splénique des lymphocytes Th	117
4.	Implication d'HP1γ dans la recombinaison de classe.....	118
	<u>Partie II</u> : Etude des conséquences de l'inactivation de <i>Cbx3</i> sur la spermatogenèse ...	120
I.	Rôle d'HP1γ dans la fertilité.....	121
II.	Analyse de la spermatogenèse chez les souris <i>Cbx3</i>^{-/-}	122
1.	Profil d'expression testiculaire et localisation sub-nucléaire d'HP1γ.....	122
2.	Analyse histologique des testicules de mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	123
a.	Etude à 6 semaines.....	123

b.	Etude à 7 mois	124
3.	Topologie sub-nucléaire des cellules testiculaires chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	126
4.	Etude de l'activité de phagocytose sertolienne chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	129
a.	La phagocytose sertolienne chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	129
b.	Etude de la corrélation phagocytose/phénotypes testiculaires.....	131
5.	Etude des cellules de Sertoli chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	132
a.	Analyse de la maturation des cellules de Sertoli	132
i.	Expression de marqueurs de maturation sertoliens	132
ii.	Etude de l'intégrité de la BHT chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	134
b.	Analyse de l'hétérochromatine sertolienne chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	135
i.	Etude de l'expression d'éléments répétés	135
ii.	Organisation sub-nucléaire de la chromatine sertolienne	136
iii.	Localisation sub-nucléaire de facteurs associés à l'hétérochromatine ..	137
-	Marquage d'HP1α	137
-	Marquage d'HP1β	138
-	Marquage de TIF1β	139
-	Marquage sertolien d'HP1α, HP1β et TIF1β chez les souris <i>Cbx5</i> ^{-/-} ..	139
III.	Analyse de la spermatogenèse chez les souris <i>Cbx3</i>^{CS/-}	140
1.	Obtention des souris <i>Cbx3</i> ^{CS/-}	140
2.	Etude de la topologie sub-nucléaire sertolienne chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{CS/-}	143
3.	Etude histologique des testicules des mâles <i>Cbx3</i> ^{CS/-}	143
4.	Etude de l'évènement lié à l'allèle L2 de <i>Cbx3</i> et influençant la spermatogenèse	145
a.	Analyse de l'expression d'HP1γ.....	145
b.	Analyse de l'expression des gènes situés à proximité de <i>Cbx3</i>	146
c.	Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de <i>Cbx3</i>	147
IV.	Discussion	150
1.	Implication d'HP1γ dans la spermatogenèse	150
2.	Implication possible d'HP1γ au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	151
3.	Implication d'HP1γ dans l'organisation sub-nucléaire des cellules de Sertoli.....	152
4.	Variabilité phénotypique des souris <i>Cbx3</i> ^{-/-}	153
5.	Perspectives pour l'identification de l'évènement induit par le ciblage de <i>Cbx3</i> ..	154
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	156
	ANNEXES.....	160
	BIBLIOGRAPHIE	164

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Les acteurs de l'initiation de la transcription	18
Figure 2 : La structure du nucléosome.....	19
Figure 3 : Les différents niveaux de compaction de la fibre chromatinienne	23
Figure 4 : Diversité des profils de modifications post-traductionnelles des histones.....	25
Figure 5 : Distribution des principales modifications d'histones le long des gènes et leurs effets sur la transcription.....	26
Figure 6 : Exemples sur l'histone H3 d'interdépendance en <i>cis</i> des modifications d'histones ..	27
Figure 7 : Exemples sur les histones H3 et H4 d'interdépendance en <i>trans</i> des modifications d'histones ..	28
Figure 8 : L'acétylation des résidus lysines neutralise leur charge positive et induit la décompaction de la chromatine	29
Figure 9 : La méthylation des arginines et les différents niveaux de méthylation des lysines.	30
Figure 10 : Les mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN réprime la transcription...	32
Figure 11 : Chaque modification d'histone peut être reconnue par un domaine protéique spécifique.	37
Figure 12 : Les quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine présentent des domaines spécifiques	38
Figure 13 : Les territoires chromosomiques	39
Figure 14 : Relocalisation du gène <i>Hox b1</i> hors du TC lors de la différenciation de cellules ES en présence d'acide rétinoïque	40
Figure 15 : Exemples de corrélations entre des changements d'association des gènes à la lamina nucléaire et des modifications de leur état transcriptionnel, durant la différenciation des cellules ES en astrocytes	41
Figure 16 : Différents domaines structuraux et fonctionnels de la chromatine	44
Figure 17 : Effet des supprimeurs et des enhanceurs de PEV sur la couleur de l'œil de drosophile.....	48
Figure 18 : Conservation et diversité des protéines HP1 à travers l'arbre phylogénétique	49
Figure 19 : Structure des protéines HP1 et de leurs domaines fonctionnels	50
Figure 20 : Les trois isoformes HP1 α , β et γ ont des localisations sub-nucléaires distinctes...	52
Figure 21 : Exemples de fonctions des protéines HP1	53
Figure 22 : Etablissement et propagation de l'hétérochromatine chez <i>S. pombe</i>	55
Figure 23 : Etablissement et propagation de l'hétérochromatine chez les mammifères	56
Figure 24 : Organisation de l'appareil uro-génital chez la souris mâle	62
Figure 25 : Structure du testicule	63
Figure 26 : Structure du tube séminifère.....	64
Figure 27 : Les phases de la spermatogenèse chez la souris et les types cellulaires qui leur sont associés	65
Figure 28 : Les stades de l'épithélium séminifère chez la souris	66
Figure 29 : Evolution chronologique de la première vague de spermatogenèse	68
Figure 30 : Structure d'une cellule de Sertoli de rat au stade V du cycle de l'épithélium séminifère	69
Figure 31 : Organisation nucléaire des cellules de Sertoli.....	69
Figure 32 : Organisation des cellules germinales de chaque côté de la barrière hémato-testiculaire	71

Figure 33 : Relations endocriniennes au sein de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique .	77
Figure 34 : Les principales modifications de la chromatine impliquées dans la spermatogenèse	81
Figure 35 : Stratégie générale d'inactivation du gène <i>Cbx3</i>	94
Figure 36 : Vecteur de ciblage utilisé pour l'inactivation du gène <i>Cbx3</i>	95
Figure 37 : Analyse par Southern blot des clones de cellules ES positifs pour la recombinaison homologue au locus <i>Cbx3</i>	96
Figure 38 : Représentation schématique des différentes étapes de modification des allèles du gène <i>Cbx3</i> au cours de la stratégie d'inactivation	97
Figure 39 : Analyse de l'efficacité de l'excision de l'allèle <i>L2</i> chez les souris <i>Cbx3^{+/-}</i> et <i>Cbx3^{-/-}</i>	97
Figure 40 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de <i>Cbx3</i>	98
Figure 41 : Analyse de la mortalité des souris WT, <i>Cbx3^{+/-}</i> et <i>Cbx3^{-/-}</i> au cours des premières semaines de vie.	99
Figure 42 : Evolution du poids des souris WT, <i>Cbx3^{+/-}</i> et <i>Cbx3^{-/-}</i> au cours du temps.	100
Figure 43 : Analyse du poids de la rate, d'un rein et d'un testicule chez les souris WT, <i>Cbx3^{+/-}</i> et <i>Cbx3^{-/-}</i>	101
Figure 44 : Analyse histologique de la rate chez des souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i>	102
Figure 45 : Les principaux types de cellules hématopoïétiques et leurs progéniteurs.....	103
Figure 46 : Les principaux stades de maturation des lymphocytes B et leurs marqueurs de surface associés	105
Figure 47 : Expression de CD4 et CD8 au cours des principaux stades de maturation des lymphocytes T.	106
Figure 48 : Analyse des cellules hématopoïétiques chez les souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i>	107
Figure 49 : Analyse des cellules hématopoïétiques chez des embryons WT, <i>Cbx3^{-/-}</i> non pâles et <i>Cbx3^{-/-}</i> pâles.....	108
Figure 50 : Le mécanisme de la CSR.	110
Figure 51 : Analyse de la production de cellules exprimant IgG1 chez des souris <i>Cbx3^{+/-}</i> et <i>Cbx3^{-/-}</i> adultes	111
Figure 52 : Analyse de la production de cellules exprimant différents isotypes d'IgG chez des souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i> de 4 semaines	112
Figure 53 : Analyse de l'efficacité et de la spécificité de l'excision de l'allèle <i>L2</i> chez les souris <i>Cbx3^{LB+/-}</i> et <i>Cbx3^{LB-/-}</i>	113
Figure 54 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de <i>Cbx3</i> dans les lymphocytes B matures.....	114
Figure 55 : Analyse de la production de cellules exprimant IgG1 chez des souris <i>Cbx3^{LB+/-}</i> et <i>Cbx3^{LB-/-}</i> adultes	114
Figure 56 : Analyse de la fertilité des femelles WT et <i>Cbx3^{-/-}</i>	121
Figure 57 : Analyse du profil d'expression d'HP1 γ dans le testicule WT	122
Figure 58 : La spermatogenèse est sévèrement affectée chez les souris <i>Cbx3^{-/-}</i>	123
Figure 59 : La spermatogenèse est retardée chez les mâles <i>Cbx3^{-/-}</i>	124
Figure 60 : Les mâles <i>Cbx3^{-/-}</i> de 7 mois présentent des perturbations de la spermatogenèse	126
Figure 61 : HP1 γ est impliquée dans l'organisation de l'hétérochromatine des cellules de Sertoli	127
Figure 62 : Marquage de la vimentine dans les testicules de souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i>	128
Figure 63 : Quantification des effets de l'inactivation de <i>Cbx3</i> sur l'organisation de l'hétérochromatine des cellules de Sertoli	128
Figure 64 : Coloration au bleu de toluidine de coupes de testicules de souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i>	129
Figure 65 : Analyse de la phagocytose sertolienne par coloration ORO sur des coupes de testicules de souris WT et <i>Cbx3^{-/-}</i> à 6 semaines.	130

Figure 66 : Expression de <i>Gas6</i> dans les cellules de Sertoli chez les mâles WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-}	131
Figure 67 : Absence de corrélation entre les tubes séminifères du type « nid d'abeilles » et les tubes vides ou montrant des cellules de Sertoli MS chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-} à 6 semaines	132
Figure 68 : Analyse de marqueurs de différenciation des cellules de Sertoli chez les souris WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-}	133
Figure 69 : Observation en microscopie électronique de l'intégrité de la barrière hémato- testiculaire chez des mâles WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-} à 6 semaines.....	134
Figure 70 : Comparaison de l'expression testiculaire de divers éléments répétés entre souris WT, <i>Cbx3</i> ^{+/-} et <i>Cbx3</i> ^{-/-} à 6 semaines	135
Figure 71 : Marquage de différentes modifications post-traductionnelles d'histones dans les cellules de Sertoli WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-}	136
Figure 72 : HP1 α est davantage enrichie au niveau de l'euchromatine des cellules de Sertoli chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-} que chez les mâles WT	137
Figure 73 : Localisation sub-nucléaire d'HP1 β dans les cellules de Sertoli des mâles WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-}	138
Figure 74 : TIF1 β est délocalisé de l'hétérochromatine dans 90% des cellules de Sertoli chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{-/-}	139
Figure 75 : HP1 α n'est pas indispensable à l'association d'HP1 β et TIF1 β à l'hétérochromatine dans les cellules de Sertoli	140
Figure 76 : Analyse de l'efficacité et de la spécificité de l'excision de l'allèle <i>L2</i> chez des souris <i>Cbx3</i> ^{CSL2/+} et <i>Cbx3</i> ^{CS-/-}	141
Figure 77 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de <i>Cbx3</i> dans les cellules de Sertoli	142
Figure 78 : Analyse par immunohistochimie de l'expression d'HP1 γ dans les cellules de Sertoli chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{CSL2/L2} , <i>Cbx3</i> ^{CS-/-} , WT et <i>Cbx3</i> ^{-/-} à 6 semaines	142
Figure 79 : Analyse de la topologie sub-nucléaire des cellules de Sertoli chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{CSL2/L2} et <i>Cbx3</i> ^{CS-/-} à 6 semaines	143
Figure 80 : Analyse histologique de la spermatogenèse chez les mâles <i>Cbx3</i> ^{CSL2/L2} et <i>Cbx3</i> ^{CS-/-}	144
Figure 81 : Analyse de l'expression d'HP1 γ dans les cellules de Sertoli des mâles WT, <i>Cbx3</i> ^{-/-} , <i>Cbx3</i> ^{CSL2/L2} et <i>Cbx3</i> ^{CS-/-}	146
Figure 82 : Analyse de l'expression des gènes situés à proximité de <i>Cbx3</i>	147
Figure 83 : Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de <i>Cbx3</i>	148
Figure 84 : Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de <i>Cbx3</i>	148
Figure 85 : Comparaison des séquences protéiques de la protéine HP1 γ entière et du variant présent chez les mâles <i>HP1</i> γ ^{-/-} et <i>AMH-Cre</i> ⁺ / <i>HP1</i> γ ^{L2/L2}	149

TABLEAU

Tableau 1 : Exemples de partenaires d'interaction des HP1.....	54
--	----

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

A

ABP : Androgen Binding Protein
Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase
AMH : Anti-Müllerian Hormone
APC : AlloPhycoCyanin
AR : Androgen Receptor
ATRx : Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked homolog

B

BCR : B Cell Receptor
BHT : Barrière Héмато-Testiculaire
BORIS : Brother Of the Regulator of Imprinted Sites
BRCA1 : BRest CAncer 1
BRG1 : Brahma-Related Gene 1
BSA : Bovine SerumAlbumin

C

CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1
CARM1 : Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1
CBP : CREB-Binding Protein
Cbx : Chromobox
CCR7 : C-C motif Receptor 7
CD : Chromo (CHRomatin Organisation MOdifer) domaine
CD4 : Classe de Différenciation 4
CENP-A : CENtromeric Protein A
CFSE : CarboxyFluorescein diacetate, Succinimidyl Ester
CG : Cellule Germinale
CH : Constant Heavy
CHD1 : Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1
ChIP-seq : Chromatin ImmunoPrecipitation and high-throughput sequencing
CK18 : CytoKeratin 18
Cldn11 : Claudin 11
CLP : Common Lymphoid Progenitor
CMP : Common Myeloid Progenitor
CMV : CytoMegalovirus

Col9a3 : Collagen, type IX, alpha 3
CS : Cellule de Sertoli
CSD : Chromoshadowdomaine
CSR : Class Switch Recombination
CTCF : CCCTC-binding Factor
CXCR : C-X-C motif Receptor
Cy : Cyanin

D

D : spermatocyte Diplotène
DDR : DNA Damage Response
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN : Double Negative
DNMT : DNA MethylTransferase
DNMT1o : DNA MethylTransferase, oocyte-specific
DNMT1p : DNA MethylTransferase, pachytene spermatocyte-specific
DP : Double Positive

E

E(var) : Enhancer de variégation
ES : Embryonic Stem

F

FACS : Fluorescence Assisted Cell Sorting
Fc : Fragment constant
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FLP : FLiPpase
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRT : Flippase Recognition Target
FSH : Follicle Stimulating Hormone
FSHR : FSH Receptor

G

GAPDH : GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
Gas6 : Growth Arrest-Specific 6
GDNF : Glial cell Derived Neurotrophic Factor
GFP : Green Fluorescent Protein

GNAT : Gcn5-N-AcetylTransferase-related
GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone
GTF : General Transcription Factor

H

H1t : H1 variant, testis-specific
H1T2 : H1 variant, Testis-specific 2
H2A.Bbd : H2A Barr body-deficient
H2BFWT : H2B Family member W Testis specific
H3.1t : H3.1 testis-specific
HAT : Histones AcétylTransférases
HDAC : Histones DéACétylases
HDM : Histones DéMéthylases
HILS1 : HIstone H1-Like Spermatid-specific
HMT : Histones MéthylTransférases
Hnrnpa2b1 : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2/b1
HOAP : HP1/ORC-Associated Protein
Hox : Homeobox
HP1 : Heterochromatin Protein 1
HPL : HP1-Like
HPRT : Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase 1

I

IAP : Intracisternal A-Particle
IFN- γ : InterFeroN γ
Ig : Immunoglobuline
IgM : Immunoglobuline Membranaire
IL-4 : InterLeukin 4
In : Intermédiaire
INCENP : INner CENtromere Protein
INO : INositol
ISWI : Imitation of SWItch

J

JBP1 : Janus kinase-Binding Protein-1
Jpp : Jours post-partum

L

L : spermatocyte Leptotène
LAP2 β : Lamina Associated Polypeptide 2 β
LB : Lymphocyte B
LCR : Locus Control Region
Le : cellule de Leydig

LH : Luteinizing Hormone
LHX3 : LIM HomeoboX 3
LINE : Long Interspersed Element
LoxP : Locus of chromosomal crossover in the bacteriophage P1
LPS : LipoPolySaccharide
LTR : Long Terminal Repeat

M

MBD : Methyl-CpG-Binding Domain
MBP : Methyl-Binding domain Proteins
MeCP2 : Methyl-CpG binding Protein 2
MEF : Murine Embryonic Fibroblasts
MEISETZ : MEiosis-Induced factor containing a PR/SET domain and Zinc-finger motif
MEL : Murine ErythroLeukemia
MEST : MEsoderm Specific Transcript
Mi : spermatocyte secondaire
MITR : MEF2-Interacting Transcription Repressor
MLL : Mixed Lineage Leukemia protein
MS : MultiSpots
MSCI : Meiotic Sex Chromosome Inactivation

N

Nfe2I3 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 3
NGS : Normal Goat Serum
NHEJ : Non Homologous End Joining
NK : Natural Killer
NKT : Natural Killer, T-cell type
NSD1 : Nuclear receptor binding SET Domain protein 1
NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylating

O

ORC : Origin Recognition Complex
ORO : Oil-Red-O

P

P : spermatocyte Pachytène
p53BP1 : p53 Binding Protein 1
PALS : PeriArteriolar Lymphoid Sheath
PBST : PBS-Triton
PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : PhycoErythrin
PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein
PEV : Position Effect Variegation
PHD : Plant HomeoDomain
PIC : Pre-Initiation Complex
PIM1 : Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus 1
PI : spermatocyte Préleptotène
PRM : PRotaMine
PRMT : Protein aRginine MethylTransferase

R

Rb : RetinoBlastoma
RDRC : RNA-Directed RNA polymerase Complex
RIPchip : RNA-ImmunoPrecipitation on microarrays
RITS : RNAi-induced Initiation of Transcriptional Silencing
RT-qPCR : Reverse Transcription and quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SA : Spermatide Allongée
SAGA : Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex
SAM : S-Adénosyl-Methionine
SCO : Sertoli Cell-Only
SCOS : Sertoli Cell-Only Syndrome
Se : cellule de Sertoli
SET : Su(var)3-9, Enhancer of zest, Trithorax
SETDB1 : SET Domain, Bifurcated 1
Sgo1 : Shugosine 1
SINE : Short Interspersed Element
siRNA : small-interfering RNA
Skap2 : Src kinase-associated phosphoprotein 2
Snx10 : Sorting nexin 10
SO : Sertoli-Only
SP : Single Positive
spH2B : human sperm specific H2B
SR : Spermatide Ronde
SRA : SET and RING finger-Associated

SSI : Severe Systemic Inflammation
Su(var) : Suppresseur de variégation
SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier
SUV39H1 : SUppressor of Variegation 3-9 Homolog 1
SWI/SNF : SWItching/Sucrose Non Fermenting
Syk : Spleen tyrosine kinase

T

TAF : TBP Associated Factor
Tc : T cytotoxic
TC : Territoire chromosomique
TCR : T Cell Receptor
Th : T helper
TIF : Transcription Intermediary Factor
TP : Transition Protein
Trsfm : Transferrin
TSA : TrichoStatin A
TSH2B : human Testis/Sperm specific H2B

V

V(D)J : Variable, Diversity, Joining

W

WDR5 : WD40 Repeat protein 5
WT : Wild-Type

X

Xi : chromosome X inactif
Xist : X-inactive specific transcript

Z

Z : spermatocyte Zygotène

Introduction

Introduction

I. Mécanismes généraux de la transcription chez les eucaryotes

Le développement d'un être vivant dépend de la différenciation de cellules souches totipotentes en tous les types cellulaires de l'organisme, qui ont des fonctions précises. Le bon déroulement de cette différenciation dépend de la coordination entre, d'une part, la répression des gènes de pluripotence, et d'autre part l'activation de gènes spécifiques d'un type cellulaire donné, ce qui permet l'acquisition de fonctions spécialisées. L'activation et la répression des gènes doivent ainsi être contrôlées de façon très fine pour permettre la mise en place de profils spécifiques d'expression des gènes, au bon endroit et au bon moment (pour revue, Meissner, 2010). L'une des étapes majeures de cette régulation est l'initiation de la transcription, qui fait intervenir la machinerie transcriptionnelle de base, des facteurs de transcription généraux mais aussi séquence-spécifiques, et des cofacteurs (Sikorski et Buratowski, 2009).

1. La machinerie transcriptionnelle de base

Tous les gènes de la cellule peuvent être exprimés à un niveau minimal grâce à la machinerie basale de transcription. Chez les eucaryotes, l'activité enzymatique de transcription est assurée par trois ARN polymérases : l'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN polymérase II transcrit les gènes codant pour les protéines et l'ARN polymérase III permet de produire les ARN de transfert ainsi que l'ARNr 5S et l'ARN U6 (Roeder, 2005). La spécificité de la transcription par l'ARN polymérase II dépend des facteurs généraux de la transcription ou GTF (*General Transcription Factor*) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH, qui reconnaissent des séquences particulières du promoteur et permettent de cibler l'activité de transcription vers ces régions précises. L'assemblage, au site d'initiation de la transcription, des facteurs généraux de la transcription et de l'ARN polymérase permet de former le complexe de préinitiation ou PIC (*Pre-Initiation Complex*) et de définir l'orientation de la transcription (Sikorski et Buratowski, 2009 ; Juven-Gershon et Kadonaga, 2010) (**figure 1**).

2. Les facteurs de transcription séquence-spécifiques

L'activité de transcription pour un gène donné peut être modulée grâce à l'intervention de facteurs de transcription séquence-spécifiques. Ces protéines se lient à différentes séquences d'ADN régulatrices plus ou moins proches du site d'initiation de la transcription,

dites « éléments régulateurs en cis » ou « éléments de réponse » (**figure 1**) ; la reconnaissance de ces séquences par les facteurs entraîne un effet positif ou négatif sur l'expression des gènes placés sous leur contrôle, par exemple en fonction du stade de développement ou du type cellulaire (Charoensawan et al., 2010 ; Davidson et Levine, 2008 ; Weake et Workman, 2010 ; Surjit et al., 2011).

3. Les cofacteurs

Encore appelés facteurs intermédiaires de transcription ou TIF (*Transcription Intermediary Factor*), il s'agit de complexes protéiques pouvant être formés de nombreuses sous-unités ayant ou non une activité enzymatique. Ils sont recrutés par les facteurs de transcription séquence-spécifiques et potentialisent leur action en régulant la transcription de façon positive ou négative, selon que le cofacteur est un coactivateur ou un corépresseur (Malik et Roeder, 2010 ; Perissi et al., 2010). Cette régulation peut s'effectuer à différents niveaux (**figure 1**) :

- en favorisant ou en inhibant la formation du PIC, ou bien en interagissant avec lui après l'incorporation de l'ARN polymérase II (Hampsey et Reinberg, 2003 ; Malik et Roeder, 2010)
- en agissant sur la modification et le remodelage de la chromatine (Malik et Roeder, 2010 ; Perissi et al., 2010)
- en formant des ponts entre des régions régulatrices très éloignées l'une de l'autre (Malik et Roeder, 2010)
- en associant certains gènes à des compartiments spécialisés du noyau, ce qui influence leur état transcriptionnel (Sproul et al., 2005).

Les modèles actuels d'action des TIF suggèrent que les échanges entre coactivateurs et corépresseurs sont très dynamiques et mettent en jeu des mécanismes fins d'interdépendance (Perissi et al., 2010).

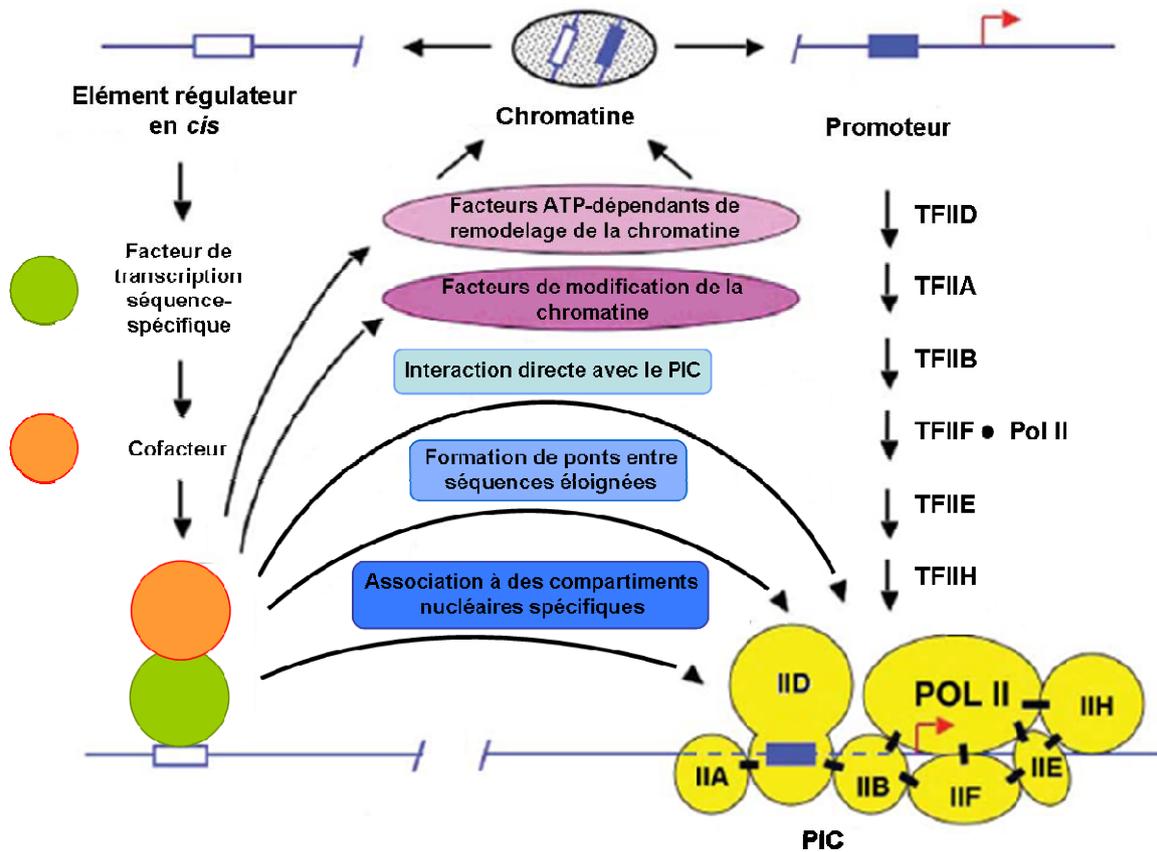


Figure 1 : Les acteurs de l'initiation de la transcription (adapté de Roeder, 2005).

II. Compaction chromatinienne et régulation de la transcription

Les génomes eucaryotes sont condensés en une structure nucléoprotéique très dense appelée chromatine, qui est composée d'ADN et de petites protéines basiques, les histones (Kornberg et Lorch, 1999). Ce mode de repliement très ordonné et hiérarchisé de l'ADN permet la compaction d'un génome de 3 milliards de pb (*paire de bases*), correspondant à une longueur d'environ 1,8 mètre, dans un noyau de cellule mesurant approximativement 6 μm de diamètre ; de plus, le degré de condensation de la chromatine influence directement l'accessibilité des régions où a lieu la transcription.

1. La structure de la chromatine

a. Le nucléosome

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, formé de 147 pb d'ADN enroulées en 1,65 tour autour d'une particule cœur et d'une séquence internucléosomale ou ADN « linker » reliant les unités entre elles (Davey et al., 2002 ; Zlatanova et al., 2009). La

particule cœur est un octamère d'histones, composé d'un tétramère (H3/H4)₂ entouré de deux hétérodimères H2A/H2B (Kornberg et Lorch, 1999) (**figure 2**). La stabilité du nucléosome est assurée par de nombreuses interactions de type électrostatique et hydrogène. Toutefois, certaines études structurales suggèrent que le nucléosome est une entité bien plus dynamique et versatile que ce que les modèles actuels laissent supposer (Zlatanova et al., 2009).

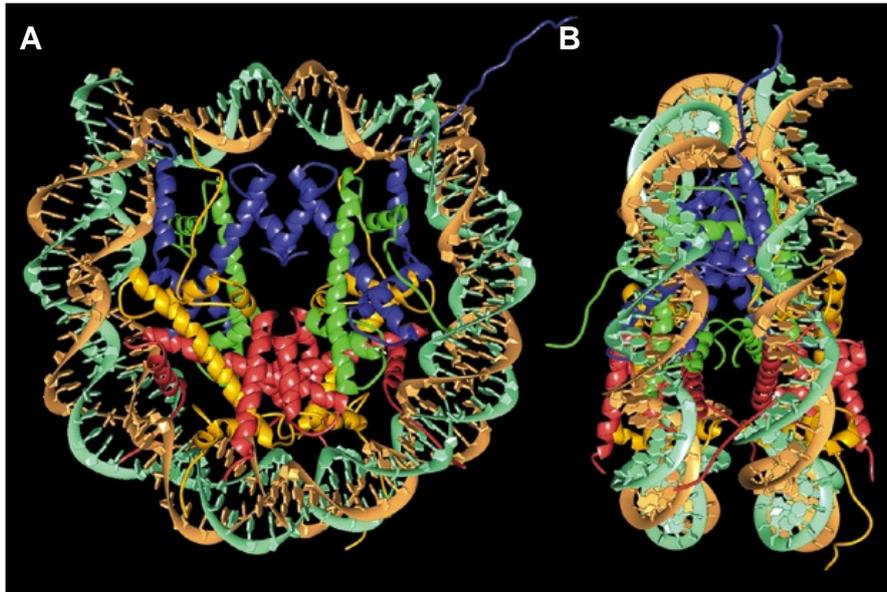


Figure 2 : La structure du nucléosome (adapté de Luger et al., 1997). La double hélice d'ADN (hélices brune et verte) est enroulée autour d'un octamère d'histones (jaune : H2A, rouge : H2B, bleu : H3, vert : H4).

A et B : vues parallèle et perpendiculaire à l'axe de la double hélice, respectivement.

b. Les histones de la particule cœur

Les histones dites « canoniques » H2A, H2B, H3 et H4, constituant le cœur du nucléosome, sont très conservées au cours de l'évolution et exprimées principalement durant la phase S du cycle cellulaire (Malik et Henikoff, 2003). Leurs extrémités N- et C-terminales, non structurées et saillant hors du nucléosome, encadrent un domaine central dit « histone-fold » organisé en trois hélices α reliées entre elles par des boucles flexibles, qui permet la dimérisation des histones (Campos et Reinberg, 2009). Les régions N- et C-terminales sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles influençant l'interaction des histones avec différents partenaires, ce qui a des conséquences importantes sur l'organisation de la chromatine et la régulation de la transcription (Kouzarides, 2007).

c. Les histones de liaison

En plus des quatre histones composant la particule centrale du nucléosome, un cinquième type d'histones dites de liaison ou « linker » est présent dans la plupart des noyaux ; elles comprennent un domaine central globulaire entouré d'une courte région N-terminale et une longue région C-terminale peu structurée. Ces histones, dont le prototype majeur est l'histone H1, sont associées à l'ADN « linker » et protègent le point d'entrée et de sortie du nucléosome de l'attaque de nucléases ; mais elles jouent également un rôle important dans l'espacement des unités nucléosomales et sont impliquées dans la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur (Happel et Doenecke, 2009 ; Woodcock et Ghosh, 2010).

Les histones de liaison sont peu conservées entre les espèces et présentent des profils d'expression spécifiques au cours du développement et de la différenciation cellulaire (pour revue, Godde et Ura, 2009). Par exemple, l'histone de liaison H1⁰ est exprimée au cours de l'embryogenèse précoce chez la souris (Fu et al., 2003), et l'histone de liaison H5 est exprimée dans les cellules engagées dans des programmes de différenciation terminaux, comme les cellules de la rétine ou du muscle strié (Godde et Ura, 2009). Des histones de liaison spécifiques des cellules germinales mâles, comme H1t et H1T2, ont également été caractérisées dans plusieurs espèces animales (Ausio, 2006).

d. Les variants d'histones

Dans la plupart des organismes, il existe aussi des histones « non canoniques » ou variants d'histones, qui contrairement aux histones canoniques sont synthétisés et assemblés en nucléosomes tout au long du cycle cellulaire (Jin et al., 2005). Alors que certains de ces variants sont présents chez presque tous les eucaryotes, d'autres sont spécifiques de certains organismes ; de plus, certains variants montrent une spécificité pour certains types cellulaires ou organes (pour revue, Talbert et Henikoff, 2010). Les variants d'histones présentent des différences de séquences par rapport aux histones canoniques, à l'origine de propriétés biochimiques particulières ; en effet, ils permettent d'établir et/ou de maintenir des structures chromatiniennes spécialisées qui affectent l'activité de transcription, dans des processus cellulaires aussi divers que la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, la recombinaison méiotique ou le développement précoce de l'embryon (pour revues, Campos et Reinberg, 2009 ; Banaszynski et al., 2010). Des variants ont été identifiés pour tous les types d'histones majeurs chez les mammifères, à l'exception de H4, et chacun présente une fonction spécifique.

i. Les variants de l'histone H3

Cinq isoformes de l'histone H3 sont présents chez les mammifères : les variants H3.1, H3.2, H3.3, H3.1t (*H3.1 testis-specific*), qui est exprimé spécifiquement dans les testicules, et CENP-A (*CENtromeric Protein A*) spécifique des centromères (Ahmad et Henikoff, 2002 ; Witt et al., 1996). Le variant H3.1 est enrichi en marques associées à l'activation de la transcription (acétylation de la lysine 14), mais aussi à sa répression (diméthylation de la lysine 9) (Hake et al., 2006). Le variant H3.3 est souvent présent au niveau des régions génomiques transcriptionnellement actives (Ahmad et Henikoff, 2002) et enrichi en marques d'activation transcriptionnelle (acétylation de la lysine 36 et diméthylation de la lysine 79) (Hake et al., 2006), alors que H3.2 semble impliqué dans la répression des gènes en étant méthylé au niveau de la lysine 27. Enfin, CENP-A est spécifiquement associé aux centromères et intervient dans la ségrégation mitotique et méiotique des chromosomes en participant à la formation du kinétochore (Blower et Karpen, 2001). Il a été montré chez la levure que le ciblage *de novo* de CENP-A au niveau d'un minichromosome comportant des séquences centromériques nécessite la présence de la protéine Swi6, l'homologue des protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Folco et al., 2008).

ii. Les variants de l'histone H2A

Les isoformes décrits pour l'histone H2A sont H2A.X, H2A.Z, macroH2A et H2A.Bbd (*H2A Barr body-deficient*) ; ils diffèrent de l'histone H2A essentiellement par leur région C-terminale. Le variant H2A.X, présent de la levure aux mammifères, est phosphorylé en réponse aux cassures d'ADN double brin (Rogakou et al., 1998) ; cette forme phosphorylée, appelée γ H2A.X (*H2A.X phospho*), permet le recrutement de protéines de réparation de l'ADN (Celeste et al., 2003). Le variant H2A.Z est associé, chez la levure, à l'activation transcriptionnelle en limitant la propagation de structures chromatiniennes répressives (Meneghini et al., 2003). Cependant, chez les mammifères, ce variant semble plutôt intervenir dans la répression de la transcription et dans la formation de structures chromatiniennes condensées de type hétérochromatine, en particulier *via* son interaction avec la protéine HP1 α (Fan et al., 2004 ; Rangasamy et al., 2004). MacroH2A est un variant de H2A spécifique des vertébrés, qui est associé à la répression transcriptionnelle ; en effet, il joue un rôle dans l'établissement et la maintenance de l'hétérochromatine et est enrichi au niveau du chromosome X inactif dans les cellules femelles de mammifères (Costanzi et Pehrson, 1998). Le variant H2A.Bbd semble avoir une fonction antagoniste à celle de macroH2A, car il est exclu du chromosome X inactif (Chadwick et Willard, 2001) ; de plus,

ce variant est impliqué dans l'activation de la transcription, et son incorporation au sein du nucléosome génère une structure chromatiniennne relâchée (Bao et al., 2004).

iii. Les variants des histones H2B et H4

Au moins trois isoformes existent pour l'histone H2B, les variants spH2B, TSH2B et H2BFWT ; mais leurs fonctions sont encore mal caractérisées (pour revue, Bernstein et Hake, 2006). Les variants spH2B (*human sperm specific H2B*) et TSH2B (*human Testis/Sperm specific H2B*) sont spécifiquement exprimés dans les cellules germinales des vertébrés mâles (Gineitis et al., 2000 ; Zalensky et al., 2002) ; il a été montré que spH2B est impliquée dans la condensation et l'empaquetage de la chromatine dans les spermatozoïdes. Le variant H2BFWT (*H2B Family member W Testis specific*) est également spécifique des testicules ; il est présent au niveau des télomères (Churikov et al., 2004) mais, contrairement à la forme principale de H2B, il n'intervient pas dans la condensation des chromosomes mitotiques (Boulard et al., 2006).

L'histone H4 ne semble pas avoir de variants chez les mammifères. Cependant, certains gènes de l'histone H4 sont transcrits indépendamment de la réplication et codent pour des protéines similaires en séquence à la forme principale de H4 (Akhmanova et al., 1996).

2. Les différents niveaux de compaction de la chromatine

La compaction de l'ADN en chromosomes est assurée par le repliement de la chromatine en structures de complexité croissante qui peuvent être hiérarchisées, selon une nomenclature équivalente à celle utilisée pour les protéines, en structures primaire, secondaire et tertiaire (Woodcock et Ghosh, 2010). Le niveau primaire correspond aux nucléosomes séparés par les portions d'ADN « linker » ; l'ensemble forme une fibre de 10 nm de diamètre qui a une apparence de « collier de perles » en microscopie électronique. Cependant cette conformation n'est pas la plus favorisée dans le contexte du noyau ; en effet, en présence de concentrations physiologiques de sels, les interactions inter-nucléosomes et ADN-nucléosomes entraînent la condensation de la fibre de 10 nm en une structure secondaire appelée « fibre de 30 nm » (Szerlong et Hansen, 2011). L'interaction sur de longues distances entre des régions de la chromatine condensées en fibre de 30 nm permet la formation de boucles de plusieurs centaines de kb, constituant une structure tertiaire très compacte de 100 à 300 nm de diamètre. La condensation extrême de ces boucles générera ensuite les chromosomes mitotiques (Cook, 1995) (**figure 3**).

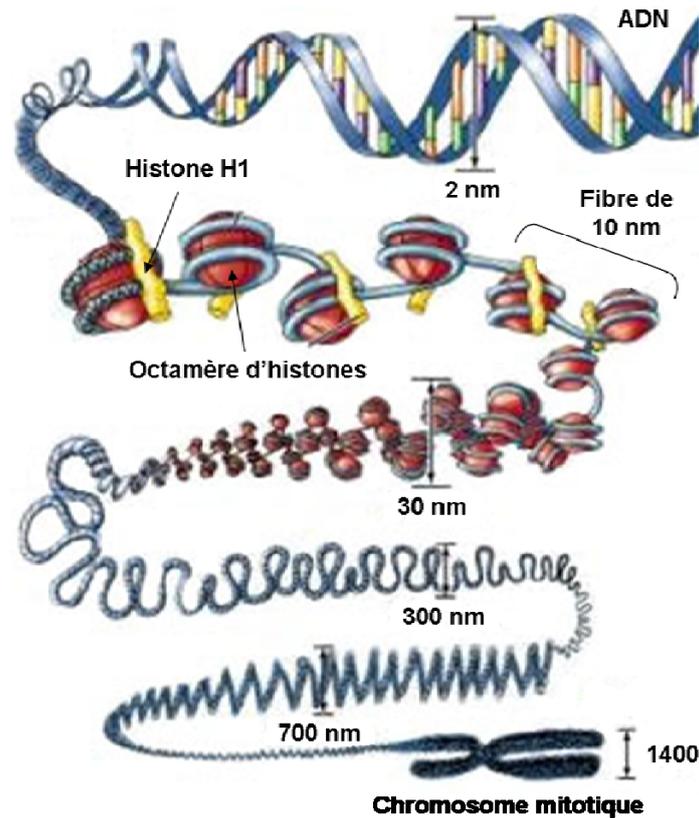


Figure 3 : Les différents niveaux de compaction de la fibre chromatinienne (adapté de www.institut-iai.ch).

Le plus souvent, la chromatine oscille entre une conformation ouverte de type « fibre de 10 nm » et une conformation compacte de type « fibre de 30 nm » ; les modifications post-traductionnelles des histones, les variants d'histones et certaines protéines architecturales jouent un rôle important dans la dynamique des superstructures chromatinienne (Li et Reinberg, 2011).

III. Remodelage et modifications de la structure de la chromatine

1. Introduction à l'épigénétique

Le degré de compaction de la chromatine peut être modulé *via* différents processus, dont la coordination résulte en un contrôle très fin de l'activité transcriptionnelle. Les mécanismes intervenant dans le remodelage de la chromatine, ainsi que dans son organisation sub-nucléaire, font donc partie d'un niveau de régulation indépendant de la séquence de l'ADN, appelé niveau « épigénétique ». De façon importante, les caractères résultant de la mise en œuvre de ces mécanismes peuvent être transmis à la descendance.

En effet, de plus en plus de travaux montrent que l'exposition, au cours de la grossesse, d'embryons à certains facteurs environnementaux peut engendrer des maladies hérissables à travers de multiples générations. Par exemple, l'application d'un régime isocalorique restreint en protéines à des rates gestantes augmente l'incidence de diabète chez les petits de la génération F₂, la génération F₁ étant celle de la descendance directe (Zambrano et al., 2005); et l'exposition de souris gestantes à un carcinogène, le benzapyrène, augmente le risque de tumeurs du poumon non seulement dans la génération F₁ mais aussi dans les générations F₂ à F₅ (Turusov et al., 1990). De tels effets peuvent s'expliquer par le fait que la période prénatale est un moment particulièrement critique où les cellules germinales acquièrent la majorité de leurs profils de méthylation au niveau de l'ADN; ainsi, la méthylation des cellules germinales fœtales peut être altérée par les conditions environnementales *via* la circulation sanguine de la mère. Une étude récente suggère que les anomalies de méthylation de l'ADN présentes dans des cellules germinales fœtales mises en culture peuvent persister dans les générations futures (Lee et al., 2008). De plus, certaines maladies affectant le développement, comme le syndrome de Beckwith-Wiedemann (pour revue, Maher et Reik, 2000), sont causées par une altération de l'état de méthylation de certains gènes au niveau des gamètes parentaux. Il a été montré que les techniques d'assistance à la reproduction sont associées à une augmentation significative du risque d'incidence de ce syndrome dans la descendance (pour revue, Gosden et al., 2003), qui pourrait être due aux conditions de culture *in vitro* entraînant une perte de méthylation de certaines régions soit dans l'oocyte, soit dans l'embryon (Khosla et al., 2001). De telles observations soulignent l'importance fondamentale de la compréhension des mécanismes épigénétiques qui sous-tendent la transmission du patrimoine génétique.

2. Les modifications de la chromatine

a. Les modifications des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones de la particule cœur constituent l'un des mécanismes majeurs à l'origine de la dynamique structurale de la chromatine, et ont des influences variées sur les processus nucléaires (Young et al., 2010). La plupart de ces modifications ciblent la région amino-terminale non structurée des histones, plus accessible car saillant hors du nucléosome (Campos et Reinberg, 2009). Ces modifications peuvent influencer la structure chromatinienne soit directement, soit en permettant le recrutement de complexes protéiques qui agiront sur cette structure.

i. Les différents types de modifications des histones

Neuf types de modifications covalentes ciblées sur des résidus spécifiques des histones ont été décrits :

- sur les résidus lysine : acétylation, méthylation, ubiquitination, SUMOylation et biotinylation
- sur les résidus arginine : méthylation, citrullination et ADP-ribosylation
- sur le résidu acide glutamique : ADP-ribosylation
- sur les résidus sérine et thréonine : phosphorylation
- sur les résidus proline : isomérisation *cis-trans* (pour revues, Kouzarides, 2007; Young et al., 2010).

Des approches récentes incluant la spectrométrie de masse ne cessent d'accroître l'identification de nouvelles modifications. Une même extrémité N-terminale d'histone peut ainsi être décorée de nombreuses modifications différentes ; d'autre part, certaines modifications sont en compétition les unes avec les autres, pour les résidus lysine et arginine en particulier (**figure 4**). Enfin, l'existence de plusieurs degrés de méthylation (addition d'un, deux ou trois groupements méthyles) contribue à la diversité des combinaisons et des réponses biologiques possibles.

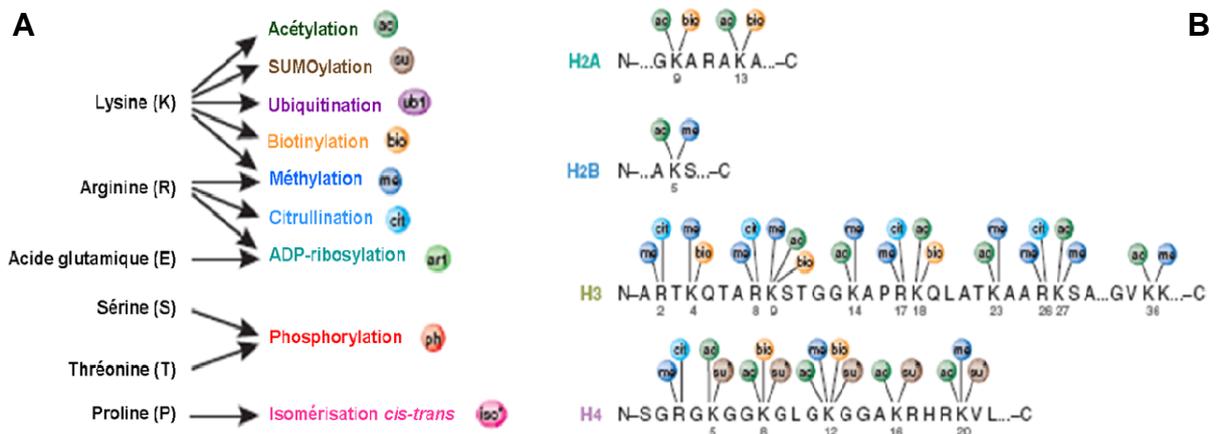


Figure 4 : Diversité des profils de modifications post-traductionnelles des histones (adapté de Latham et Dent, 2007). A : un même résidu peut être modifié de différentes manières. B : exemples de modifications ciblant les histones de la particule cœur du nucléosome.

L'acétylation et la méthylation sont les modifications post-traductionnelles des histones les mieux caractérisées.

- L'acétylation des histones

Cette modification neutralise la charge positive des résidus lysines et diminue ainsi l'affinité des histones pour l'ADN, chargé négativement ; la chromatine adopte alors une structure moins compacte qui facilite l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription (Wolffe et Pruss, 1996 ; Wade et al., 1997 ; Hong et al., 1993). En effet, l'acétylation des histones est généralement corrélée à l'activation transcriptionnelle ; en lien avec cette idée, des études à l'échelle du génome ont montré que les histones acétylées sont particulièrement enrichies au niveau des régions promotrices et des séquences codantes des gènes (Schübeler et al., 2004 ; Bernstein et al., 2005) (**figure 5**).

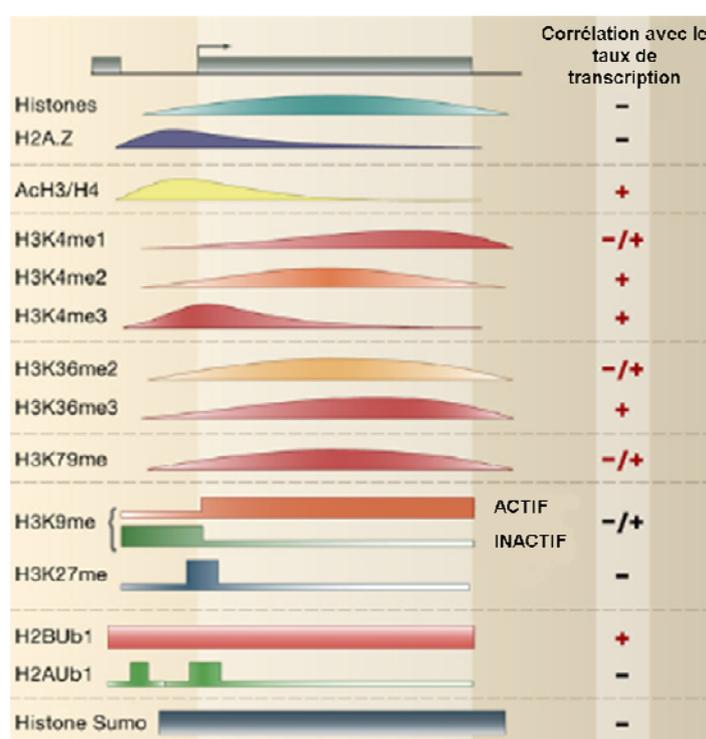


Figure 5 : Distribution des principales modifications d'histones le long des gènes et leurs effets sur la transcription (adapté de Li et al., 2007). Ac : acétylation, me : méthylation, Ub : ubiquitination, Sumo : SUMOylation.

- La méthylation des histones

La méthylation des résidus lysines ou arginines ne modifie pas leur charge positive, permettant le maintien des interactions entre ADN et histones. Le rôle de cette modification est plus complexe que celui de l'acétylation car elle peut être associée à la fois à une répression et à une activation de l'activité transcriptionnelle (pour revues, Jenuwein et Allis, 2001 ; Martin et Zhang, 2005) (**figure 5**). Ainsi, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine

9 et sur la lysine 27 favorise en général la formation d'une structure hétérochromatinienne inactive d'un point de vue transcriptionnel (Martin et Zhang, 2005) ; mais la marque H3K4 triméthylée a été observée au niveau du site d'initiation de la transcription de gènes activement transcrits (Pokholok et al., 2005).

ii. Interdépendance des modifications des histones

Plusieurs études ont montré que certaines modifications peuvent s'influencer mutuellement, qu'elles soient présentes sur la même histone (régulation en *cis*) ou sur des histones différentes (régulation en *trans*) (pour revues, Latham et Dent, 2007 ; Lee et al., 2010).

- Exemples de régulations en *cis*

De multiples cas d'interrégulations entre deux modifications d'une même histone ont été décrits (**figure 6**). Parmi les plus connus, citons l'exclusion mutuelle de l'acétylation et de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 ; ces marques sont associées respectivement à des états transcriptionnellement actifs et réprimés (Turner, 2005). L'antagonisme entre la triméthylation de la lysine 20 et l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 est un exemple d'interaction entre modifications présentes sur des résidus distincts de la même histone (Nishioka et al., 2002). Les modifications d'histones peuvent aussi s'influencer de manière positive : ainsi, la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 stimule l'acétylation de la lysine 14 de la même histone (Taverna et al., 2006). Une modification donnée peut également avoir simultanément un effet antagoniste sur deux autres marques : par exemple, la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 favorise l'acétylation de la lysine 14 au niveau de régions promotrices (Lo et al., 2000), mais inhibe la méthylation de la lysine 9 (Fischle et al., 2005), favorisant ainsi la transcription.

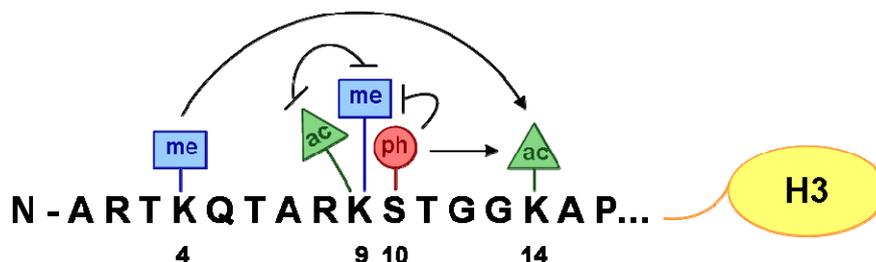


Figure 6 : Exemples sur l'histone H3 d'interdépendance en *cis* des modifications d'histones.

- Exemples de régulations en *trans*

Des exemples d'interdépendance entre des modifications situées sur des histones différentes, voire des nucléosomes différents, ont également été décrits (**figure 7**). Ainsi, la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 favorise l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16, ce qui déclenche une cascade d'évènements moléculaires activant l'élongation de la transcription (Zippo et al., 2009). D'autre part, la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 36 après le passage de l'ARN polymérase II entraîne la déacétylation des histones H3 et H4 (Lee et Shilatifard, 2007). Un lien fonctionnel a également été suggéré entre la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 et la méthylation de l'histone H4 sur la lysine 20, pour l'organisation d'une structure chromatinienne condensée (Sims et al., 2006).

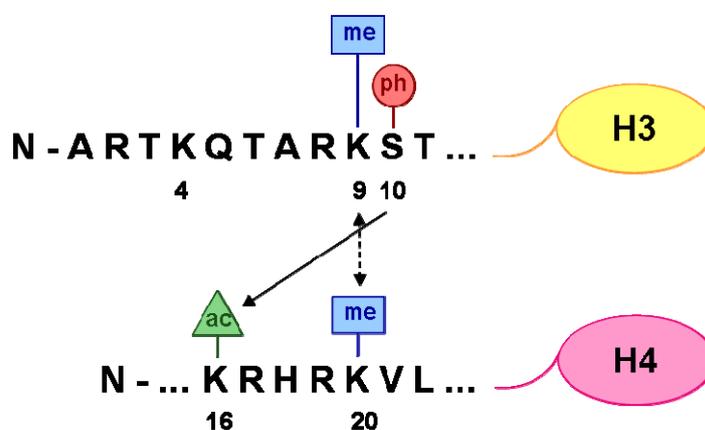


Figure 7 : Exemples sur les histones H3 et H4 d'interdépendance en *trans* des modifications d'histones.

iii. Les enzymes de modification des histones

Le profil de modifications des histones peut évoluer très rapidement, en fonction des signaux traduisant l'état physiologique de la cellule, pour réguler étroitement la compaction chromatinienne. Le dynamisme de ces marques repose sur l'action d'enzymes capables d'ajouter et d'enlever les groupements fonctionnels sur les résidus concernés avec une grande efficacité ; dans ce chapitre, une attention particulière sera portée aux enzymes pouvant fixer ou hydrolyser des groupements acétyles (HAT : *Histones AcétylTransférases* et HDAC : *Histones DéAcétylases*, respectivement) ou des groupements méthyles (HMT : *Histones MéthylTransférases* et HDM : *Histones DéMéthylases*, respectivement).

- Les histones acétyltransférases (HAT) et déacétylases (HDAC)

Les HAT catalysent le transfert d'un groupement acétyle ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), du cofacteur acétyl-CoA (*Acétyl-Coenzyme A*) vers le groupement ϵ -amine d'un résidu lysine spécifique (Roth et al., 2001) (**figure 8**).

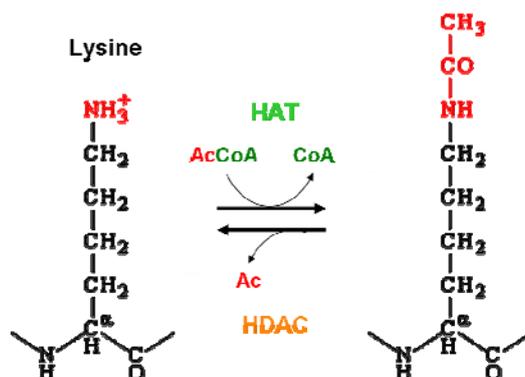


Figure 8 : L'acétylation des résidus lysines neutralise leur charge positive et induit la décompaction de la chromatine (adapté de Barnes, 2006). AcCoA : Acétyl-Coenzyme A.

Les membres de cette famille agissent d'une manière générale comme des coactivateurs globaux de la transcription et sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires, comme par exemple la réparation de l'ADN, la croissance cellulaire et l'apoptose (pour revue, Peserico et Simone, 2011).

L'acétylation des histones est contrebalancée par l'activité des HDAC, qui constituent une superfamille dont les membres favorisent la compaction de la chromatine et la répression transcriptionnelle. En plus de leurs fonctions au niveau des histones, certaines HDAC peuvent aussi contrôler l'état d'acétylation de nombreux facteurs de transcription et protéines cytoplasmiques (pour revues, Haberland et al., 2009 ; Witt et al., 2009).

- Les histones méthyltransférases (HMT) et déméthylases (HDM)

Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyle ($-\text{CH}_3$) à partir du cofacteur SAM (*S-Adénosyl-Méthionine* ou *AdoMet*) vers un résidu arginine, qui peut être mono- ou di-méthylé, ou un résidu lysine, qui peut être mono-, di- ou tri-méthylé (Smith et Denu, 2009) (**figure 9**).

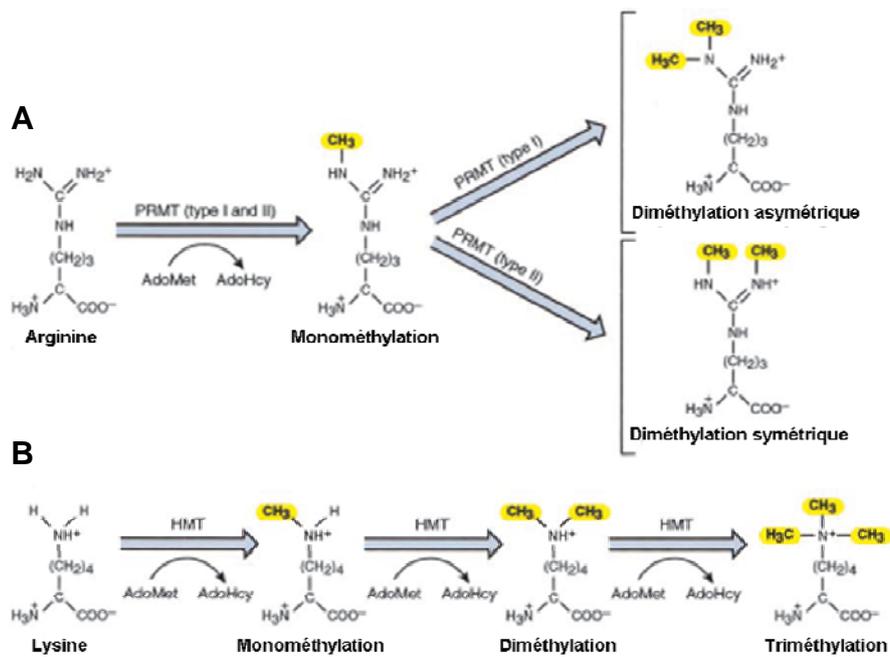


Figure 9 : La méthylation des arginines (A) et les différents niveaux de méthylation des lysines (B) (adapté de Zhang et Reinberg, 2001).

Les HMT ont souvent des spécificités de substrat bien déterminées et sont impliquées généralement dans la régulation positive ou négative de la transcription, et dans la réponse aux dommages de l'ADN (pour revues, Martin et Zhang, 2005 ; Teperino et al., 2010). Dans la plupart des HMT spécifiques des lysines, la fonction catalytique est assurée par un domaine baptisé SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer of zest*, *Trithorax*) ; les similarités de séquence à l'intérieur de ce domaine, mais aussi d'autres caractéristiques structurales, ont permis de regrouper ces enzymes en plusieurs familles. Parmi les mieux connues, citons les familles SET1, SET2 et SUV39 (pour revue, Völkel et Angrand, 2007).

La famille SET1 est définie par la présence d'un domaine SET carboxy-terminal, suivi par une région Post-SET contenant trois résidus cystéine essentiels pour l'activité méthyltransférase. Ces enzymes modifient spécifiquement l'histone H3 sur la lysine 4, favorisant ainsi l'état transcriptionnellement actif de la chromatine (Zhang et al., 2002).

Dans les protéines de la famille SET2, le domaine SET est central et entouré de deux régions participant à son activité : les régions Post-SET et AWS. Dans la plupart des cas, l'activité enzymatique des protéines de cette famille n'est pas restreinte à un seul résidu : par exemple, la méthyltransférase NSD1 (*Nuclear receptor binding SET Domain protein 1*) peut modifier l'histone H3 sur la lysine 36 et l'histone H4 sur la lysine 20 (Rayasam et al., 2003).

Les protéines de la famille SUV39, comme SUV39H1 (*SUppressor of Variegation 3-9 Homolog 1*) et SETDB1 (*SET Domain, Bifurcated 1*), méthylent l'histone H3 sur la lysine 9, ce qui crée des sites de liaison pour les protéines HP1 impliquées dans la formation de structures transcriptionnellement silencieuses (Rea et al., 2000 ; Schultz et al., 2002 ; Sripathy et al., 2006). Les protéines SUV39 comportent un domaine SET à leur extrémité C-terminale, entouré de deux régions pré- et post-SET nécessaires à la catalyse (Rea et al., 2000). Certaines protéines de cette famille possèdent également des domaines pouvant reconnaître d'autres modifications d'histones ; par exemple, le chromodomaine présent dans SUV39H1 peut s'associer aux lysines méthylées (Fischle et al., 2003).

Il existe également des méthyltransférases de lysines dans lesquelles la région catalytique est constituée uniquement par le domaine SET, comme SUV420H1 et 2 qui di- et triméthylent l'histone H4 sur la lysine 20 (Schotta et al., 2004).

La méthylation des arginines est assurée par les protéines PRMT (*Protein aRginine MethylTransferase*). Chez l'homme, sept enzymes capables de méthyler les histones ont été identifiées : PRMT1, PRMT4/CARM1 (*Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1*), PRMT5/JBP1 (*Janus kinase-Binding Protein-1*), PRMT6, PRMT7, PRMT8 et PRMT9 (pour revue, Pal et Sif, 2007). Ces HMT, qui ont des spécificités de substrat bien définies, ont été réparties en deux classes : la classe I catalyse la monométhylation et la diméthylation asymétrique des arginines, et la classe II est impliquée dans la monométhylation et la diméthylation symétrique des arginines (**figure 9**) (Gary et Clarke, 1998 ; McBride et Silver, 2001). Les PRMT interviennent dans l'activation ou la répression de la transcription, et sont également impliquées dans la différenciation, le développement, la réparation de l'ADN et la tumorigénèse (Pal et Sif, 2007).

A l'inverse de la déacétylation, qui consiste en la simple hydrolyse d'une liaison amide, la déméthylation des histones a longtemps été considérée comme impossible du fait de la nature très stable de la liaison C-N (Thomas et al., 1972). Mais la découverte des HDM a récemment permis de prouver la réversibilité de la méthylation (pour revues, Mosammaparast et Shi, 2010 ; Upadhyay et Cheng, 2011).

b. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN constitue un autre type de modification de la chromatine impliqué dans la modulation de sa structure. Chez les mammifères, la méthylation affecte presque exclusivement les cytosines situées en 5' d'une guanine ; ces dinucléotides CpG, sous-représentés dans le génome humain, sont souvent regroupés au niveau de régions

appelées « îlots CpG » (Bogdanovic et Veenstra, 2009). De tels îlots représentent environ 0,7% du génome humain et contiennent environ 7% des dinucléotides CpG (Fazzari et Greally, 2004) ; plus de la moitié d'entre eux se trouvent dans le voisinage des régions promotrices de gènes, qui incluent de nombreux gènes spécifiques de tissus donnés et des régulateurs du développement (pour revue, Deaton et Bird, 2011).

La méthylation de l'ADN est associée avec un état chromatinien répressif et une inhibition de l'expression des gènes. Trois grands mécanismes ont été envisagés pour expliquer ce phénomène : premièrement, la méthylation des cytosines peut bloquer l'association de certains activateurs de la transcription au niveau de séquences d'ADN spécifiques (Watt et Molloy, 1988). Deuxièmement, cette méthylation altère la rigidité de la double hélice d'ADN, ce qui peut modifier le positionnement des nucléosomes et module ainsi la liaison des facteurs de transcription et l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle (Segal et Widom, 2009). Troisièmement, la reconnaissance des CpG méthylés par des protéines comme celles de la famille des MBP (*Methyl-Binding domain Proteins*) permet le recrutement de complexes régulant négativement la transcription, à l'instar de ce que nous venons de voir pour les modifications des histones (Bogdanovic et Veenstra, 2009) (**figure 10**).

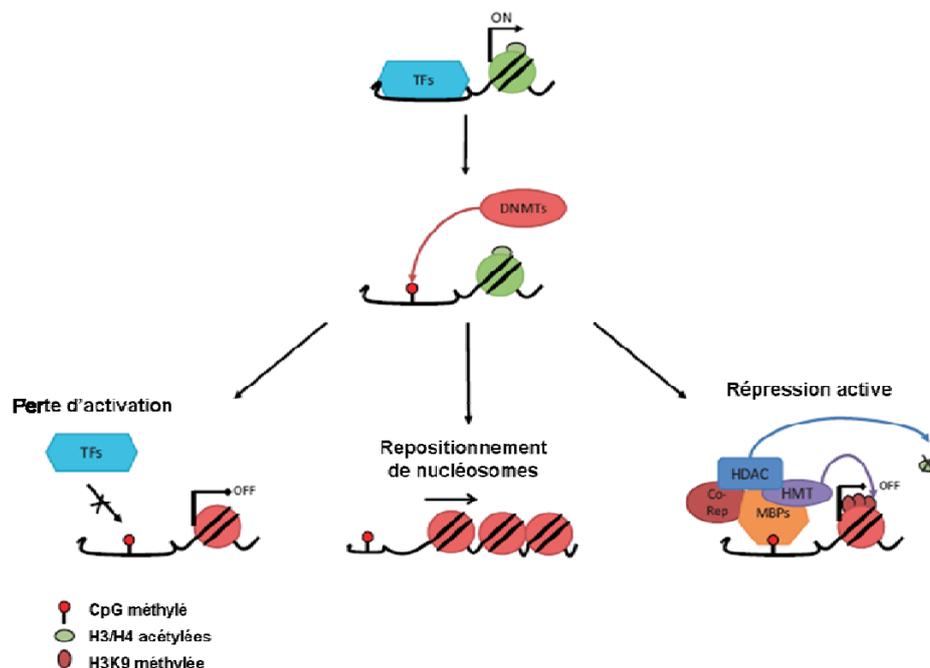


Figure 10 : Les mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN réprime la transcription (adapté de Joulie et al., 2010). TFs : facteurs de transcription, DNMTs : méthylases de l'ADN, HDAC : histone déacétylase, HMT : histone méthyltransférase, Co-Rep : complexe corépresseur, MBP : methyl-binding domain proteins.

i. Les méthylases de l'ADN

Les méthylases de l'ADN sont impliquées dans l'établissement de profils de méthylation déterminants pour des processus cellulaires variés, comme la prolifération et la différenciation cellulaires (Turek-Plewa et Jagodzinski, 2005). Elles peuvent être classées en deux grandes catégories (pour revue, Xu et al., 2010) : les méthylases de maintenance comme DNMT1 (*DNA Methyltransferase 1*) interviennent durant la réplication de l'ADN et copient les profils de méthylation pré-existants sur le nouveau brin d'ADN (Leonhardt et al., 1992), alors que les méthylases *de novo* telles que DNMT3a et DNMT3b sont principalement responsables de la méthylation de cytosines dans des sites CpG précédemment non méthylés (Okano et al., 1999) et coopèrent avec DNMT1 pour propager la méthylation au cours des divisions cellulaires (Liang et al., 2002).

D'autres méthylases de l'ADN ont été caractérisées ; la protéine DNMT2 qui montre une faible activité de méthylation *in vitro* (Hermann et al., 2003), et la protéine DNMT3L qui n'a pas d'activité catalytique mais peut moduler celle de DNMT3a et DNMT3b en s'associant physiquement avec ces protéines (Suetake et al., 2004). Par ailleurs, plusieurs isoformes des principales méthylases ont été identifiées ; elles pourraient être la conséquence d'épissage intrinsèque de l'ARN *in vivo* (Deng et Szyf, 1998). Au moins deux variants de DNMT1 sont produits durant la gamétogenèse de la souris : DNMT1o, spécifique des oocytes (Howell et al., 2001), et DNMT1p, spécifique des spermatocytes pachytènes et qui pourrait intervenir dans la régulation des profils de méthylation de l'ADN durant la spermatogenèse (Mertineit et al., 1998).

ii. Les médiateurs de l'information

Plusieurs protéines, appelées MBP (*Methyl-CpG-Binding Proteins*), sont capables d'interagir avec les dinucléotides CpG méthylés en mettant en jeu trois domaines différents en fonction de leur famille d'appartenance (pour revue, Joulie et al., 2010). Le mieux connu est le domaine MBD (*Methyl-CpG-Binding Domain*), que l'on retrouve dans les protéines MBD1 à 6 ainsi que dans MeCP2 ; cependant, dans le cas de MBD3, 5 et 6, le domaine MBD ne peut pas s'associer aux CpG méthylés chez les mammifères (Hendrich et Tweedie, 2003 ; Laget et al., 2010). Les deux autres domaines permettant la liaison de protéines à l'ADN méthylé sont les domaines SRA (*SET and RING finger-Associated*), présent dans UHRF1 et UHRF2 (Hashimoto et al., 2009), et un domaine en « doigts de zinc » trouvé dans ZBTB4, ZBTB33 (aussi appelée Kaiso) et ZBTB38 (Prokhortchouk et al., 2001 ; Filion et al., 2006).

Ces protéines peuvent interagir avec des enzymes responsables de l'établissement de marques répressives, comme des histones déacétylases et des histones méthyltransférases, ce qui fournit une base mécanistique à l'effet répressif des MBP sur la transcription (pour revue, Sasai et Defossez, 2009).

iii. Les rôles biologiques de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN assure une fonction primordiale de protection de la cellule contre des parasites intra-génomiques tels que les éléments transposables. Ces éléments, représentant 37% du génome chez la souris, sont condensés en une forme de chromatine transcriptionnellement silencieuse qui est significativement enrichie en dinucléotides CpG méthylés par rapport aux régions adjacentes (Deininger et al., 2003). La méthylation de l'ADN étant fortement corrélée à la répression transcriptionnelle chez les vertébrés, ce processus apparaît comme un mécanisme clé de la préservation de l'intégrité génomique (Zemach et Zilberman, 2010).

La méthylation de l'ADN intervient également dans une large variété de processus cellulaires et développementaux (pour revue, Li, 2002). Ainsi, le recrutement de DNMT3b *via* le répresseur transcriptionnel E2F6 permet de réprimer l'expression illégitime des gènes de la lignée germinale dans les cellules somatiques (Velasco et al., 2010). Par ailleurs, le profil de méthylation des gènes au cours du développement embryonnaire précoce est soumis à des variations bien particulières. Juste après la fécondation, tous les chromosomes subissent une vague de déméthylation qui supprime la plupart des marques de méthylation présentes sur les gènes venant du spermatozoïde et de l'ovule ; l'embryon établit ensuite son propre profil de méthylation de l'ADN juste avant la gastrulation, au cours d'une phase de méthylation *de novo*. L'ensemble de ces processus permet de déterminer les profils somatiques de méthylation des gènes (pour revue, Feng et al., 2010). La méthylation de l'ADN est également essentielle pour l'établissement de l'empreinte génomique parentale chez les mammifères ; ce phénomène concerne une centaine de gènes jouant des rôles clés dans la croissance embryonnaire et le développement. Ces gènes sont exprimés de façon mono-allélique uniquement à partir de l'allèle maternel ou paternel, et possèdent donc un allèle maintenu silencieux ; de façon intéressante, il a été montré que cette distinction entre allèles est due à une méthylation différentielle de l'ADN établie durant la gamétogenèse (pour revue, Kacem et Feil, 2009). Les fonctions essentielles des gènes soumis à l'empreinte parentale ainsi que leur expression monoallélique impliquent que les deux génomes parentaux sont nécessaires au développement de l'embryon.

La présence de dinucléotides CpG méthylés est également requise pour la spermatogénèse : l'inactivation du gène *Dnmt3a* chez la souris entraîne la présence de spermatocytes anormaux en prophase de la méiose et une diminution du nombre de spermatozoïdes matures, et l'inactivation de *Dnmt3l* provoque l'arrêt complet de la spermatogénèse juste avant la méiose (Bourc'his et al., 2001 ; Hata et al., 2002).

D'autre part, plusieurs études suggèrent que la méthylation de l'ADN est impliquée dans l'organisation fonctionnelle du noyau et la maintenance du positionnement chromosomique. Ainsi, l'architecture des domaines chromosomiques en interphase et le positionnement des gènes sont sévèrement altérés après une déméthylation globale de l'ADN (Santos et al., 2002). Des cellules souches embryonnaires dans lesquelles les deux copies du gène *Dnmt3b* ont été inactivées montrent de profondes altérations de l'organisation nucléaire (Gilbert et al., 2007). De plus, la réduction de 80% de la forme catalytiquement compétente de DNMT1 dans des cellules humaines résulte en une déméthylation massive qui conduit à une importante désorganisation nucléaire et une perte de viabilité cellulaire (Espada et Esteller, 2010).

c. Mécanistique de la dynamique chromatinienne

Pour expliquer les mécanismes permettant aux modifications des histones de moduler la compaction de la chromatine, deux hypothèses ont été envisagées : l'hypothèse électrostatique et celle du code des histones.

L'hypothèse électrostatique postule que les propriétés physicochimiques induites par les modifications des histones influencent la liaison des histones à l'ADN et le degré de condensation de la fibre chromatinienne, comme nous l'avons vu pour l'acétylation des histones. La décondensation de la chromatine peut également être induite par la phosphorylation des histones, qui entraîne l'ajout de charges négatives répulsives pour l'association des histones avec l'ADN (Roth et Allis, 1992).

D'autre part, de nombreuses études ont montré que des profils spécifiques de modifications post-traductionnelles d'histones corrélerent avec des fonctions biologiques précises (pour revue, Munshi et al., 2009). Ces observations ont conduit à l'idée d'un « code des histones » (Jenuwein et Allis, 2001), selon lequel les modifications des histones constituent des surfaces de reconnaissance pour des protéines effectrices, capables de moduler la structure chromatinienne pour assurer des réponses biologiques distinctes (Berger, 2007 ; Kouzarides, 2007). Les nombreuses observations d'interdépendance des modifications en *cis* et en *trans* sont en accord avec ce modèle, tout comme le fait que de nombreuses protéines

possèdent des domaines pouvant reconnaître des modifications spécifiques (pour revues, Taverna et al., 2007 ; Yap et Zhou, 2010) (**figure 11**).

Ainsi, le bromodomaine reconnaît les lysines acétylées ; présent chez de nombreux co-activateurs à activité histone acétyltransférase (HAT), tels que les protéines de la famille GNAT et de la famille CBP/p300 chez l'homme (Zeng et Zhou, 2002), il est souvent impliqué dans l'activation transcriptionnelle (Dhalluin et al., 1999). Toutefois, il est aussi retrouvé chez certains corépresseurs transcriptionnels (par exemple les co-répresseurs TIF1) et dans certaines histones méthyltransférases (HMT) telles que MLL (*Mixed Lineage Leukemia protein*) (Caldas et al., 1998).

Le domaine en doigt de zinc de type PHD (*Plant HomeoDomain*) s'associe notamment aux lysines méthylées. Ce domaine peut être impliqué aussi bien dans l'activation que dans la répression des gènes, en reconnaissant surtout la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 mais aussi les lysines 9 et 36 triméthylées de cette même histone (Taverna et al., 2007). Un doigt de zinc de type PHD dans une protéine est souvent adjacent à un bromodomaine, l'ensemble pouvant former une surface d'interaction pour d'autres facteurs (Yap et Zhou, 2010).

Le chromodomaine reconnaît la méthylation des lysines ; ainsi, celui des protéines HP1 et Polycomb peut s'associer aux lysines triméthylées 9 et 27, respectivement, de l'histone H3 (Nielsen et al., 2001a ; Bernstein et al., 2006). Le recrutement d'autres répresseurs agissant en synergie permet alors à ces protéines d'établir une structure chromatinienne compacte et transcriptionnellement répressive (pour revues, Grewal et Jia, 2007 ; Beisel et Paro, 2011). Par contre, la protéine activatrice CHD1 (*Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1*) du complexe SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex*) chez *S. cerevisiae* reconnaît la lysine 4 méthylée de l'histone H3 grâce à ses deux chromodomaines et est par conséquent associée à l'activation transcriptionnelle par la présence de ses deux chromodomaines (Pray-Grant et al, 2005).

Le domaine Tudor a une grande affinité pour les arginines et les lysines méthylées des histones (Kim et al., 2006) ; ainsi, le domaine Tudor de p53BP1 (*p53 Binding Protein 1*) s'associe à la lysine 79 méthylée de l'histone H3 chez les mammifères (Huyen et al., 2004), alors que celui de la déméthylase JMJD2A reconnaît les lysines méthylées 4 et 20 des histones H3 et H4, respectivement (Huang et al., 2006).

Les répétitions WD40 de l'activateur transcriptionnel WDR5 (*WD40 Repeat protein 5*) sont des motifs qui peuvent s'associer à l'arginine 2 et la lysine 4 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (Couture et al., 2006).

Le domaine 14-3-3 de la famille de protéines 14-3-3 reconnaît spécifiquement la sérine 10 phosphorylée de l'histone H3 (Macdonald et al., 2005). Cette association joue un rôle important dans la condensation des chromosomes ainsi qu'au cours de l'apoptose (Dougherty et Morrison, 2004 ; Seet et al., 2006).

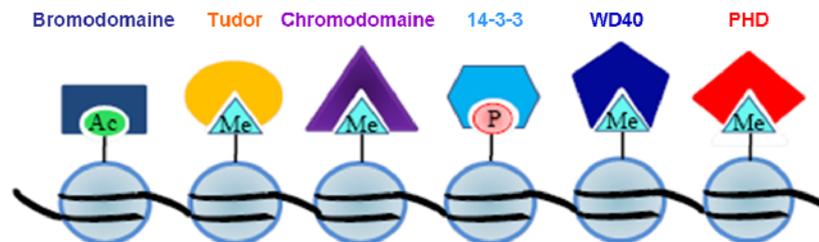


Figure 11 : Chaque modification d'histone peut être reconnue par un domaine protéique spécifique.

3. Le remodelage de la chromatine

Agissant en combinaison avec les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN, des complexes de remodelage de la structure chromatiniennne participent également à la régulation de la transcription. En effet, ils utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les contacts ADN/histones, ce qui leur permet de déplacer, insérer ou restructurer des nucléosomes et ainsi de moduler la compaction de la chromatine pour activer ou réprimer la transcription (pour revues, Cairns, 2005 ; Clapier et Cairns, 2009). Quatre familles principales de complexes de remodelage de la chromatine ont été caractérisées : les familles SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi2 et INO, qui sont conservées de la levure à l'homme (pour revue, Tsukiyama, 2002). Plusieurs propriétés leurs sont communes : l'affinité pour les nucléosomes et la présence d'un domaine ATPase ainsi que de domaines reconnaissant des modifications covalentes des histones. Ces familles se différencient par la présence de domaines et de sous-unités caractéristiques permettant leur spécialisation vis-à-vis de certains substrats ou processus biologiques (Flaus et al., 2006 ; pour revue, Cairns, 2005) (**figure 12**).

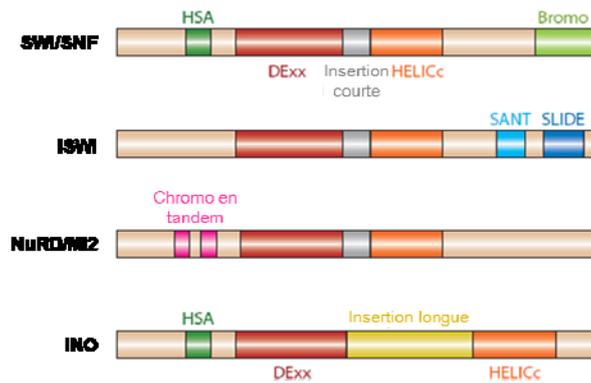


Figure 12 : Les quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine présentent des domaines spécifiques (adapté de Clapier et Cairns, 2009).

IV. Chromatine et organisation nucléaire

De plus en plus d'études indiquent que la régulation de l'expression génique ne doit pas s'envisager uniquement dans le contexte de séquences régulatrices et de modifications localisées de la structure chromatinienne, mais que l'agencement spatial des génomes dans le noyau ainsi que leur organisation en domaines fonctionnels constituent également un important niveau de régulation épigénétique.

1. Chromatine et positionnement nucléaire

a. Les territoires chromosomiques

Les modèles actuels de l'architecture du noyau des mammifères supposent que dans les cellules en interphase, chaque chromosome occupe un volume d'espace nucléaire défini appelé « territoire chromosomique » (TC) (pour revues, Cremer et al., 2006 ; Meaburn et Misteli, 2007). Ces territoires, qui sont séparés par des espaces interchromatiniens contenant de nombreux facteurs impliqués dans les grands processus nucléaires, peuvent être révélés à l'aide de sondes marquées par différents fluorochromes qui permettent de visualiser simultanément plusieurs chromosomes dans le noyau (pour revues, Cremer et al., 2006 ; Meaburn et Misteli, 2007) (**figure 13**).

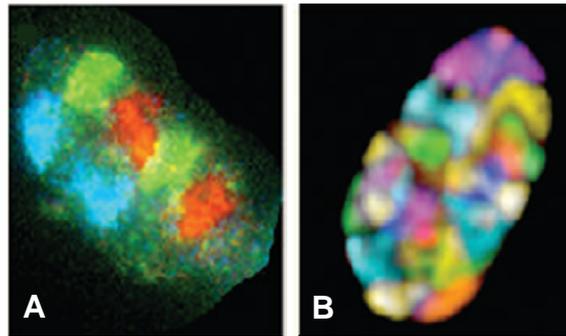


Figure 13 : Les territoires chromosomiques (adapté de Meaburn et Misteli, 2007). A : visualisation de plusieurs territoires chromosomiques à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques de chaque chromosome. B : les techniques d'imagerie modernes permettent de visualiser simultanément tous les chromosomes d'une cellule.

De façon remarquable, chaque TC occupe une position préférentielle dans l'espace nucléaire : certains chromosomes tendent à se trouver vers le centre du noyau et d'autres plutôt en périphérie. Différentes études ont établi des corrélations entre la position nucléaire des chromosomes et leur taille ou leur densité en gènes (Francastel et al., 2000 ; Boyle et al., 2001 ; Bolzer et al., 2005). Mais ces propriétés ne peuvent pas totalement expliquer le positionnement chromosomique étant donné que la localisation des TC change en fonction du type cellulaire et du tissu (Cremer et al., 2003 ; Parada et al., 2004).

De nombreux travaux ont également mis en évidence l'influence de la position nucléaire des TC et des gènes sur l'activité de transcription (Finlan et al., 2008). En particulier, les séquences non codantes et riches en paires de bases AT sont trouvées à l'intérieur du TC ou distribuées au hasard dans le territoire, alors que les gènes potentiellement actifs sont préférentiellement localisés à la périphérie, indépendamment de leur activité de transcription (Francastel et al., 2000 ; Spector, 2003 ; van Driel et Fransz, 2004). D'autre part, des gènes transcriptionnellement actifs peuvent être retrouvés au niveau de grandes boucles de chromatine saillant, hors du TC, dans l'espace interchromatinien constituant un environnement favorable à la transcription (**figure 14**) ; il s'agit surtout de régions intensément exprimées ou de loci dont l'activité est induite dans un contexte donné de différenciation ou de développement (pour revue, Heard et Bickmore, 2007).

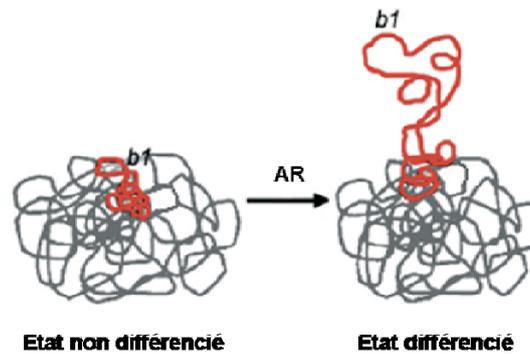


Figure 14 : Relocalisation du gène *Hox b1* (en rouge) hors du TC lors de la différenciation de cellules ES en présence d'acide rétinoïque (AR) (adapté de Cremer et al., 2006).

Cependant la corrélation entre transcription et localisation hors du TC n'est pas stricte ; par exemple, chez l'embryon mammifère en développement, l'activation du groupe de gènes *Hox* (*Homeobox*) *D* dans les membres en formation est accompagnée par une décondensation de la chromatine sans que ces gènes soient relocalisés hors du territoire (Chambeyron et al., 2005 ; Morey et al., 2007). Ainsi, le mouvement d'un locus vers l'extérieur du TC ne serait pas indispensable à son expression.

b. Rôle de la périphérie nucléaire

Les régions au voisinage de l'enveloppe nucléaire jouent également un rôle clé dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle. Cette enveloppe, qui permet d'isoler les chromosomes du cytoplasme, est composée de deux membranes : l'une externe, l'autre interne et associée à un réseau de filaments intermédiaires appelé lamina nucléaire, impliqué dans le contrôle de la structure chromatinienne et de l'architecture nucléaire. Une grande partie des régions transcriptionnellement silencieuses, comme les télomères et les centromères, sont en contact avec la lamina. Par ailleurs, des complexes macromoléculaires appelés pores nucléaires sont insérés dans l'enveloppe : ils interviennent dans les échanges entre noyau et cytoplasme mais ont aussi des fonctions importantes dans la régulation de la transcription (pour revues, Fedorova et Zink, 2008 ; Tsuchiya, 2008 ; Fiserova et Goldberg, 2010).

D'importants changements de position impliquant cette région du noyau ont été décrits pour certains loci, et corrélés avec une modification de leur état transcriptionnel (**figure 15**). Le mouvement de gènes des régions transcriptionnellement compétents vers des régions condensées et silencieuses de la périphérie nucléaire est en général associé à une répression des gènes ; ainsi, des études réalisées chez la drosophile ont montré que de nombreux gènes

réprimés interagissent avec la lamina (Pickersgill et al., 2006). A l'inverse, un déplacement vers le centre du noyau implique généralement une activation des gènes : par exemple, le locus *IgH* est de préférence associé à la périphérie nucléaire dans les progéniteurs de lymphocytes B où il est silencieux, mais lors de la différenciation des progéniteurs en précurseurs de lymphocytes B, sa relocalisation vers le centre du noyau coïncide avec son expression (Kosak et al., 2002). D'une façon similaire, le gène de la β -globine subit un mouvement des régions silencieuses vers les régions compétentes pour la transcription qui corrèle avec l'activation de son expression, lors de la différenciation de cellules MEL (*Murine ErythroLeukemia*) (Francastel et al., 2001). Enfin, les loci des corécepteurs CD4 et CD8 se repositionnent de la périphérie vers l'intérieur du noyau lorsqu'ils sont activés au cours de la différenciation des lymphocytes T (Ktistaki et al., 2010).

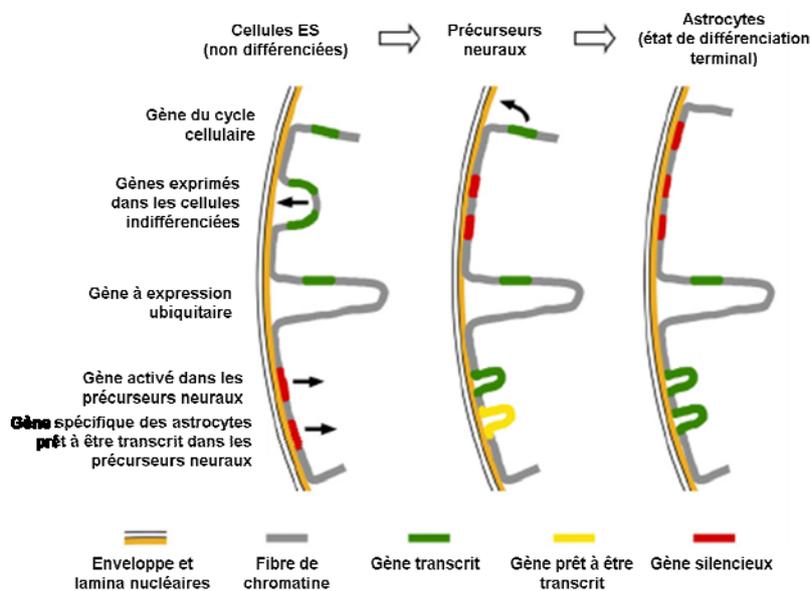


Figure 15 : Exemples de corrélations entre des changements d'association des gènes à la lamina nucléaire et des modifications de leur état transcriptionnel, durant la différenciation des cellules ES en astrocytes (adapté de Joffe et al., 2010).

Cependant, la répression lors de l'association à la périphérie nucléaire n'est pas systématique : chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes *GAL* et *INO1* sont repositionnés, au moment de leur activation, vers la périphérie où ils interagissent avec des composants des pores nucléaires qui établissent un environnement transcriptionnellement permissif (Brickner et Walter, 2004 ; Cabal et al., 2006). Ainsi, il existe des différences significatives, entre eucaryotes inférieurs et supérieurs, dans le rôle que joue la périphérie

nucléaire au niveau du contrôle de l'expression génique ; le potentiel de cette région est généralement répressif chez les métazoaires mais bivalent chez la levure. Une explication de cette différence pourrait être que la complexité du génome des mammifères restreint la mobilité de la chromatine, empêchant des réarrangements globaux qui seraient nécessaires pour associer les gènes avec l'enveloppe nucléaire durant l'activation transcriptionnelle (Lanctôt et al., 2007).

c. Dynamique et régulation du positionnement nucléaire

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la relocalisation des gènes vers certaines régions nucléaires ne sont que partiellement caractérisés. Plusieurs études sur le locus de la β -globine ont mis en évidence le rôle de certains facteurs de transcription et de leurs éléments régulateurs dans ce processus : le facteur de transcription CTCF (*CCCTC-binding Factor*), après fixation à sa séquence d'ADN cible, induit et stabilise la formation de boucles de chromatine transcriptionnellement actives (Splinter et al., 2006). De même, le facteur de transcription GATA-1 peut diriger à ce même locus la formation d'une boucle active excluant le gène de son TC, ce qui corrèle avec l'activation de sa transcription (Lee et al., 2011).

De récentes études indiquent également l'implication d'ARN non codants dans le ciblage sub-nucléaire des gènes. Par exemple, le chromosome X inactif (Xi) est associé à la région périnucléolaire au cours de la phase S du cycle cellulaire dans des fibroblastes embryonnaires murins ; la délétion de l'ARN *Xist*, qui intervient dans les premières étapes de l'inactivation, entraîne à la fois la perte de l'association nucléolaire et des perturbations de la structure hétérochromatinienne du chromosome Xi (Zhang et al., 2007). En lien avec ces observations, une autre étude a montré que l'ARN non codant *Kcnq1ot1* possède un domaine pouvant induire la répression d'un vecteur épisomique en le repositionnant au niveau de la région périnucléolaire (Mohammad et al., 2008).

Les modifications des histones interviennent aussi dans la dynamique nucléaire des gènes. En effet, l'acquisition des marques d'activation sur l'histone H3 telles que l'acétylation de la lysine 9 et la diméthylation de la lysine 4 favorisent la décondensation de la chromatine et la formation de boucles chromatinienne qui s'étendent à l'extérieur du TC (Chambeyron et Bickmore, 2004). D'autres études soulignent également l'implication de l'acétylation des histones dans le positionnement génique. En effet, dans les fibroblastes embryonnaires murins, un traitement par la TSA (*TrichoStatin A*), un inhibiteur d'histones déacétylases, entraîne la relocalisation des télomères près du centre du noyau (Uhlířová et al., 2010). D'autres travaux ont montré que le positionnement du chromosome Xi à la périphérie

nucléaire pourrait être favorisé par l'enrichissement en certaines marques comme la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 et sa diméthylation sur la lysine 9 (Bártová et al., 2001 ; Heard, 2005).

Plusieurs études ont suggéré l'implication des protéines de l'enveloppe nucléaire dans la régulation de la transcription : en effet, le récepteur de la lamine B ou le polypeptide LAP2 β (*Lamina Associated Polypeptide 2 β*) peuvent interagir avec des répresseurs de la transcription et/ou des modificateurs de la chromatine induisant la déacétylation des histones, mais aussi avec les protéines HP1 impliquées dans la formation de structures de type hétérochromatine (Vlcek et al., 2001 ; Holaska et Wilson, 2007 ; Shaklai et al., 2007). D'autre part, un traitement par la TSA provoque une dissociation de certains gènes de la périphérie nucléaire et leur repositionnement vers les complexes des pores nucléaires (Brown et al., 2008). Ces données suggèrent donc que les facteurs de transcription et les complexes modifiant les histones n'interviennent pas seulement dans la modulation locale de la structure chromatinienne, mais qu'ils régulent aussi le positionnement nucléaire des gènes et leur interaction avec des structures spécifiques de l'enveloppe nucléaire. Ainsi, des gènes réprimés par formation d'une structure chromatinienne silencieuse pourraient être relocalisés et maintenus en périphérie du noyau grâce à un réseau complexe d'interactions impliquant des composants de l'enveloppe nucléaire, les protéines HP1 et des complexes de modification des histones.

2. La chromatine : différents domaines structuraux et fonctionnels

Des observations cytologiques ont révélé que certaines régions des chromosomes demeurent condensées tout au long du cycle cellulaire. De telles régions ont été baptisées « hétérochromatine », par opposition aux régions d'« euchromatine » qui se décondensent lors du passage de la métaphase à l'interphase. De nombreuses études ont montré que les domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques (pour revues, Grewal et Jia, 2007 ; Fedorova et Zink, 2008) (**figure 16**).

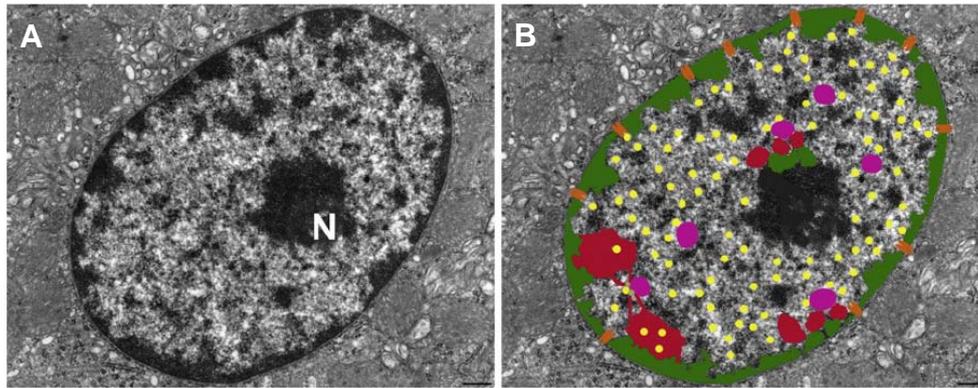


Figure 16 : Différents domaines structuraux et fonctionnels de la chromatine (adapté de Fedorova et Zink, 2008). A : Observation en microscopie électronique de deux états de la chromatine : euchromatine et hétérochromatine, N : nucléole. B : l'euchromatine et l'hétérochromatine ont des propriétés fonctionnelles distinctes, En vert : régions d'hétérochromatine, en orange : pores nucléaires, en rouge : régions riches en gènes, en jaune : zones de transcription active, en rose : centres d'épissage.

a. Caractéristiques de l'euchromatine et de l'hétérochromatine

L'euchromatine correspond à des régions de la chromatine qui sont riches en gènes et facilement accessibles à la machinerie transcriptionnelle ; peu condensées, elles sont transcriptionnellement compétentes et sont répliquées au début de la phase S du cycle cellulaire (Tamaru, 2010). D'un point de vue moléculaire, l'euchromatine est caractérisée par la présence d'histones H3 et H4 acétylées ainsi que de la marque H3K4 triméthylée, et contient peu de dinucléotides CpG méthylés.

De larges parties du génome sont également compactées en hétérochromatine, qui correspond à des régions très condensées présentant une faible densité en gènes codant pour des protéines ; généralement non transcrites, elles sont répliquées à la fin de la phase S (Tamaru, 2010). L'hétérochromatine présente un profil de modifications d'histones spécifique (Kouzarides, 2007) : hypoacétylation des histones H3 et H4, et présence des marques H3K9 et H4K20 triméthylées. Elle est aussi caractérisée par une forte méthylation de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG ; par ailleurs, plusieurs études ont démontré l'intervention directe de petits ARN non codants dans l'établissement et le maintien de structures hétérochromatiniennes chez la levure (Kanellopoulou et al., 2005 ; Grewal et Elgin, 2007). On peut distinguer deux types d'hétérochromatine, l'une dite « constitutive » en opposition à l'hétérochromatine dite « facultative » (Grewal et Jia, 2007).

b. Hétérochromatine constitutive et facultative

i. L'hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive est associée aux régions péricentromériques et télomériques des chromosomes, qui restent compactes quel que soit le tissu, la phase du cycle cellulaire ou le stade du développement (Maison et Almouzni, 2004). L'hétérochromatine péricentromérique contient une grande densité de séquences répétées d'ADN riches en nucléotides adénosine et thymidine, comme les séquences satellites. Ces séquences, appelées satellites majeurs chez la souris, sont composées d'éléments répétés de 234 pb et peuvent s'étendre sur des distances de 240 kilo pb (kb) jusqu'à 2000 kb (Plohl et al., 2008 ; Vissel et Choo, 1989). Les séquences péricentromériques incluent également de nombreux éléments transposables, qui pourraient contribuer aux propriétés structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine (Dimitri et al., 2009) ; la présence d'hétérochromatine au niveau de ces régions suggère qu'une des fonctions de cette structure très compacte pourrait être la défense des organismes contre des transpositions anarchiques, désastreuses pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Yoder et al., 1997). Par ailleurs, les régions d'hétérochromatine centromériques constituent le lieu d'assemblage du kinétochore, une structure essentielle pour la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (pour revue, Glynn et al., 2010). Plusieurs études, réalisées notamment chez la drosophile, ont également mis en évidence que l'hétérochromatine joue un rôle primordial dans d'importantes fonctions cellulaires et contient des gènes essentiels pour la viabilité et la fertilité (Fitzpatrick et al., 2005 ; Villasante et al., 2007).

Au niveau moléculaire, l'hétérochromatine constitutive présente des marques épigénétiques particulières : triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 et de l'histone H4 sur la lysine 20 et association des protéines de l'hétérochromatine HP1.

ii. L'hétérochromatine facultative

Il existe un deuxième type d'hétérochromatine, appelée facultative par analogie à l'hétérochromatine constitutive car il s'agit d'une structure transcriptionnellement inactive. Cette forme d'hétérochromatine est présente à des loci régulés au cours du développement et/ou selon le type cellulaire ; l'état de condensation de la chromatine au niveau de ces régions peut changer en réponse à des signaux cellulaires et à leur activité transcriptionnelle (Grewal et Jia, 2007). Ainsi, il a été montré que l'établissement de structures d'hétérochromatine facultative à certains loci joue un rôle important au cours de la différenciation cellulaire, car ces structures permettent, grâce à la mise en place de profils de gènes spécifiques, la perte de

totipotence et l'acquisition de fonctions spécialisées pour les cellules en voie de différenciation. La présence dans le génome de ces régions très condensées est donc fondamentale pour le développement de l'embryon (pour revue, Surani et al., 2007). Un exemple bien caractérisé d'hétérochromatine facultative est donné par le chromosome X : dans toutes les cellules des mammifères femelles, l'un des deux chromosomes X est inactivé de façon stable à un stade précoce du développement, par une condensation de la chromatine sur toute sa longueur ; cet état est maintenu tout au long de la vie de l'organisme. L'expression de la majorité des gènes présents sur ce chromosome est ainsi réprimée, ce qui permet de rétablir un niveau d'expression des gènes du chromosome X identique chez les mâles et les femelles (Heard et Disteché, 2006).

L'hétérochromatine facultative présente des modifications d'histones spécifiques : H3K9 diméthylée, H4K20 monométhylée et H3K27 triméthylée (Trojer et Reinberg, 2007) ; cette dernière marque est reconnue par les protéines de la famille Polycomb, qui jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'organisme en permettant le maintien de la structure hétérochromatinienne au cours des divisions cellulaires (Bernstein et al., 2006).

c. Frontières euchromatine/hétérochromatine

L'existence dans la cellule d'un mécanisme permettant de définir les limites des domaines d'euchromatine ou d'hétérochromatine a une importance primordiale pour le maintien des profils d'expression géniques. Certains éléments d'ADN, appelés insulateurs, sont le site de fixation de protéines capables de maintenir des frontières entre les régions d'euchromatine et d'hétérochromatine (pour revue, Gaszner et Felsenfeld, 2006). Certains insulateurs, dits « bloqueurs d'enhancers », sont situés entre un enhancer et un promoteur et peuvent bloquer la communication entre ces deux éléments ; ainsi, la protéine CTCF se lie à des sites spécifiques entre les gènes *Igf2* et *H19* humains et murins, ce qui entraîne la formation d'une boucle de chromatine empêchant la communication avec le promoteur du gène *Igf2* (Yoon et al., 2007 ; Kurukuti et al., 2006).

D'autres insulateurs protègent le promoteur de la propagation de structures hétérochromatiniennes voisines et sont appelés « insulateurs barrières ». De nombreuses études réalisées chez la levure et le poulet ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action des insulateurs barrières : ils permettent de stopper la réaction de polymérisation à l'origine de la diffusion de l'hétérochromatine par le recrutement direct ou indirect d'activités enzymatiques favorisant la formation d'euchromatine, et/ou par l'éviction de nucléosomes dans leur voisinage immédiat (pour revue, Dorman et al., 2007). Ces insulateurs pourraient

aussi induire le ciblage de la fibre de chromatine à un compartiment sub-nucléaire dont la composition est défavorable à la formation d'hétérochromatine, comme les pores nucléaires (Ishii et al., 2002). Chez la levure, la fonction d'élément barrière est assurée par certains promoteurs alors que chez les eucaryotes supérieurs, les insulateurs sont des éléments distincts, partageant certaines caractéristiques moléculaires avec les promoteurs, comme la liaison de certains facteurs de transcription. Ces observations ont mené à l'hypothèse selon laquelle les insulateurs auraient pu évoluer à partir de promoteurs liant des facteurs de transcription spécifiques (Raab et Kamakaka, 2010).

V. La famille des protéines HP1

Comme nous l'avons vu plus haut, les protéines de la famille HP1 sont l'un des constituants principaux de l'hétérochromatine. La protéine HP1 ou HP1A a initialement été identifiée chez la drosophile comme une protéine chromosomique non histone, associée notamment à l'hétérochromatine péricentromérique (James et Elgin, 1986) ; il a été établi par la suite que cette protéine est également un facteur essentiel de l'extinction par effet de position (Eissenberg et al., 1990).

1. Présentation

a. L'extinction par effet de position

Ce phénomène, décrit pour la première fois par Muller en 1930, a été identifié au cours d'expériences sur la drosophile montrant que dans des mutants obtenus par irradiations aux rayons X, l'expression du gène *white*, responsable de la couleur des yeux, variait de cellule à cellule en raison d'une translocation chromosomique stochastique. Ces variations restaient stables pour une même cellule au cours des divisions successives, résultant en la présence de taches rouges et blanches dans l'œil de l'insecte adulte (**figure 17**). Ces travaux, ainsi que de nombreux autres, ont permis de définir le phénomène d'extinction par effet de position ou PEV (*Position Effect Variegation*), au cours duquel des gènes euchromatiniens sont repositionnés dans ou à proximité de l'hétérochromatine suite à des insertions ou translocations chromosomiques, ce qui entraîne leur répression (pour revue, Wallrath, 1998). Il a été suggéré que l'état hétérochromatinien se diffuse en *cis* au-delà du point de contact avec le gène euchromatinien et impose une conformation qui empêche l'accès de la machinerie de transcription à l'ADN et aboutit à la répression transcriptionnelle. Toutefois, des interactions en

trans entre différentes régions d'hétérochromatine ainsi que l'organisation tridimensionnelle des chromosomes pourraient également être importantes pour la PEV (Wakimoto, 1998).

Dans le but de mieux comprendre ce phénomène, des études génétiques ont permis d'identifier des dizaines de facteurs influençant la PEV, dont la plupart sont des composants intervenant dans l'établissement de l'hétérochromatine ou dans la partition du génome en domaines actifs ou réprimés. Ces modificateurs ont été classés en deux catégories : les supprimeurs de PEV ou facteurs Su(var), dont l'inactivation des gènes annule les effets de la PEV et favorise donc l'expression des gènes euchromatiniens, et les « enhanceurs » de PEV ou facteurs E(var), dont l'inactivation des gènes entraîne les conséquences inverses (pour revues, Wakimoto, 1998 ; Wallrath, 1998) (**figure 17**). La protéine HP1 a été identifiée comme un suppresseur de PEV : en effet, la mutation du gène codant pour HP1A chez la drosophile, *Su(var)2-5*, entraîne une augmentation de l'expression des gènes euchromatiniens placés dans un contexte hétérochromatinien (Eissenberg et al., 1990).

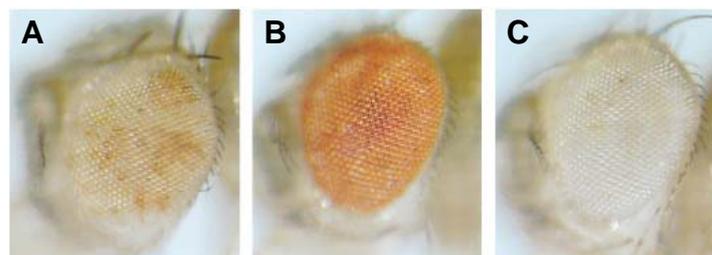


Figure 17 : Effet des supprimeurs et des enhanceurs de PEV sur la couleur de l'œil de drosophile (adapté de Cléard et al., 1997). A : contrôle, B : suppresseur de PEV, C : « enhancer » de PEV.

L'existence de la PEV a aussi été démontrée chez les mammifères, et la plupart des modificateurs de PEV identifiés chez la drosophile sont également conservés chez les mammifères : par exemple, la surexpression d'un orthologue d'HP1 dans des cellules de souris entraîne une augmentation de la répression de transgènes intégrés dans l'hétérochromatine péricentromérique (Festenstein et al., 1999).

b. Conservation et diversité des protéines HP1

Quatre paralogues d'HP1A ont été mis en évidence, HP1B à E ; de plus, il existe au moins cinq autres gènes d'HP1 qui sont spécifiques de certaines souches de drosophiles, comme HP1F et G trouvées uniquement chez *D. pseudoobscura* et *D. willistoni* (Vermaak et Malik, 2009). Cette protéine a également de nombreux orthologues, présents dans l'arbre phylogénétique de la levure (*S. pombe*) aux mammifères, mais absents chez *S. cerevisiae*

(Lomberk et al., 2006) (**figure 18**). Il existe chez les mammifères trois isoformes d'HP1 : HP1 α , HP1 β (MOD1, M31) et HP1 γ (MOD2, M32), qui partagent environ 65% de résidus identiques (Vermaak et al., 2005). Mais si les protéines HP1 de différents eucaryotes sont clairement reliées d'un point de vue évolutif, elles n'ont pas nécessairement les mêmes profils de localisation ni les mêmes fonctions ; ainsi, elles forment une famille de protéines montrant à la fois une forte conservation phylogénétique et une grande diversité biologique.

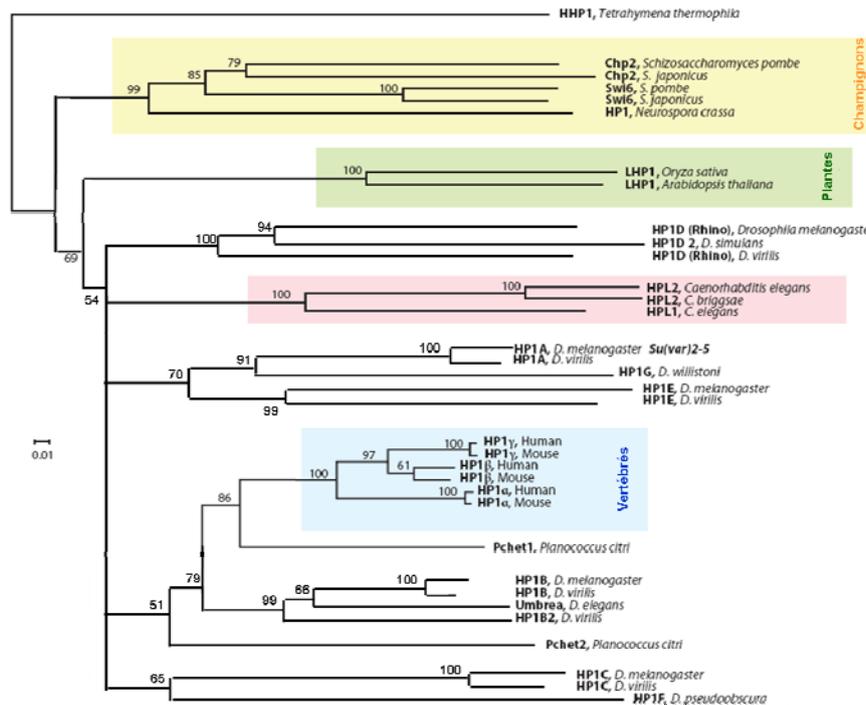


Figure 18 : Conservation et diversité des protéines HP1 à travers l'arbre phylogénétique (adapté de Vermaak et Malik, 2009).

2. Organisation structurale

Les HP1 sont des protéines de petite taille (autour de 25 kDa) présentant une organisation structurale bipartite, avec un chromodomaine (CD) (*CHR*omatine *OR*ganisation *MO*difier) amino-terminal et un chromoshadowdomaine (CSD) carboxy-terminal, qui sont très conservés entre les différentes HP1. Ces domaines sont reliés par une région centrale charnière ou « linker » faiblement conservée (pour revue, Lomberk et al., 2006) (**figure 19**).

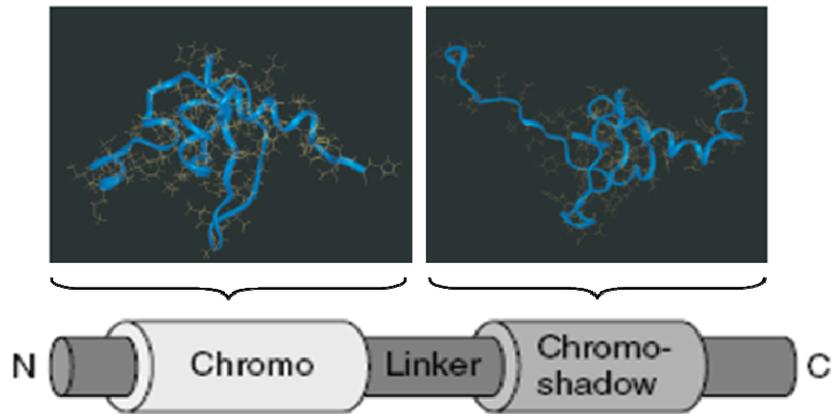


Figure 19 : Structure des protéines HP1 et de leurs domaines fonctionnels (adapté de Lomberk et al., 2006).

a. Le chromodomaine

Ce domaine globulaire est composé d'un feuillet β de trois brins antiparallèles, replié contre une hélice α carboxy-terminale (**figure 19**). Des acides aminés aromatiques forment une poche hydrophobe sur l'un des côtés du feuillet ; ils permettent au CD de se lier, avec une grande spécificité mais une faible affinité, au résidu K9 di- ou triméthylé de l'histone H3, caractéristique des régions d'hétérochromatine péricentromériques (Ball et al., 1997 ; Jacobs et Khorasanizadeh, 2002). Une étude récente a montré que l'affinité d'HP1 α pour ce résidu modifié est augmentée par de multiples phosphorylations sur les résidus S11 à S14 de son extrémité N-terminale (Hiragami-Hamada et al., 2011). Par ailleurs, la reconnaissance *in vitro* de H3K9 triméthylée par Swi6, l'homologue d'HP1 chez *S. pombe*, dépend de la dimérisation des CD ; de plus, l'interaction des CD avec le résidu K9 triméthylé de l'histone H3 entraîne la tétramérisation de Swi6 et génère donc deux CD libres, capables de se lier à des nucléosomes méthylés voisins. Ainsi, la reconnaissance des nucléosomes méthylés et la diffusion des HP1 sur la chromatine semblent couplées (Canzio et al., 2011). Mais la reconnaissance de ce résidu lysine modifié ne constitue pas le seul point d'ancrage des HP1 sur la chromatine ; en effet, il a été montré que le CD peut également se lier au domaine globulaire d'histones H3 dont l'extrémité N-terminale a été éliminée par digestion enzymatique (Nielsen et al., 2001a). Le chromodomaine est présent dans de nombreuses protéines intervenant dans l'organisation de la structure chromatinienne et la régulation de la transcription, comme l'histone méthyltransférase SUV39H1 et les protéines du groupe Polycomb qui répriment l'expression génique (pour revue, Yap et Zhou, 2011).

b. La région charnière

Le domaine central dit « charnière » contient les séquences d'acides aminés les plus variables entre les protéines HP1, qu'elles soient paralogues ou orthologues. Le modèle de structure proposé pour ce domaine indique qu'il est flexible et exposé à la surface (Singh et Georgatos, 2002). La région charnière permet l'interaction des HP1 avec les acides nucléiques ; par exemple, elle peut dans le cas d'HP1 α et HP1 β s'associer avec des ARN (Muchardt et al., 2002 ; Santenard et al., 2010 ; Maison et al., 2011), et se lier à l'ADN et à la chromatine sans spécificité de séquence (Meehan et al., 2003). Cette région est également sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles : des phosphorylations, qui peuvent affecter la localisation, l'interaction et la fonction des protéines HP1 (LeRoy et al., 2009), mais aussi de la SUMOylation, qui est critique pour le ciblage d'HP1 α au niveau des domaines péricentromériques (Maison et al., 2011). Ce domaine semble donc avoir d'importantes fonctions dans la régulation des protéines HP1.

c. Le chromoshadowdomaine

Le chromoshadowdomaine est un motif d'interaction protéine-protéine impliqué dans l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des protéines HP1 (Nielsen et al., 2001a) ainsi que dans l'interaction avec d'autres protéines associées à la chromatine ; mais il peut également s'associer avec le domaine globulaire de l'histone H3 et, par compétition avec la liaison de SWI/SNF, permettre aux HP1 de bloquer la relaxation de la structure chromatinienne induite par ce complexe (Lavigne et al., 2009). La structure globale du CSD est très similaire à celle du CD : une conformation globulaire constituée de trois brins β qui forment un feuillet antiparallèle, mais comportant deux hélices α carboxy-terminales au lieu d'une pour le CD (Cowieson et al., 2000) (**figure 19**). La dimérisation de deux protéines HP1 *via* la deuxième hélice entraîne la formation d'un sillon non polaire, avec lequel peuvent interagir des protéines contenant un motif PXVXL (Thiru et al., 2004 ; Haldar et al., 2011). Ce motif PXVXL est retrouvé dans un grand nombre de régulateurs transcriptionnels et d'effecteurs chromatiniens pouvant s'associer avec les HP1, tels que les facteurs intermédiaires de transcription TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ (Nielsen et al., 1999) ou les méthyltransférases de l'ADN Dnmt3a et Dnmt3b catalysant la méthylation des îlots CpG (Bachman et al., 2001). Etant donné leurs capacités de multimérisation et d'interaction avec de nombreux régulateurs chromatiniens, il a été proposé que les protéines HP1 associées à la lysine 9 méthylée de l'histone H3 constituent une plateforme pour le recrutement de protéines impliquées dans la formation et la propagation de l'hétérochromatine (Grewal et Jia, 2007).

3. Localisation et dynamique sub-nucléaire des protéines HP1

Chez les mammifères, HP1 α , β et γ , montrent une localisation sub-nucléaire bien spécifique : HP1 α est principalement enrichie au niveau des régions d'hétérochromatine péracentromérique alors qu'HP1 β , et plus encore HP1 γ , peuvent également s'associer à l'euchromatine (Nielsen et al., 1999) (**figure 20**).

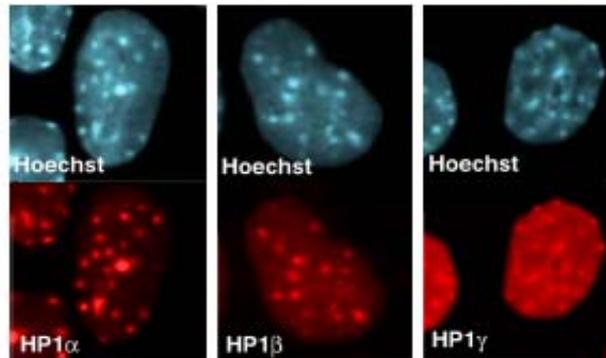


Figure 20 : Les trois isoformes HP1 α , β et γ ont des localisations sub-nucléaires distinctes.

Pendant longtemps, les HP1 ont été considérées comme des protéines relativement immobiles dans le noyau ; cependant, de nombreuses études réalisées dans des cellules vivantes ont mis en évidence l'importante dynamique sub-nucléaire de ces protéines, non seulement dans les cellules en interphase, mais aussi dans les cellules mitotiques et en voie de différenciation.

En effet, la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) utilisée dans des cellules en interphase a permis de montrer que la majorité des HP1 (entre 50 et 80%) sont très mobiles, et que seule une petite fraction est incorporée dans des complexes stables, qui sont associés préférentiellement à la forme condensée de la chromatine (Schmiedeberg et al., 2004). Confirmant ces observations, des expériences de microscopie à fluctuation de fluorescence ont indiqué que dans des cellules 3T3, le temps de résidence des HP1 sur la chromatine varie entre 0,2 s et 2mn, et que les temps les plus longs correspondent à la liaison de ces protéines aux régions d'hétérochromatine (Müller et al., 2009). Plusieurs travaux ont suggéré une signification fonctionnelle pour ces mouvements ; par exemple, la mobilité d'une protéine de fusion GFP (*Green Fluorescent Protein*)-HP1 β dans des lymphocytes T murins augmente fortement lors de l'activation de ces lymphocytes, indiquant qu'une telle dynamique pourrait faciliter le remodelage de la chromatine et permettre l'accès des facteurs de transcription aux nombreux gènes déréprimés lors de ce processus (Festenstein et al., 2003).

La dynamique des HP1 et ses implications ont également été très étudiées dans le cadre du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire. Ainsi, dans les cellules HeLa, HP1 β est associée aux centromères au cours de l'interphase ; elle y est remplacée par HP1 α lorsque la cellule entre en métaphase, suggérant que ces deux protéines jouent des rôles spécifiques au niveau du centromère durant le cycle cellulaire (Hayakawa et al., 2003). D'autre part, les HP1 présentent un profil diffus dans des cellules ES (*Embryonic Stem*) humaines pluripotentes, mais elles se relocalisent au niveau de larges foci lors de leur différenciation induite par l'acide rétinoïque *all-trans* (Bártová et al., 2008). D'une façon similaire, l'association d'HP1 γ à l'hétérochromatine augmente fortement lors de la différenciation myogénique alors que son niveau d'expression ne varie pas sensiblement ; cette relocalisation corrèle avec la présence de MeCP2 et MBD1 dans ces régions nucléaires, suggérant que ces protéines et HP1 γ coopèrent dans la formation de compartiments sub-nucléaires transcriptionnellement répressifs (Agarwal et al., 2007).

4. Fonctions moléculaires des protéines HP1

Du fait de leur capacité à interagir avec de nombreux partenaires, les protéines HP1 sont au cœur de multiples fonctions cellulaires et processus biologiques (**tableau 1**) ; ainsi, elles interviennent dans la régulation de la transcription, les modifications de la structure chromatinienne, la réplication et la réparation de l'ADN, l'organisation nucléaire et la fonction des chromosomes et des centromères (pour revues, Maison et Almouzni, 2004 ; Hiragami et Festenstein, 2005 ; Kwon et Workman, 2008) (**figure 21**).

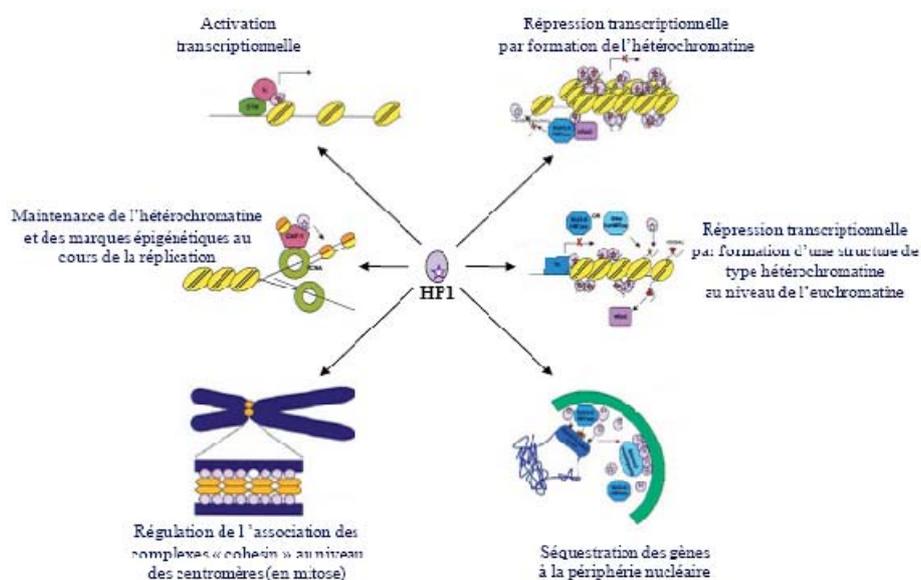


Figure 21 : Exemples de fonctions des protéines HP1 (adapté de Hiragami et Festenstein, 2005).

Protéine	Espèce	Isoforme	Domaine
<i>Composants de l'hétérochromatine / Régulateurs de la transcription</i>			
Histone H1	Drosophile	HP1	ND
Histone H3	Drosophile, Souris	HP1, HP1 α , - β , - γ	CD
H3K9me	<i>S. pombe</i> , Drosophile, Souris, Homme	Swi6, HP1, HP1 α , - β , - γ	CD
Histone H4	Drosophile, Souris	HP1, HP1 α	CSD
SUV39H1	Drosophile, Souris, Homme	HP1, HP1 α , - β , - γ	CSD
Polycomb	Homme	HP1 α , - γ	CSD
Dnmt3a	Souris	HP1 α	ND
Dnmt3b	Souris, Homme	HP1 α , - β	ND
TIF1 β	Souris, Homme	HP1 α , - β , - γ , hHP1 α , - γ	CSD
Rb	Homme	HP1 α , - γ	ND
MTR	Souris	HP1 α	Charnière
BRG1	Souris	HP1 α	CSD
ATR α	Souris	HP1 α , - β	CSD
TAFII130	Homme	HP1 α , - γ	CSD
PIM1	Homme	HP1 γ	CSD
ARN	Souris	HP1 α , - γ	Charnière
<i>Réplication et réparation de l'ADN</i>			
CAF-1 (p150)	Souris, Homme	HP1 α , - β , hHP1 α	CSD
Ku70	Homme	HP1 α , - γ	CSD
BRCA-1	Homme	HP1 α	ND
ORC1-6	Drosophile	HP1	CD, CSD
HOAP	Drosophile	HP1	ND
<i>Organisation nucléaire</i>			
Enveloppe nucléaire	Souris	HP1 α , - β , - γ	CD
Récepteur laminine B	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD
Laminine B	Souris	HP1 β	CD
LAP2 β	Souris	HP1 β	CD
<i>Autres protéines associées aux chromosomes</i>			
Psc3	<i>S. Pombe</i>	Swi6	CD
DDP1	Drosophile	HP1	ND
Arp4/dARP6	Drosophile	HP1	ND
INCENP	Homme	HP1 α , - γ	Charnière
Ki-67	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD
SP100B	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD

Tableau 1 : Exemples de partenaires d'interaction des HP1 (adapté de Hiragami et Festenstein, 2005 ; Kwon et Workman, 2008).

a. Rôle des HP1 dans la formation de l'hétérochromatine

Le rôle des protéines HP1 dans l'établissement et la propagation de l'hétérochromatine, qui est l'un des mieux caractérisés, implique une coordination fonctionnelle entre ces protéines et de nombreux partenaires.

i. Chez la levure

La formation de l'hétérochromatine chez *Schizosaccharomyces pombe* fait intervenir un complexe nommé RITS (*RNAi-induced Initiation of Transcriptional Silencing*) contenant entre autres de petits ARN non codants appelés siRNA (*small-interfering RNA*). Les siRNA participent dans la cellule à un mécanisme de répression post-transcriptionnelle de l'expression des gènes : l'ARN interférence. Les siRNA présents au sein de RITS sont dérivés des éléments répétés présents aux loci devant être soumis à l'hétérochromatinisation et ciblent le complexe au

niveau de ces régions par appariement de nucléotides. Ce ciblage entraîne le recrutement à la fois d'un complexe RDRC (*RNA-directed RNA polymerase complex*), contenant une ARN polymérase ARN-dépendante permettant de poursuivre la production de siRNA, et de l'histone méthyltransférase Ctr4, qui triméthyle l'histone H3 sur la lysine 9. La modification par cette enzyme des nucléosomes adjacents sert de site d'ancrage pour le complexe RITS ainsi que pour Swi6, l'homologue d'HP1 chez *S. pombe* ; ces partenaires constitueront à leur tour une plateforme de recrutement pour d'autres activités enzymatiques qui permettront la diffusion de la structure hétérochromatinienne (Grewal et Elgin, 2007 ; Grewal, 2010) (**figure 22**). Très récemment, il a été montré que la reconnaissance des résidus H3K9 triméthylés par les protéines Swi6 entraîne la tétramérisation de ces protéines, permettant de former un pont entre deux nucléosomes et ainsi de renforcer la diffusion de l'hétérochromatine *in vivo* (Canzio et al., 2011).

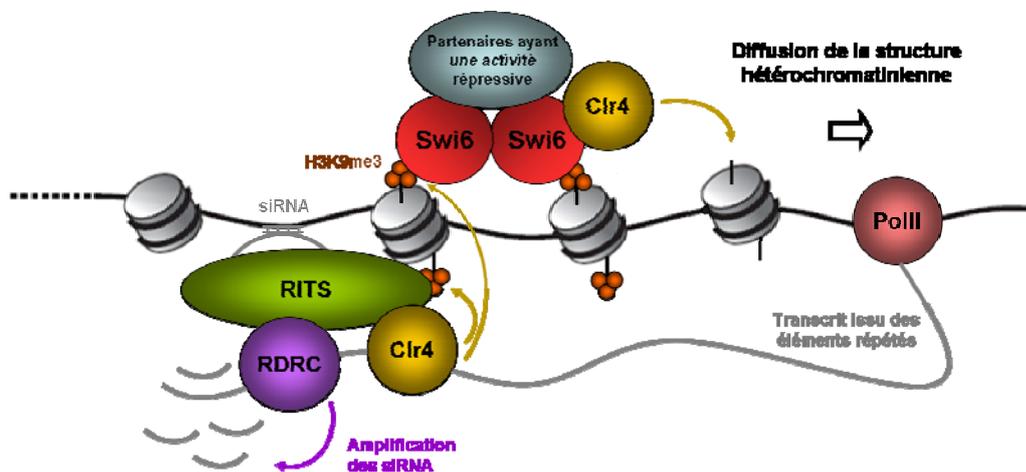


Figure 22 : Etablissement et propagation de l'hétérochromatine chez *S. pombe*.

ii. Chez les mammifères

Les principaux aspects de ce mécanisme sont retrouvés dans l'établissement de l'hétérochromatine chez les mammifères (**figure 23**). La présence du résidu H3K9 triméthylé permet l'association des protéines HP1, qui recrutent Suv39h1, la principale méthyltransférase catalysant la triméthylation de H3 sur la lysine 9 ; l'activité de cette enzyme entraîne la création de nouveaux sites de liaison pour les HP1, formant ainsi une boucle d'auto-renforcement permettant la propagation de la structure (Schotta et al., 2002 ; Probst et Almouzni, 2008). De plus, les HP1 sont capables de s'associer avec d'autres facteurs participant à la formation de l'hétérochromatine, tels que les histones méthyltransférases Suv420h1 et Suv420h2 qui catalysent la triméthylation de l'histone H4 sur la lysine 20, et les

ADN méthyltransférases DNMT3a et DNMT3b ; il a ainsi été suggéré que les mécanismes induisant la méthylation des histones d'une part, et la méthylation de l'ADN d'autre part, peuvent agir de façon synergique pour induire la formation de domaines chromatiniens silencieux chez les mammifères (Lehnertz et al., 2003 ; Schotta et al., 2004).

La possibilité d'une relation entre la structure de l'hétérochromatine et la machinerie de l'ARN interférence a également été évoquée chez les mammifères (Kanellopoulou et al., 2005). En lien avec cette idée, le ciblage d'HP1 à l'hétérochromatine requiert un composant ARN (Muchardt et al., 2002 ; Maison et al., 2002 ; Maison et al., 2011) ; de plus, l'accumulation forcée de transcrits des satellites mineurs, constituants des centromères, entraîne des perturbations des marques épigénétiques au niveau du centromère ainsi que des défauts de ségrégation chromosomique durant la mitose, suggérant l'implication de ces ARN dans la structure de l'hétérochromatine centromérique (Bouzinba-Segard et al., 2006). Des transcrits correspondant aux satellites majeurs ont également été mis en évidence en périphérie de l'hétérochromatine péricentromérique (Lu et al., 2007 ; Maison et al., 2011) ; cependant, aucune ARN polymérase ARN-dépendante n'ayant été identifiée chez les mammifères, l'existence d'un mécanisme de maintien de l'hétérochromatine similaire à celui de *S. pombe* reste à démontrer (Probst et Almouzni, 2008).

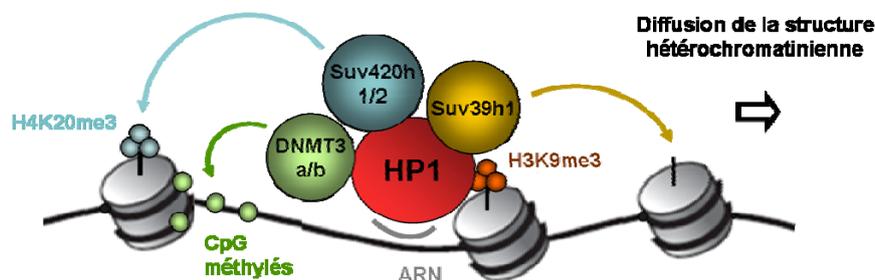


Figure 23 : Etablissement et propagation de l'hétérochromatine chez les mammifères.

- b. Implication des HP1 dans la fonction des centromères et télomères
 - i. Au niveau des centromères

La présence des protéines HP1 au niveau des centromères est essentielle pour les fonctions cellulaires de cette structure. Chez *S. pombe*, Swi6 est nécessaire au bon déroulement de la mitose ; en effet, elle recrute au niveau du centromère la cohésine, une protéine permettant de maintenir jointes les chromatides sœurs après la réplication de l'ADN (Bernard et al., 2001). Durant la méiose, Swi6 peut également s'associer à la shugoshine

Sgo1, qui protège la cohésine centromérique d'un clivage prématuré par la séparase avant la deuxième division de méiose. Une mutation abolissant l'interaction Sgo1/Swi6 empêche la localisation centromérique de Sgo1 et entraîne une ségrégation incorrecte des chromosomes méiotiques (Yamagishi et al., 2008). D'autre part, chez des souris déficientes pour les histone méthyltransférases Suv39h, la perte de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 entraîne une délocalisation des protéines HP1 hors des régions d'hétérochromatine péri-centromériques et est associée à une augmentation de l'instabilité des chromosomes (Peters et al., 2001 ; Maison et al., 2002).

ii. Au niveau des télomères

Les protéines HP1 sont également indispensables à la stabilité des télomères, dont l'une de fonctions est d'empêcher la ligation des extrémités chromosomiques par les enzymes de réparation de l'ADN. Chez la drosophile, les télomères sont constitués d'une suite de rétrotransposons, protégés de la dégradation par la liaison de protéines non nucléosomales dont HP1 (pour revue, Capkova et al, 2008). Des mutants *Su(var)2-5*, gène codant pour HP1 chez la drosophile, présentent une augmentation du niveau d'expression des rétrotransposons, ainsi que de nombreuses fusions télomériques et une configuration anormale des chromosomes durant la métaphase (Fanti et al., 1998 ; Savitsky et al., 2002). D'autre part, des MEF (*Murine Embryonic Fibroblasts*) déficients en enzymes Suv39h1 et 2 montrent des niveaux réduits de méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 et des HP1, corrélés avec une taille anormalement longue des télomères, qui chez la plupart des eucaryotes sont définis par des séquences répétées riches en guanines (Garcia-Cao et al., 2004 ; Capkova et al., 2008). Ainsi, les HP1 jouent un rôle important dans la stabilité de la longueur et le contrôle transcriptionnel télomériques.

c. Rôle des HP1 dans la réplication de l'ADN

Les protéines HP1 s'associent également à des partenaires participant à la réplication et à la réparation de l'ADN, processus centraux pour la préservation de l'intégrité génomique. Récemment, des travaux chez la levure ont mis en évidence que Swi6 régule positivement l'initiation de la réplication de l'hétérochromatine péri-centromérique, en interagissant avec la kinase DDK impliquée dans l'assemblage des facteurs d'initiation au niveau des origines de réplication (Hayashi et al., 2009). HP1 peut également intervenir dans le choix du moment de réplication pour différentes régions d'hétérochromatine : il a été montré chez la drosophile qu'HP1 retarde la réplication de l'ADN centromérique jusqu'à la fin de la phase S, mais

qu'elle favorise la réplication précoce des régions enrichies en éléments répétés situées sur les bras des chromosomes (Schwaiger et al., 2010). D'autres études ont montré la conservation chez la souris du lien fonctionnel entre les protéines HP1 et la réplication de l'ADN. En effet, les HP1 interagissent avec la sous-unité p150 du facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) (Murzina et al., 1999), qui dépose les histones H3 et H4 au niveau de l'ADN nouvellement répliqué (Gaillard et al., 1996). La sous-unité p150 est impliquée dans la stabilisation d'une fraction des protéines HP1 au niveau de l'hétérochromatine pendant la réplication de l'ADN (Quivy et al., 2004), et l'interaction entre p150/CAF1 et les protéines HP1 est essentielle pour la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique et la progression de la phase S du cycle cellulaire (Quivy et al., 2008). De plus, CAF1 peut s'associer à la fois avec HP1 α et l'histone méthyltransférase SETDB1, pour former un complexe susceptible d'initier la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 au niveau des foyers de réplication. Le recrutement par ce complexe des histones méthyltransférases Suv39h1/h2 pourrait par la suite servir de base pour la propagation de cette marque au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la réplication (Loyola et al., 2009).

d. Rôle des HP1 dans la réparation de l'ADN

De nombreux travaux ont mis en relief l'importance du rôle joué par les HP1 au cours de la réparation de l'ADN (pour revue, Ball et Yokomori, 2009). Il a été montré que dans des cellules humaines, les trois isoformes d'HP1 sont recrutés au niveau des cassures induites dans l'ADN par les UV ou un traitement oxydatif (Luijsterburg et al., 2009 ; Zarebski et al., 2009). Les mécanismes et conséquences d'un tel recrutement ont été particulièrement étudiés dans le cas d'HP1 α et HP1 β . Après l'induction par laser de dommages dans l'ADN, HP1 α s'accumule de façon rapide et transitoire au niveau des lésions, qu'elles soient dans l'eu- ou l'hétérochromatine ; cette mobilisation est strictement dépendante de l'interaction entre HP1 α et p150/CAF-1. De plus, la déplétion d'HP1 α compromet gravement le recrutement des protéines 53BP1 et RAD51, qui sont impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (DDR : *DNA Damage Response*), et conduit à des défauts de réparation des cassures par recombinaison homologue, réduisant ainsi la survie des cellules. Le recrutement d'HP1 α au niveau des lésions de l'ADN est donc indispensable à leur signalisation et à leur réparation (Baldeyron et al., 2011). D'une façon analogue, HP1 β est phosphorylée sur sa thréonine 51 et mobilisée au niveau des dommages dans les secondes suivant l'induction de cassures double brin. Ce recrutement entraîne des changements dans la chromatine permettant de déclencher

la DDR, comme la phosphorylation du variant d'histone H2A.X qui joue un rôle important dans l'accumulation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Ayoub et al., 2008). Après cette mobilisation primaire, HP1 β se réaccumule aux sites des cassures sur une durée plus longue et indépendamment de sa phosphorylation, suggérant que les changements temporels dans la dynamique d'HP1 β et dans son interaction avec la chromatine peuvent correspondre à différents stades de réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (Ayoub et al., 2009).

e. Implication des HP1 dans la régulation transcriptionnelle

i. Régulation négative de la transcription

Les protéines HP1 sont également trouvées au niveau de l'euchromatine, où leur présence est souvent corrélée à une répression des gènes. Par exemple, leur recrutement par le facteur Rb (*RetinoBlastoma*) au niveau du promoteur du gène de la cycline E induit la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 par Suv39h1 et entraîne la répression du gène (Nielsen et al., 2001b). De façon similaire, la présence d'HP1 γ et des histones méthyltransférase G9a et EuHMTase spécifiques de la lysine 9 de l'histone H3 a aussi été observée au niveau des promoteurs des gènes réprimés par le facteur de transcription E2F (Ogawa et al., 2002) ; et les HP1 peuvent participer, *via* l'action du corépresseur TIF1 β , à l'établissement et à la maintenance d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur du gène *MEST* (Riclet et al., 2009). De plus, il a été montré chez l'homme qu'une réponse extrême au stress appelée SSI (*Severe Systemic Inflammation*) s'accompagne de l'hétérochromatinisation d'un ensemble de gènes proinflammatoires euchromatiniens. Ce mécanisme dépend du facteur RelB, qui interagit au niveau de ses gènes cibles avec l'histone méthyltransférase G9a ; cette association favorise la formation d'un complexe entre G9a et les HP1, induisant la formation d'hétérochromatine (Chen et al., 2009).

ii. Régulation positive de la transcription

Un nombre croissant d'études établit l'implication des HP1 dans la régulation positive de l'expression des gènes. Par exemple, il a été décrit chez la drosophile que les HP1 sont nécessaires à la transcription de gènes euchromatiniens impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Cryderman et al., 2005 ; De Lucia et al., 2005), et à l'expression de certains gènes comme *light* et *rolled* au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (Lu et al., 2000).

L'influence positive des HP1 sur la transcription peut s'exercer à la fois au niveau chromatinien et au niveau de l'ARN, et le rôle d'HP1 γ dans de tels mécanismes a été particulièrement bien caractérisé. Ainsi, des travaux récents ont montré qu'HP1C, l'orthologue d'HP1 γ chez la drosophile, joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle en étant associée à l'ARN polymérase II et à la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 (Font-Burgada et al., 2008). De plus, la région transcrite de nombreux gènes chez les mammifères est enrichie en protéine HP1 γ et en méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 dans les cellules érythroïdes (Vakoc et al., 2005). Une autre étude réalisée sur le promoteur inductible LTR (*Long Terminal Repeat*) de HIV1 a montré qu'au cours de l'activation de la transcription, HP1 γ peut remplacer HP1 β au niveau de la région promotrice et s'associer avec l'ARN polymérase II processive dans la région transcrite du gène (Mateescu et al., 2008). Les HP1 peuvent également intervenir au niveau de l'ARN et de l'épissage ; en effet, la technique de RIPchip (*RNA-ImmunoPrecipitation on microarrays*) a permis de mettre en évidence qu'HP1a se lie aux transcrits de plus de 100 gènes euchromatiniens dans les cellules S2, et que cette protéine est nécessaire à leur régulation positive (Piacentini et al., 2009). De plus, HP1 γ facilite l'inclusion des exons alternatifs du gène *CD44* lors de l'épissage, *via* un mécanisme impliquant la diminution du taux d'élongation de l'ARN polymérase II (Saint-André et al., 2011).

5. Fonctions physiologiques des protéines HP1

Les activités des protéines HP1 au niveau moléculaire sont primordiales pour le développement et la physiologie des organismes. Ainsi, les deux homologues d'HP1 présentes chez le nématode *C. elegans*, HPL-1 et HPL-2, exercent des fonctions essentielles ; la présence de HPL-2 est nécessaire dans les cellules germinales pour le développement des gonades somatiques et l'induction normale de la vulve (Couteau et al., 2002 ; Schott et al., 2009). De plus, l'inactivation simultanée de HPL-1 et HPL-2 est létale à l'état larvaire alors que l'inactivation de HPL-1 seule est viable, suggérant une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines (Schott et al., 2006). De même, des mutations dans le gène *Su(var)2-5* qui code pour HP1a chez la drosophile provoquent un phénotype de létalité à l'état larvaire (Eissenberg et Hartnett, 1993) ; des expériences d'inactivation des protéines HP1 par ARN interférence ont permis d'établir que cette létalité affecte principalement les drosophiles mâles et cause d'importants défauts chromosomiques (Liu et al., 2005). La diminution aussi bien que la surexpression d'HP1b entraînent une létalité partielle, indiquant qu'HP1b est également importante pour le développement de la drosophile (Zhang et al., 2011). Des études récentes ont aussi décrit l'importance fonctionnelle d'HP1 β et HP1 γ chez la souris :

l'inactivation du gène murin *Cbx1* qui code pour HP1 β est en effet associée à une létalité périnatale et à de graves défauts de développement au niveau du cortex neuromusculaire et cérébral (Aucott et al., 2008). D'autre part, une mutation hypomorphe d'HP1 γ à l'état homozygote chez la souris, provoquant une importante diminution du niveau d'expression de la protéine, entraîne une importante létalité et un hypogonadisme sévère chez les mâles adultes, associé à une perte de cellules germinales (Brown et al., 2010). Il a également été montré au laboratoire que l'interaction entre le corépresseur TIF1 β et les HP1 est nécessaire à la différenciation en endoderme pariétal des cellules de tératocarcinome embryonnaire F9 (Cammass et al., 2004), et que cette interaction est indispensable au développement embryonnaire post-gastrulation chez la souris (Herzog et al., 2011).

6. Aspects pathologiques liés aux protéines HP1

Actuellement, aucune maladie n'est reliée à des mutations dans les gènes codant pour HP1 α , HP1 β ou HP1 γ chez l'homme. Mais des changements de leur expression ont été reportés dans de nombreux cancers (pour revue, Dialynas et al., 2008). Par exemple, les trois isoformes des HP1 montrent une diminution d'expression dans des tissus tumoraux de prostate, comparés à des organes sains (Shapiro et al., 2008), et le niveau d'ARNm d'HP1 α est réduit chez des embryons atteints de tumeurs au cerveau associées à un mauvais pronostic vital, comparés à des embryons ayant un bon pronostic (Pomeroy et al., 2002). D'une façon similaire, HP1 α est plus faiblement exprimée dans des lésions métastatiques de cancer du sein que dans des tissus mammaires sains ou des tumeurs primaires (Kirschmann et al., 2000). Cette réduction d'expression est corrélée avec une diminution, au niveau du promoteur du gène codant pour HP1 α , de la marque d'activation transcriptionnelle H3K36 triméthylée et d'ARN polymérase II, indiquant que la sous-régulation d'HP1 α est due à un effet transcriptionnel (Thomsen et al., 2011). Ces données suggèrent pour HP1 α une fonction antitumorale au niveau cérébral, ainsi qu'un rôle de suppresseur de métastase pouvant réguler l'invasion des cellules tumorales du sein dans d'autres tissus sans altérer la croissance de la tumeur.

VI. La spermatogenèse chez la souris

Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié les conséquences physiologiques de l'inactivation germinale d'HP1 γ chez la souris ; l'un des principaux effets de cette inactivation est une grave perturbation de la spermatogenèse. La spermatogenèse est le

processus de production des spermatozoïdes ; elle englobe tous les mécanismes qui permettent à des spermatogonies, cellules souches diploïdes, de se différencier en spermatozoïdes, gamètes mâles haploïdes, à l'intérieur de structures spécialisées du testicule appelées tubes séminifères. Il s'agit d'un processus extrêmement organisé et contrôlé dans le temps, qui nécessite la coordination de l'appareil génital mâle et de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

1. Anatomie de l'appareil génital mâle

a. Organisation générale du système uro-génital

La **figure 24** montre une photographie de la dissection de la cavité abdominale d'une souris mâle, sur laquelle une partie du système uro-génital est visible : les reins et la vessie, les testicules reliés aux épидидymes, qui sont prolongés par des canaux déférents, et les vésicules séminales qui produisent le liquide nourricier des spermatozoïdes nécessaire à la formation du sperme.

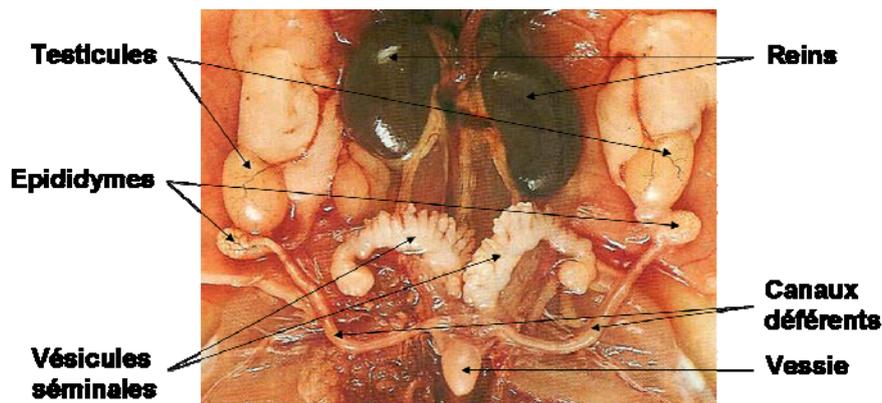


Figure 24 : Organisation de l'appareil uro-génital chez la souris mâle (adapté de www.jeanvilarsciences.free.fr)

b. Le testicule

Le testicule assure deux fonctions indispensables pour la reproduction : la génération des spermatozoïdes et la sécrétion d'hormone sexuelle mâle, la testostérone (Dadoune et Démolin, 1991). Il est logé dans la bourse, dont le revêtement cutané, le scrotum, maintient le testicule à une température permettant la production des spermatozoïdes. Cet organe est entouré d'une tunique épaisse formée de tissus conjonctifs fibreux : l'albuginée, et il est irrigué par une riche vascularisation issue de l'artère testiculaire.

Le testicule présente une organisation caractéristique : il est composé de tubes séminifères dans lesquels les spermatozoïdes sont produits, et qui sont séparés par un espace interstitiel. Les spermatozoïdes matures sont propulsés dans la lumière du tube séminifère et sortent du testicule en passant par le *rete testis* (Dym, 1976), qui constitue le point de convergence des tubes séminifères (**figure 25**).

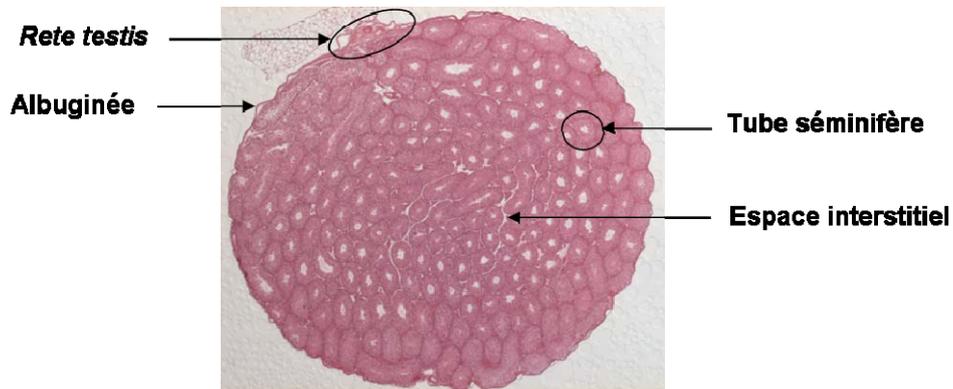


Figure 25 : Structure du testicule visible sur une coupe transversale colorée à l'hématoxyline-éosine.

Les spermatozoïdes poursuivent leur processus de maturation dans une petite structure connectée au testicule, l'épididyme, qui est composée d'une tête proche du sommet du testicule, d'un corps longeant son bord et d'une queue. L'épididyme assure la fin de maturation des spermatozoïdes en leur conférant leur mobilité et leur pouvoir fécondant, avant qu'ils soient évacués par le canal déférent (Soler et al., 1994).

2. Les tubes séminifères

a. Structure

Dans les tubes séminifères, on trouve à la fois des cellules germinales à divers stades de différenciation et des cellules somatiques, les cellules de Sertoli, dont l'association forme l'épithélium séminifère (Dadoune et Démolin, 1991). Cet épithélium repose sur une lame basale constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules contractiles appelées cellules myoïdes péritudulaires (Maekawa et al., 1996), qui participent à l'évacuation des spermatozoïdes, non mobiles dans le testicule (**figure 26**). Dans l'épithélium séminifère, les cellules germinales sont hautement organisées ; en effet, les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère, vers la lame basale, et les cellules les plus matures se trouvent du côté apical du tube, vers la lumière.

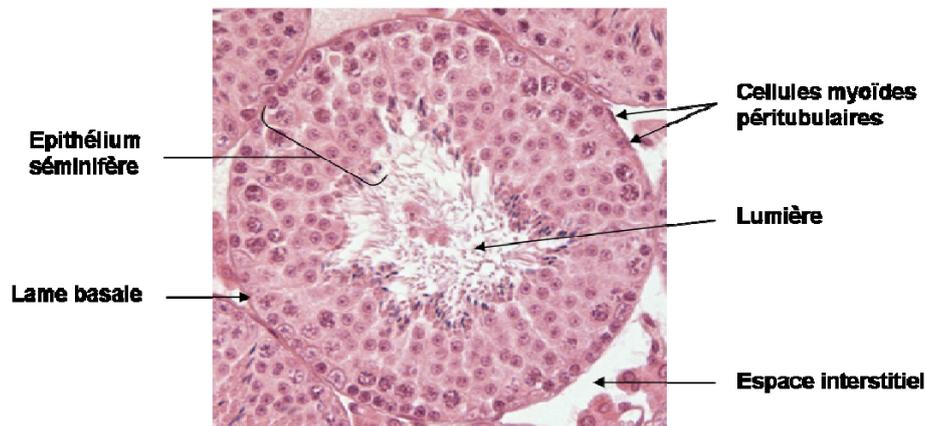


Figure 26 : Structure du tube séminifère visible sur une coupe transversale colorée à l'hématoxyline-éosine.

b. Déroulement de la spermatogenèse

i. Phases de la spermatogenèse

Au niveau fonctionnel, la spermatogenèse se déroule en trois phases : la phase proliférative, la phase méiotique et la spermiogenèse (pour revue, Hess et Renato de Franca, 2008) (**figure 27**).

La phase proliférative dure 8 jours et concerne les spermatogonies, qui se divisent par des mitoses classiques mais dont la cytokinèse n'est pas complète ; ainsi, les cellules forment un syncytium à l'intérieur duquel elles poursuivent leur processus de maturation de façon synchronisée, grâce aux ponts cytoplasmiques qui les relient et leur permettent de communiquer entre elles (Dym et Fawcett, 1971). Il existe plusieurs types de spermatogonies, classés d'après leur stade d'avancement dans le processus de différenciation ; les principaux sont les types A, In (*Intermédiaire*) et B (de Rooij, 2001 ; Dym, 1994), ces derniers ayant la capacité de se différencier en spermatoocytes primaires.

La seconde phase de la spermatogenèse est une phase méiotique de 13 jours touchant les spermatoocytes primaires et secondaires. Chaque spermatoocyte primaire, cellule germinale contenant deux chromosomes à deux chromatides de chaque paire de chromosomes homologues ($2 \times 2n$), subit la méiose pour engendrer quatre spermatides rondes haploïdes, reliées au cœur d'un syncytium par des ponts cytoplasmiques, qui contiennent un chromosome à une chromatide de chaque paire (n) (Hess et Renato de Franca, 2008). Au cours du processus de méiose, des recombinaisons au niveau de l'ADN combinées à une ségrégation aléatoire des chromosomes entraînent un important brassage génétique, assurant la production de spermatides rondes caractérisées individuellement par une combinaison d'allèles unique.

La troisième et dernière phase de la spermatogenèse est une phase de différenciation de 13,5 jours, aussi appelée spermiogenèse, qui permet la formation des cellules germinales les plus matures : les spermatozoïdes. Durant la spermiogenèse, une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se déroulent au niveau des spermatides ronds et allongés. En effet, les spermatides perdent leurs connections cytoplasmiques et les flagelles commencent à se former ; au cours des derniers stades de la spermiogenèse, le noyau des cellules s'aplatit et s'affine et le cytoplasme résiduel est éliminé. De plus, la chromatine est recompactée à l'aide de petites protéines basiques, les protamines, qui remplacent les histones canoniques et sont responsables de l'organisation de la chromatine sous une forme très condensée adaptée à la très petite taille du noyau des spermatozoïdes (pour revue, Gaucher et al., 2010). A la fin de la spermiogenèse se produit la spermiation, qui permet la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères.

La spermatogenèse est un processus cyclique (Dadoune et Démolin, 1991), et sa durée correspond au temps nécessaire à la maturation des gamètes mâles, pour qu'une spermatogonie de type A se différencie en spermatozoïde ; cette durée est de 34,5 jours chez la souris.

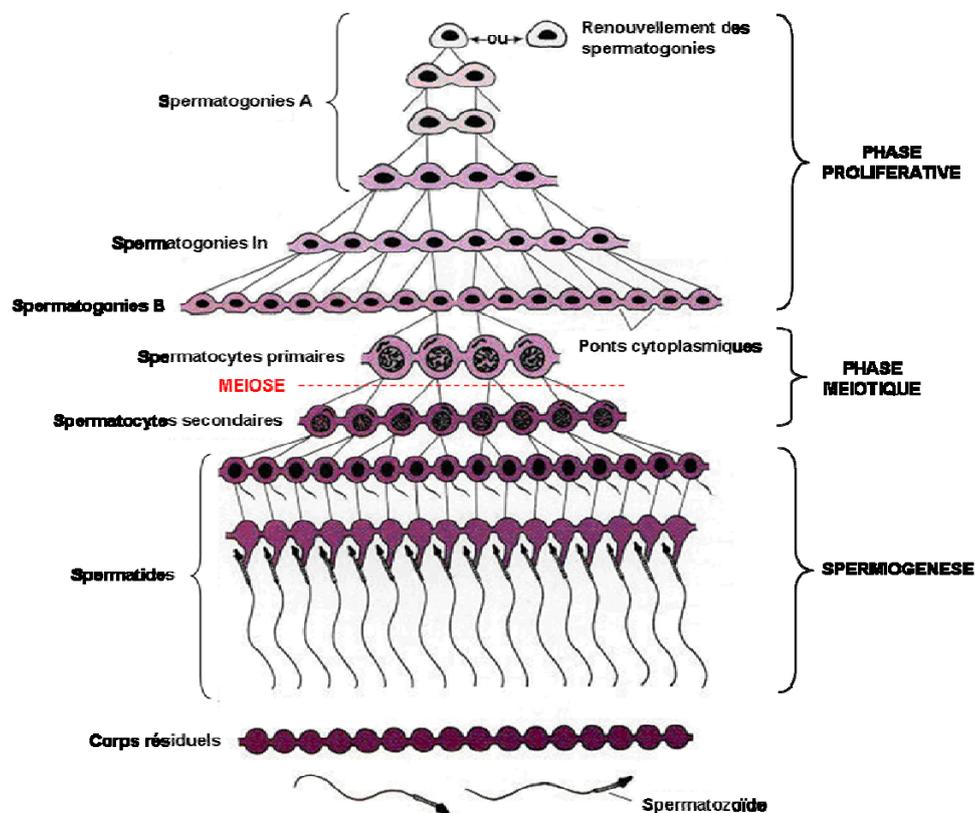


Figure 27 : Les phases de la spermatogenèse chez la souris et les types cellulaires qui leur sont associés.

ii. Stades de l'épithélium séminifère

Les cellules germinales ont une organisation très précise dans l'épithélium séminifère : en effet, elles forment une série d'associations cellulaires ou stades de l'épithélium séminifère, de telle manière qu'un même stade occupe la totalité d'une section transversale d'un tube séminifère et contient toujours les mêmes types cellulaires (Russell et al., 1990). Chez la souris, il existe douze stades (I à XII) de l'épithélium séminifère (**figure 28**).

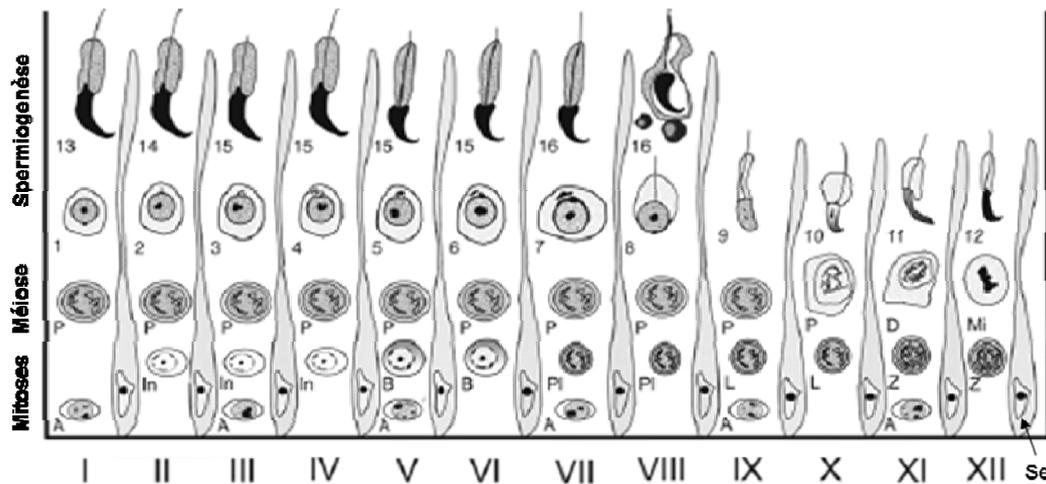


Figure 28 : Les stades de l'épithélium séminifère chez la souris (adapté de Hess et Renato de Franca, 2008).

A, In, B : spermatogonies, Pl : spermatocyte préleptotène, L : spermatocyte leptotène, Z : spermatocyte zygotène, P : spermatocyte pachytène, D : spermatocyte diplotène, Mi : spermatocyte secondaire, 1 à 12 : stades de différenciation des spermatozoïdes, Se : cellule de Sertoli.

Comme un même stade de l'épithélium séminifère occupe la totalité d'une section transversale de tube séminifère, il est possible de distinguer les stades en se basant sur l'état de différenciation des types cellulaires présents (Russell et al., 1990).

Toutes les cellules germinales associées à la phase proliférative sont situées du côté basal du tube séminifère, en contact étroit avec la lame basale. Les spermatogonies de type A sont réparties entre tous les stades ; en revanche, les spermatogonies de type intermédiaires sont présentes aux stades II-III et IV, et les spermatogonies de type B aux stades V et VI. Concernant les cellules de la phase méiotique, on retrouve à travers les stades cinq types différents de spermatocytes primaires, classés d'après le stade de la première division de méiose auquel ils se trouvent : préleptotène (présents aux stades VII-VIII), leptotène (stades IX-X), zygotène (stades XI-XII), pachytène (stades I à X) ou diplotène (stade XI uniquement). Les spermatocytes secondaires sont présents exclusivement au stade XII. Enfin,

la spermiogenèse est divisée en 16 étapes ; les spermatides apparaissent à tous les stades de l'épithélium séminifère, mais celles qui sont associées aux étapes 1 à 8 (stades I à VIII) sont rondes alors que les spermatides des étapes 9 à 16 (stades IX à VIII) sont en voie d'élongation. A la fin de leur différenciation, les spermatides allongées (ou spermatozoïdes) sont expulsées dans la lumière du tube séminifère lors de la spermiation.

La durée d'un cycle de l'épithélium séminifère correspond au temps nécessaire à une cellule germinale pour atteindre l'étape de différenciation suivante du même stade de l'épithélium séminifère ; ce délai est de 8.8 jours environ chez la souris. Ainsi, 8.8 jours sont nécessaires pour qu'un spermatocyte diplotène du stade XI se différencie en spermatide de l'étape 11, ou pour qu'un spermatocyte zygotène du stade XII se différencie en spermatocyte secondaire.

iii. Initiation de la spermatogenèse

La mise en place de la spermatogenèse commence au cours de la période fœtale : entre le dixième et le onzième jour de vie embryonnaire (E10,5 à E11,5), les cellules germinales primordiales migrent dans les précurseurs des gonades appelés crêtes génitales, où elles se multiplient et se différencient en gonocytes qui subissent eux-mêmes de nombreux cycles de division (Nagano et al., 2000 ; Vergouwen et al., 1991). Les gonocytes sont localisés au centre d'une structure à l'origine du tube séminifère et dépourvue de lumière, le cordon séminifère. A E18,5 (durée de gestation de la souris : 20 jours), les gonocytes commencent à migrer en périphérie des cordons séminifères ; cinq jours après la naissance (5 jpp : *jours post-partum*), les gonocytes achèvent leur migration vers la membrane basale des cordons séminifères et commencent à se différencier en spermatogonies de type A. La première vague de la spermatogenèse se déroule suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment pour l'adulte. L'initiation de la méiose s'effectue à l'âge de dix jours (Bellvé et al., 1977), et les premiers spermatozoïdes apparaissent dans la lumière du tube séminifère 35 jours après la naissance, marquant la fin de la première vague de la spermatogenèse (**figure 29**) ; le testicule peut alors être considéré comme pubère.

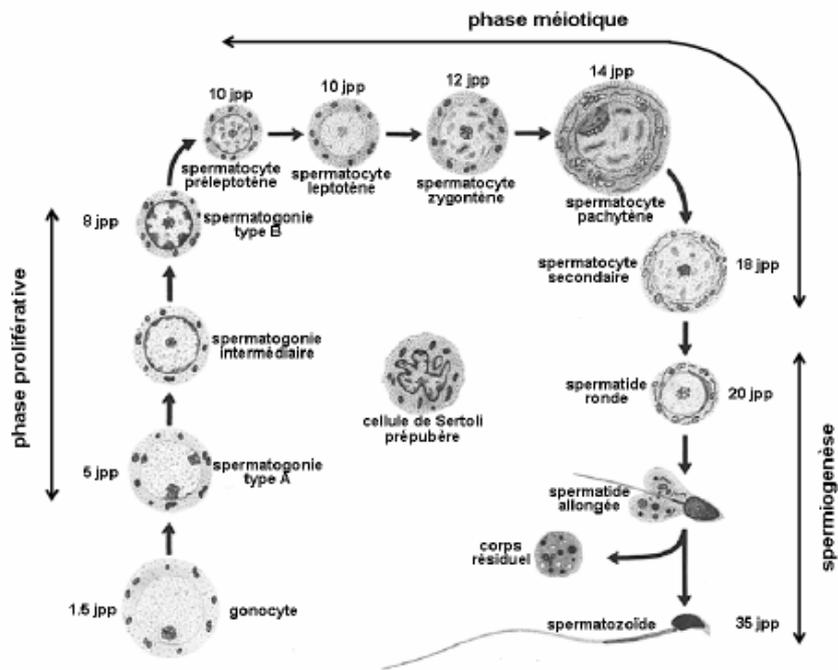


Figure 29 : Evolution chronologique de la première vague de spermatogenèse (adapté de Bellvé et al., 1977 ; de Rooij, 2001).

3. La cellule de Sertoli

Tout au long de leur différenciation, les cellules germinales sont sous la dépendance de cellules somatiques très particulières : les cellules de Sertoli. D'étroites interactions avec les cellules germinales leur permettent d'accomplir plusieurs fonctions essentielles pour le bon déroulement de la spermatogenèse (pour revue, Mruk et Cheng, 2004).

a. Structure de la cellule de Sertoli chez la souris adulte

i. Structure générale

La cellule de Sertoli, de forme pyramidale, repose sur la lame basale du tube séminifère (Russell et Griswold, 1993). Ses faces latérales sont en contact étroit, *via* des complexes de jonction, avec environ cinq autres cellules de Sertoli et trente à cinquante cellules germinales ; elle constitue ainsi un véritable squelette de l'épithélium séminifère (Weber et al., 1983) (**figure 30**). Les cellules de Sertoli présentes durant le cycle spermatogénique ont été regroupées en deux grands types, A et B, qui se distinguent par leur forme : le type A correspond à des cellules dont la surface comporte de profondes poches ou « cryptes » dans lesquelles se logent les cellules germinales, tandis que pour les cellules du

type B ces cryptes sont réduites ou absentes en raison du mouvement des spermatozoïdes vers la lumière du tube, juste avant leur expulsion (Russell et Griswold, 1993).

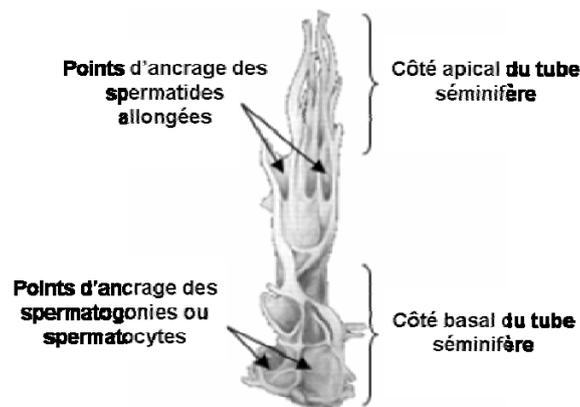


Figure 30 : Structure d'une cellule de Sertoli de rat au stade V du cycle de l'épithélium séminifère (adapté de Russell et Griswold, 1993).

ii. Structure du noyau

Le noyau de la cellule de Sertoli est situé du côté basal du tube séminifère (Russell et Griswold, 1993) ; chez une souris adulte, il montre une organisation caractéristique, avec un large nucléole central entouré de deux (ou trois) chromocentres ronds diamétralement opposés, qui sont le plus souvent de taille similaire et contiennent toute l'hétérochromatine centromérique (Jean et al., 1983 ; Guttenbach et al., 1996) (**figure 31**).

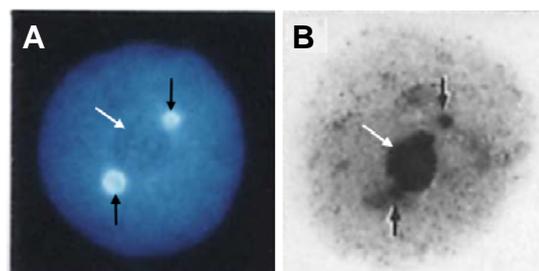


Figure 31 : Organisation nucléaire des cellules de Sertoli dans la plupart des souches de souris (adapté de Guttenbach et al., 1996). A : coloration au DAPI. B : coloration au nitrate d'argent, flèches blanches : nucléole, flèches noires : chromocentres.

Cette structure tripartite de la région nucléolaire est présente dans la plupart des souches de souris (Russell et Griswold, 1993) ; le nombre de chromocentres peut varier selon la souche, mais est indépendant des cycles de l'épithélium séminifère (Krzanowska et

Bilińska, 2000). De plus, les chromocentres sont plus nombreux chez les jeunes mâles, avec typiquement un ou deux chromocentres plus larges que les autres, et ce nombre tend à diminuer avec l'âge des souris (Krzanowska et Bilińska, 2000). Bien qu'il soit généralement admis que l'organisation morphologique du noyau reflète son statut fonctionnel (pour revues, Heard et Bickmore, 2007 ; Misteli, 2007), le rôle du nombre de chromocentres dans les cellules de Sertoli est inconnu.

b. Fonctions de la cellule de Sertoli

La cellule de Sertoli assure plusieurs fonctions parallèlement au maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère. Ainsi, elle crée un environnement adéquat pour la méiose et la spermiogenèse en séparant l'intérieur du tube séminifère de la circulation sanguine ; elle permet également l'élimination des cellules germinales anormales et des débris cytoplasmiques générés lors de la spermiogenèse, et elle contrôle la production ou la dégradation, à l'intérieur du tube séminifère, de divers nutriments et facteurs de croissance.

i. Mise en place de la barrière hémato-testiculaire

Les cellules de Sertoli sont en contact étroit les unes avec les autres, grâce à un complexe de jonctions continues essentiellement formé de jonctions serrées qui apparaît entre 10 et 16 jours après la naissance (Russell et Griswold, 1993). L'ensemble de ces jonctions constitue la barrière hémato-testiculaire (BHT), qui isole l'épithélium séminifère de la circulation sanguine et crée ainsi un environnement spécialisé nécessaire au développement des cellules germinales. En effet, la BHT divise l'épithélium séminifère en deux compartiments : l'un basal, du côté de la lame basale à l'extérieur de la BHT, et l'autre adluminal, à l'intérieur de la BHT (pour revue, Wong et Cheng, 2005). Les cellules du compartiment basal, c'est-à-dire les spermatogonies de type A et B et les spermatocytes préleptotènes et leptotènes, sont en contact avec le milieu extérieur du tube séminifère ; en revanche, les cellules du compartiment apical, à savoir les autres spermatocytes primaires, les spermatocytes secondaires et toutes les spermatides de la spermiogenèse, sont isolées du milieu interstitiel (**figure 32**).

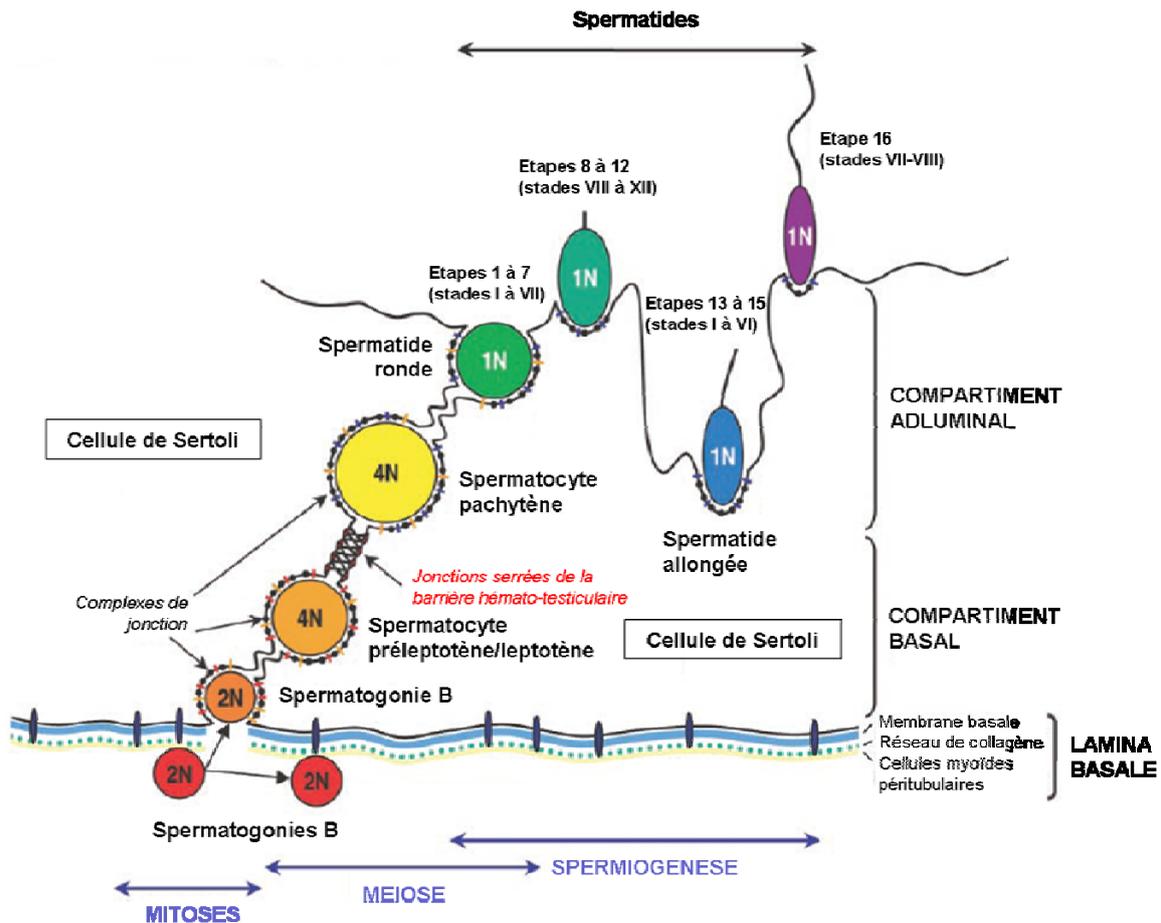


Figure 32 : Organisation des cellules germinales de chaque côté de la barrière hémato-testiculaire (adapté de Chen et Mruk, 2002).

Entre les stades X et XI de la spermatogenèse, les jonctions serrées s'ouvrent pour que les spermatocytes préleptotènes et leptotènes puissent rejoindre le compartiment adluminal afin d'achever la méiose (Li et al., 2009). En plus de leur rôle dans la compartimentation de l'épithélium séminifère, les jonctions serrées constituant la BHT régulent le flux d'eau, d'électrolytes, de nutriments et de déchets qui circule entre l'espace interstitiel et les cellules germinales en voie de différenciation (Li et al., 2009). De plus, la BHT forme une barrière immunologique empêchant les réactions auto-immunes de l'organisme vis-à-vis des antigènes uniques présents à la surface des cellules germinales haploïdes (Mruk et Cheng, 2004). L'intégrité de la BHT est indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse ; en effet, la perturbation de la structure de cette barrière entraîne l'arrêt de la différenciation des cellules germinales (pour revue, Toyama et al., 2003).

ii. Activité de phagocytose

Une importante activité de phagocytose est assurée par la cellule de Sertoli au sein de l'épithélium séminifère (Russell et al., 1990), permettant ainsi l'élimination des cellules germinales qui ont dégénéré au cours de la spermatogenèse ; en effet, il a été estimé que dans des conditions physiologiques, plus de 75% des cellules spermatogéniques en voie de différenciation entrent en apoptose avant la fin de leur maturation (Xiong et al., 2009). Une explication possible est qu'une cellule de Sertoli ne peut soutenir la maturation que d'un nombre limité de cellules ; par conséquent les cellules surnuméraires doivent être éliminées pour que les autres puissent se développer normalement. Par ailleurs, la cellule de Sertoli phagocyte les reliquats de cytoplasme (corps résiduels) perdus par les spermatozoïdes lors de la spermiation, et elle élimine les complexes de jonctions cellule/cellule qui sont sans cesse renouvelés (Russell et al., 1990). La régulation sertolienne de la phagocytose implique les récepteurs tyrosine kinases de la sous-famille Tyro3 et leur ligand, la protéine Gas6 (*Growth Arrest-Specific 6*) (Xiong et al., 2008). La dégradation des cellules spermatogéniques apoptotiques et des corps résiduels ingérés entraîne la formation de gouttelettes lipidiques, que la cellule de Sertoli utilise pour produire de l'énergie (Xiong et al., 2009) ; il a d'ailleurs été montré que chez la souris, la spermatogenèse peut être compromise par l'inactivation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, suggérant que ce métabolisme est essentiel pour la reproduction (Chung et al., 2001).

iii. Activité de sécrétion

La cellule de Sertoli a également d'importantes fonctions de sécrétion, qui lui permettent de communiquer directement et simultanément avec les cellules germinales et sont essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse (pour revue, Mruk et Cheng, 2004). En particulier, cette cellule contrôle la composition du fluide testiculaire, le milieu physicochimique dans lequel a lieu la spermatogenèse et qui permet le transport des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère (Rato et al., 2010). La cellule de Sertoli fournit également aux cellules germinales les nutriments nécessaires à leur survie : du lactate, leur principal substrat énergétique (Boussouar et Benahmed, 2004), mais aussi des acides aminés, des carbohydrates, des lipides, des vitamines et des ions métalliques. Des contacts très étroits avec les cellules germinales rendent possible le transfert de ces produits nutritifs d'un type cellulaire à l'autre (Mruk et Cheng, 2004). En tant que pivot autour duquel s'organise toute l'activité fonctionnelle du testicule, la cellule de Sertoli sécrète aussi de nombreuses protéines et facteurs de croissance nécessaires à la spermatogenèse (Jégou, 1995 ; Russell et Griswold, 1993). Certaines de ces

protéines permettent de contrôler la prolifération des spermatogonies ainsi que les productions hormonales ; d'autres sont des protéines de transport responsables de l'acheminement de nutriments, vitamines, hormones et ions métalliques vers les cellules germinales. La cellule de Sertoli produit également des protéases et inhibiteurs de protéases, qui interviennent notamment dans les processus de remodelage liés à la spermiation et dans le mouvement des spermatocytes préleptotènes et leptotènes à travers la BHT (Griswold, 1998). Enfin, la cellule de Sertoli sécrète des composants de la matrice extracellulaire contribuant à l'intégrité structurale de l'épithélium séminifère (Mruk et Cheng, 2004).

c. Cycle de la cellule de Sertoli

Des changements cycliques, associés au cycle des stades de l'épithélium séminifère, ont été mis en évidence dans la morphologie, l'activité biochimique et l'expression des gènes sertoliennes (Russell et Griswold, 1993). Ainsi, la protéase cathepsine L est sécrétée par les cellules de Sertoli de rat aux stades VI et VII, alors que la cystatine, un inhibiteur de protéase spécifique de la cathepsine L, est produite aux stades XII-I (Erickson-Lawrence et al., 1991 ; Tsuruta et al., 1993). Des profils d'expression cycliques ont été établis pour de nombreuses autres protéines ; il a ainsi été suggéré que la cellule de Sertoli peut avoir deux états fonctionnels dans l'épithélium séminifère, chacun caractérisé par l'expression d'un groupe de gènes spécifiques : un état correspondant aux stades de division méiotique, l'autre correspondant aux stades de spermiation. Ces deux modes d'activité biochimique corrèleraient avec les deux types morphologiques précédemment décrits (voir partie V. 3. a : « Structure de la cellule de Sertoli chez la souris adulte ») (Griswold, 1995).

d. Développement de la cellule de Sertoli

i. Prolifération des cellules de Sertoli

Chez l'embryon, les précurseurs des cellules de Sertoli sont localisés au niveau de l'épithélium coelomique, une couche de cellules recouvrant toute la cavité coelomique et incluant les crêtes génitales (Karl et Capel, 1998). Entre E10 et E12,5 l'expression dans ces précurseurs du gène *Sry*, responsable de la détermination du sexe, déclenche leur différenciation. Autour de E11, les cellules migrent dans la crête génitale, ce qui coïncide avec une augmentation de leur prolifération conduisant à un accroissement rapide de la taille de la gonade ; et à partir de E12,5, les cellules de Sertoli s'organisent en cordons séminifères contenant les cellules germinales. La prolifération des cellules de Sertoli cesse

temporairement entre E11,5 et E12,5, stade à partir duquel elle reprend pour se poursuivre au-delà de la naissance (pour revues, McLaren, 2000 ; Nel-Themaat et al., 2010).

A la naissance, les cellules de Sertoli représentent 80% des cellules du tube séminifère (Bellvé, 1993). Elles sont morphologiquement différentes de celles des souris adultes : leur forme est irrégulière et leur noyau contient un à deux nucléoles et plusieurs chromocentres, avec typiquement un ou deux chromocentres plus larges que les autres. Les cellules de Sertoli se divisent alors par mitoses pendant 10 à 12 jours (Vergouwen et al., 1993), avec un pic de prolifération juste après la naissance ; au terme de cette période, les cellules de Sertoli ont acquis leur structure définitive et deviennent alors incapables de proliférer (Clermont et Perey, 1957). Au cours de la maturation ultérieure des cellules de Sertoli, les chromocentres s'aggrègent graduellement en chromocentres plus larges ; les premiers noyaux comportant un nucléole tripartite sont observés autour de 42 jours, quand les mâles sont matures sexuellement (Chandley et Speed, 1995). Dans le tube séminifère adulte, les cellules de Sertoli post-mitotiques représentent approximativement 3% des cellules du tube séminifère et sont les seules cellules somatiques en contact direct avec les cellules germinales (Bellvé, 1993).

ii. Etablissement du ratio cellules germinales/cellules de Sertoli

Au cours de la première vague de la spermatogenèse se produit une apoptose massive des cellules germinales (Wang et al., 1998 ; pour revue, Aitken et al., 2011), qui atteint un pic vers 10 à 13 jours après la naissance, au moment où les cellules de Sertoli cessent de proliférer. Cette vague d'apoptose, indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse chez l'adulte (Rodriguez et al., 1997), est liée au fait que les cellules de Sertoli ne peuvent soutenir la différenciation que d'un nombre limité de cellules germinales ; ainsi, le nombre de cellules germinales dépend du nombre de cellules de Sertoli. En lien avec cette idée, il a été montré que la réduction expérimentale du nombre de cellules de Sertoli dans des testicules de rat prépubères entraîne une diminution proportionnelle du nombre de spermatozoïdes chez l'adulte, sans que la spermatogenèse soit pour autant affectée (Orth et al., 1988).

e. Aspects pathologiques liés aux cellules de Sertoli

De nombreuses pathologies testiculaires comme l'hypogonadisme ou le cryptorchidisme (Nistal et al., 1990) sont caractérisées par des troubles de la spermatogenèse de sévérité variable. Ces troubles peuvent en effet aller d'une activité spermatogénique fortement réduite, produisant donc peu de spermatozoïdes, à un arrêt complet de la spermatogenèse se traduisant par la présence de tubes séminifères contenant uniquement des

cellules de Sertoli (tubes SCO : *Sertoli Cell-Only*) ; on parle alors de syndrome « Sertoli cell-only » (SCOS : *Sertoli Cell-Only Syndrome*) ou d'aplasie des cellules germinales (Vicdan et al., 2004). Les SCOS peuvent être répartis en deux profils histologiques distincts : SCOS focal ou complet, selon qu'il y a présence de cellules germinales dans la cytologie d'au moins une biopsie ou que l'absence des cellules germinales est totale pour toutes les biopsies, respectivement (Sun et al., 2008).

Il est très difficile de déterminer les causes entraînant la formation d'un tube SCO : en effet, la présence d'un tel tube peut signifier soit que les cellules de Sertoli n'ont pas accompli normalement leur maturation et ainsi n'ont pas pu assurer la survie des cellules germinales, soit que les cellules de Sertoli sont matures et accomplissent correctement leur fonction physiologique, mais que des problèmes inhérents aux cellules germinales sont à l'origine du tube SCO. La distinction entre une cellule de Sertoli immature et une cellule de Sertoli mature autour de laquelle les cellules germinales ont dégénéré est également très délicate (Sharpe et al., 2003). Cette distinction a longtemps dépendu de critères morphologiques, comme la persistance dans les cellules de Sertoli immatures de petits noyaux, au lieu des larges noyaux arrondis des cellules matures (Nistal et al., 1982). Mais la caractérisation de plusieurs marqueurs spécifiques de différents stades de maturation des cellules de Sertoli a rendu plus aisée cette distinction : par exemple, l'expression par les cellules de Sertoli de marqueurs de cellules immatures comme AMH (*Anti-Müllerian Hormone*) (Josso et al., 2001) et CK18 (*CytoKeratin 18*) (Stosiek et al., 1990), et l'absence d'expression d'antigènes matures comme AR (*Androgen Receptor*) (Bremner et al., 1994), suggère soit la persistance de cellules immatures, soit dans certains cas la dédifférenciation de cellules de Sertoli matures, entraînant la réexpression de certains caractères de cellules immatures (Steger et al., 1999).

4. Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

La spermatogenèse est régulée par de nombreuses interactions endocriniennes entre l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, situées dans l'espace interstitiel séparant les tubes séminifères (Dohle et al., 2003 ; pour revue, O'Shaughnessy et al., 2009) (**figure 33**) ; ce système endocrinien est désigné sous le nom d'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.

A la fin de la puberté, un taux suffisant d'hormone lutéinisante (LH : *Luteinizing Hormone*), une gonadotrophine sécrétée par l'hypophyse antérieure, déclenche le fonctionnement des cellules de Leydig, c'est-à-dire la production de testostérone. Cette hormone agit au niveau des cellules de Sertoli, en se liant à son récepteur (récepteur aux

androgènes), ce qui permet de réguler directement l'expression de nombreux gènes impliqués notamment dans le déclenchement et le maintien de la spermatogenèse, l'inhibition de l'apoptose des cellules germinales et la maturation des cellules germinales (Singh et al., 1995 ; De Gendt et al., 2004). La testostérone peut aussi activer directement certaines voies de signalisation cellulaires indépendamment de la liaison de son récepteur à l'ADN (pour revue, Walker, 2009). Les fonctions de la cellule de Sertoli sont également régulées par une autre hormone, une gonadotrophine produite par l'hypophyse antérieure, l'hormone folliculostimulante (FSH : *Follicle Stimulating Hormone*). L'interaction de la FSH avec son récepteur, le FSHR (*FSH Receptor*), au niveau de la membrane plasmique des cellules de Sertoli, entraîne l'activation d'au moins cinq voies de signalisation cellulaire (pour revue, Walker et Cheng, 2005) aboutissant à l'activation de gènes régulant la spermatogenèse. L'une des conséquences de cette activation est la sécrétion par la cellule de Sertoli d'une protéine de transport fixant les androgènes : l'ABP (*Androgen Binding Protein*) (Joseph et al., 1987). Cette protéine se lie avec une forte affinité à la testostérone, ce qui permet notamment de concentrer la testostérone dans le tube séminifère et de potentialiser ainsi son action. L'ensemble de ces mécanismes sont impliqués entre autres dans le contrôle de la quantité de testostérone qui se lie à son récepteur dans la cellule de Sertoli, paramètre essentiel de la régulation de la spermatogenèse.

Plusieurs mécanismes de rétrocontrôle exercent leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (Dohle et al., 2003) (**figure 33**). Ainsi, la sécrétion de LH au niveau de l'hypophyse stimule la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig, et l'augmentation consécutive du taux sanguin de testostérone inhibe la production de LH. Par ailleurs, la FSH stimule la sécrétion par la cellule de Sertoli d'inhibine, une hormone peptidique qui inhibe en retour la synthèse de FSH. Les régulations de la FSH et de la LH dépendent également d'une gonadolibérine appelée GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*), produite de façon pulsatile par l'hypothalamus.

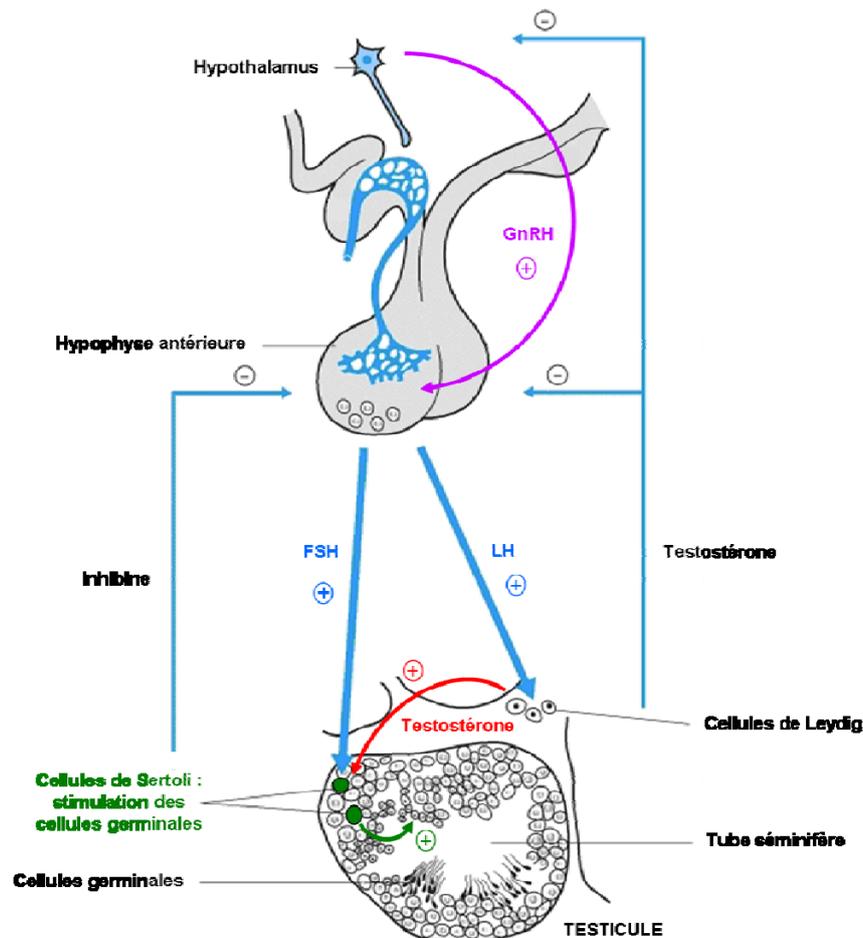


Figure 33 : Relations endocriniennes au sein de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (adapté de Nussey et Whitehead, 2001).

5. Mécanismes épigénétiques liés à la spermatogenèse

La chromatine des cellules germinales subit de nombreuses modifications qui sont critiques pour le bon déroulement de la spermatogenèse, et qui affectent notamment l'extinction de l'expression des éléments transposables, l'empreinte génomique parentale, plusieurs aspects de la méiose et la compaction de l'ADN dans les spermatides allongées (pour revues, Zamudio et al., 2008 ; Khalil et Wahlestedt, 2008 ; Trasler, 2009). Ainsi, chaque phase de la spermatogenèse est caractérisée par un profil précis de modifications chromatinienne.

a. Modifications de la chromatine dans les cellules germinales pré-méiotiques

D'importants changements du profil de méthylation de l'ADN ont lieu dans les gonocytes au cours de l'embryogenèse (**figure 34**). En effet, les marques de méthylation

génomique portées par chaque cellule sont effacées au moment où les cellules germinales primordiales entrent dans la crête génitale, autour de E10,5 à E12,5 chez la souris (Reik et al., 2001 ; Hajkova et al., 2002). Par la suite, les gamètes mâles acquièrent un profil de méthylation spécifique par rapport aux gamètes femelles ; ces différences sont particulièrement marquées au niveau des gènes soumis à l’empreinte génomique parentale, et sont à l’origine de l’expression mono-allélique de ces gènes dans la descendance. Chez la souris, la méthylation des gènes soumis à l’empreinte paternelle ainsi que celle des éléments transposables commence dans les gonocytes entre E15,5 et E18,5, et continue après la naissance dans les cellules mitotiques et méiotiques pour se terminer dans les spermatocytes au stade pachytène (Oakes et al., 2007a). L’établissement de cette empreinte nécessite l’intervention d’un facteur appelé BORIS (*Brother Of the Regulator of Imprinted Sites* ; Klenova et al., 2002) et des méthylases de l’ADN DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (Li et al., 1992 ; Kato et al., 2007). Des anomalies de la méthylation génomique ont été observées chez des hommes atteints d’oligozoospermie (nombre de spermatozoïdes anormalement réduit), suggérant qu’un défaut d’établissement de l’empreinte parentale peut être une cause d’infertilité masculine (Marques et al., 2008).

De façon intéressante, plusieurs études ont montré que par rapport aux cellules somatiques, une proportion significative de sites méthylés dans les cellules germinales se trouvent éloignés des îlots CpG, dans des régions intergénomiques et non répétées. Ainsi, un statut unique de méthylation de l’ADN existe dans ces cellules ; il a été suggéré que la méthylation au niveau de ces régions pourrait être impliquée dans des structures chromatiniques requises pour la méiose et la spermiogenèse (Eckhardt et al., 2006 ; Oakes et al., 2007b).

b. Modifications de la chromatine dans les cellules germinales méiotiques

La méiose nécessite la coordination de plusieurs types de modifications de la chromatine : modifications post-traductionnelles des histones, incorporation de variants d’histones et méthylation de l’ADN (**figure 34**).

Les modifications des histones jouent un rôle primordial pour le bon déroulement de la méiose. Ainsi, la triméthylation de H3 sur la lysine 9 est essentielle à ce stade de la spermatogenèse ; cette modification est catalysée au niveau des régions péri-centromériques par deux enzymes, Suv39h1 et Suv39h2. Suv39h1 est ubiquitaire, mais Suv39h2 est spécifiquement exprimée dans le testicule ; et l’inactivation simultanée de ces deux enzymes chez la souris conduit à un arrêt de la spermatogenèse, caractérisé par une apoptose massive

des cellules germinales due à des perturbations dans l'appariement des chromosomes homologues (Peters et al., 2001). De même, la triméthylation de H3 sur la lysine 4 est nécessaire à la méiose : il a été montré qu'une histone méthyltransférase, MEISETZ (*MEiosis-Induced factor containing a PR/SET domain and Zinc-finger motif*), est exprimée spécifiquement dans le testicule des souris adultes et catalyse la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4, mais pas sa mono- ni sa diméthylation. L'inactivation de MEISETZ chez la souris entraîne un arrêt de la spermatogenèse causé par des appariements illégitimes des chromosomes homologues (Hayashi et al., 2005).

La méiose mâle requiert également l'incorporation dans la chromatine de certains variants d'histones comme H2A.X. Dans les spermatocytes leptotènes et zygotènes, la forme phosphorylée de ce variant est localisée aux sites des cassures double brin sur les autosomes, et est impliquée dans la condensation de la chromatine se produisant durant la recombinaison méiotique (Redon et al., 2002).

Le rôle méiotique des méthylases de l'ADN a également bien été caractérisé, notamment grâce à des expériences de ciblage de gènes dans la lignée germinale mâle. Par exemple, la déficience en DNMT3L, dont l'expression est restreinte aux cellules germinales, est associée chez les souris mâles à une infertilité et à un arrêt de la méiose, corrélant avec une diminution du niveau global de méthylation des gènes soumis à l'empreinte parentale et de certaines séquences répétées comme le rétrotransposon *IAP* (Bourc'his et Bestor, 2004). La délétion du gène *Dnmt3a* résulte en une infertilité similaire à celle provoquée par la déficience de DNMT3L, et est associée à la déméthylation de certains gènes soumis à l'empreinte parentale dans les cellules germinales (Kaneda et al., 2004).

Au stade pachytène de la méiose se produit également l'inactivation des chromosomes sexuels ou MSCI (*Meiotic Sex Chromosome Inactivation*) : les chromosomes X et Y forment alors une structure très condensée appelée corps XY, ce qui entraîne leur inactivation jusqu'au stade spermatides rondes. Il a été montré que de nombreuses modifications des histones sont nécessaires à la mise en place et au maintien de la MSCI, comme par exemple la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 et la di- et triméthylation, ainsi que la déacétylation, de H3 sur la lysine 9 (pour revues, Handel, 2004 ; Turner, 2007). Le variant d'histone H2A.Z est également incorporé dans le corps XY, de même que le variant H3.3 qui est essentiel pour l'extinction des gènes du corps XY au cours des stades post-méiotiques de la spermatogenèse (Greaves et al., 2006 ; van der Heijden et al., 2007).

c. Modifications de la chromatine dans les cellules germinales post-méiotiques

La spermiogenèse est caractérisée par un remodelage global de la structure chromatinienne (**figure 34**) : au cours de cette phase de la spermatogenèse, la chromatine des spermatides rondes est en effet recompactée en une forme extrêmement dense adaptée à la très petite taille du noyau des spermatozoïdes. Ce processus est accompagné par un remplacement des histones par les protamines, de petites protéines basiques riches en résidus arginines et cystéines dont il existe deux formes, PRM1 (*PRotaMine 1*) et PRM2, qui sont uniquement exprimées dans les spermatides (pour revue, Govin et al., 2004). La transition des histones vers les protamines implique deux étapes de remplacement consécutives : celui des histones par des protéines de transition nucléaire TP1 (*Transition Protein 1*) et 2, et celui des TP par les protamines. Ces étapes sont associées à l'hyperacétylation de l'histone H4, qui favorise une structure chromatinienne relâchée permettant l'élimination des histones et l'incorporation par la suite des protéines de remplacement (Sonnack et al., 2002).

Les changements structuraux au niveau de la chromatine dans les cellules germinales post-méiotiques nécessitent également la présence de plusieurs variants de l'histone de liaison H1 qui sont spécifiques du testicule. Ainsi, le variant HILS1 (*HIstone H1-Like Spermatid-specific*) est détecté dans les spermatides en voie d'élongation, où son profil de localisation coïncide avec celui des TP et des PRM (Yan et al., 2003 ; Iguchi et al., 2004) ; une diminution d'expression de HILS1 dans le sperme est associée avec une asthénozoospermie, c'est-à-dire un défaut de mobilité des spermatozoïdes (Jedrzejczak et al., 2007). Par ailleurs, le variant H1T2 (*HI variant, Testis-specific 2*) est exprimé spécifiquement dans les spermatides rondes à allongées où il semble impliqué dans la transition des histones vers les protamines (Martianov et al., 2005 ; Tanaka et Baba, 2005).

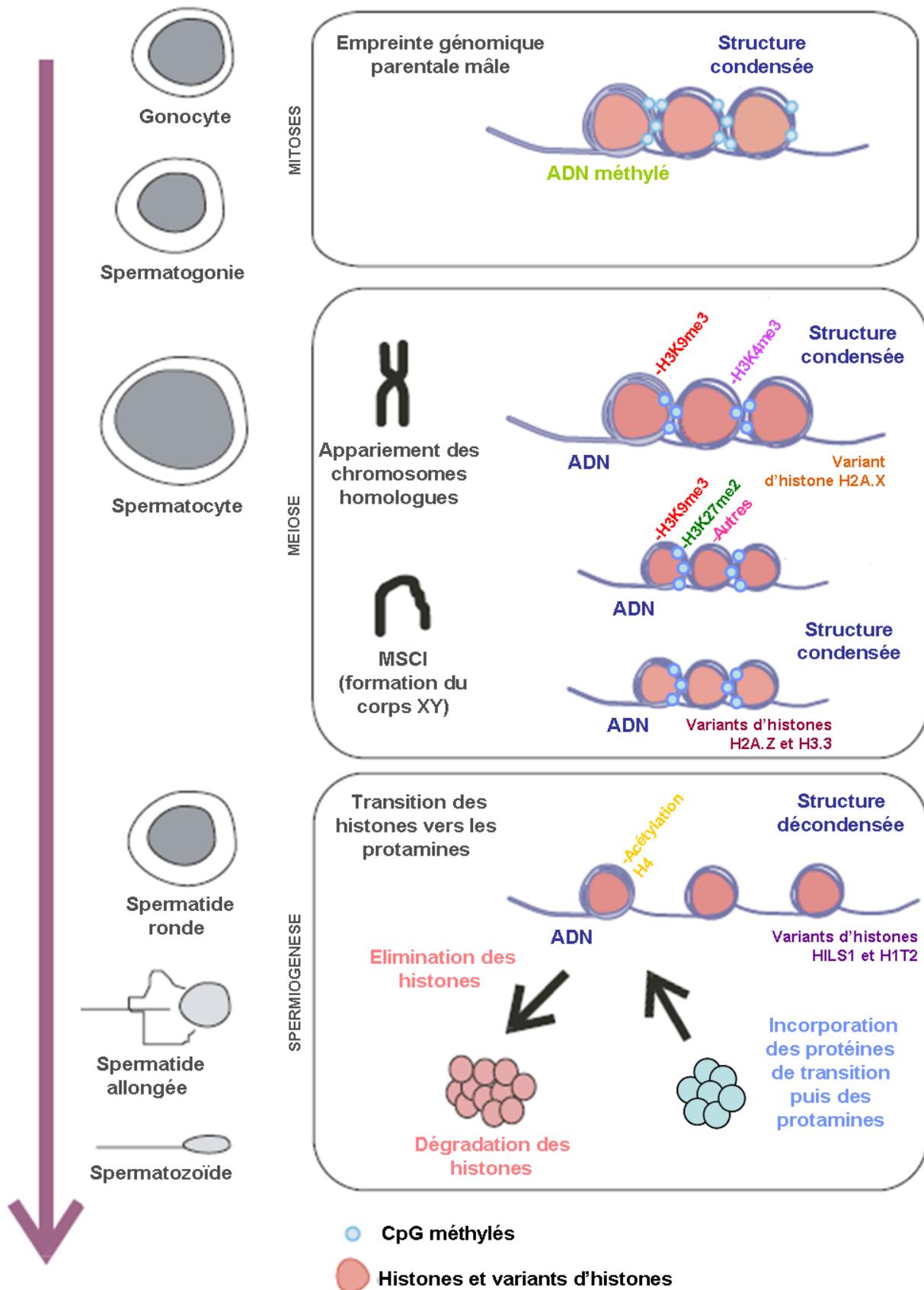


Figure 34 : Les principales modifications de la chromatine impliquées dans la spermatogenèse (adapté de Zamudio et al., 2008).

VII. Présentation du projet de thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les protéines HP1 sont ubiquitaires et ont des fonctions essentielles au niveau moléculaire, qui ont été bien caractérisées dans plusieurs organismes modèles. De façon intéressante, il a été montré que la protéine HP1 γ présente une diversité de fonctions plus grande que les autres protéines de la famille HP1, étant impliquée non seulement dans la répression mais aussi dans l'activation de la transcription. Une telle polyvalence suggère pour cette protéine une importante variété de fonctions physiologiques, ainsi que son implication dans de nombreux processus biologiques ; cependant, ces fonctions sont encore mal définies chez les mammifères. Pour élargir le champ des connaissances sur ce sujet, l'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les fonctions *in vivo* de la protéine HP1 γ chez la souris ; dans ce but, j'ai étudié les conséquences physiologiques de l'inactivation du gène codant pour HP1 γ , *Cbx3* (*Chromobox 3*), dans un modèle murin généré au laboratoire. Etant donné le rôle des protéines de la famille HP1 dans divers processus liés à la chromatine, comme la compaction de l'hétérochromatine ou la réparation de l'ADN, je me suis particulièrement intéressée à des processus biologiques faisant intervenir des mécanismes de recombinaison génomique, en étudiant deux grands systèmes modèles : l'hématopoïèse et la spermatogenèse.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. RT-PCR quantitative

Les ARN de testicules murins ont été extraits avec du TRIzol® (Invitrogen, France) suivant le protocole recommandé par le fabricant. Une purification additionnelle des préparations d'ARN a été réalisée par un traitement à la DNase I-RNase free (Roche), en utilisant 10 U d'enzyme pour 20 µg d'ARN dans un volume final de 100 µl. Le milieu de digestion a été incubé 20 mn à 37 °C, et l'ARN a ensuite été purifié par une extraction phénol-chloroforme. La rétrotranscription a été réalisée sur 1,5 µg d'ARN dans le cas des préparations sur testicules totaux, ou sur la totalité du matériel repris dans 12 µl d'eau RNase-free dans le cas des préparations sur cellules de Sertoli purifiées. Le protocole de rétrotranscription défini par le fournisseur (Superscript II, Invitrogen) a été appliqué, avec une modification : un mélange de deux enzymes, Superscript II (Invitrogen, France) et AMV-RT (Roche) dans des proportions 1:1 en volume, a été utilisé. Les réactions d'amplification ont ensuite été réalisées en triplicat dans un LightCycler™ (Roche Diagnostics), dans un volume final de 10 µl. Aux 5 µl d'un mélange réactionnel « 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix » (Qiagen) contenant du tampon PCR, des dNTP, du MgCl₂ 5 mM, l'agent intercalant SYBR Green I et l'enzyme HotStarTaq® ADN polymérase, ont été ajoutés 0,2 µl de chacune des amorces sens et antisens à une concentration de 100 µM et 3 µl d'échantillons rétrotranscrits dilués au 1/10. 55 cycles d'amplification PCR ont ensuite été réalisés, composés chacun de 10 s de dénaturation à 95 °C, 20 s d'hybridation des amorces à 58 °C et 20 s d'élongation à 72 °C. Toutes les quantifications ont été normalisées par rapport au gène endogène *HPRT*. Les oligonucléotides amorces utilisés sont présentés en **Annexe I**.

II. Préparation d'extraits protéiques et western-blot

Les protéines testiculaires ont été extraites par homogénéisation des testicules, avec un broyeur verre/verre de type Dounce, dans du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 8, 170 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 50 mM NaF) froid, auquel un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) a été ajouté extemporanément. Pour les préparations de lymphocytes B et de cellules de Sertoli, les protéines ont été extraites par 3 cycles de congélation des culots cellulaires dans l'azote et décongélation dans l'eau à température ambiante. Les cellules intactes et les débris ont ensuite été éliminés par centrifugation à 13000 rpm pendant 15 mn à

4 °C, et le surnageant a été prélevé. La concentration en protéines des extraits a été déterminée selon la méthode de Bradford à l'aide du réactif « Protein assay reagent » (Bio-Rad). Pour chaque échantillon, 25 µg de protéines ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide à 12%, et la procédure d'immunoblotting a été menée suivant un protocole standard (Nielsen et al., 1999). Les anticorps monoclonaux anti-β-tubuline 1TUB-1A2 (1 µg/ml ; don de M. Oulad-Abdelghani, IGBMC) et anti-HP1γ 1 Mod-1G6 (0,4 µg/ml, Nielsen et al., 1999) ont été utilisés comme anticorps primaires, et un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort (1/15000, Jackson Laboratories) a été utilisé comme anticorps secondaire. Le signal a été révélé par chimiluminescence avec le kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fabricant, et autoradiographie.

III. Analyses histologiques

Pour les analyses histologiques, les rates ou les testicules ont été fixés dans du liquide de Bouin pendant 24h, inclus en paraffine et sectionnés pour faire des sections de 5 µm, qui ont été colorées à l'hématoxyline-éosine suivant une procédure standard (Herzog et al., 2011).

IV. Analyses par microscopie électronique à transmission

Les testicules ont été prélevés et perforés, puis fixés dans une solution contenant 2,5% de glutaraldéhyde et 2,5% de paraformaldéhyde dans du tampon à 0,1 M de cacodylate de sodium (tampon NaC), pendant 3h à 4 °C. Ensuite, les échantillons ont été lavés plusieurs fois dans du tampon NaC et post-fixés dans une solution contenant 1% de tétroxyde d'osmium dans du tampon NaC, pendant 2,5 h à RT et à l'abri de la lumière. Les échantillons ont alors été lavés dans du tampon NaC 3 x 30 mn à RT, et déshydratés dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante, suivis par deux bains d'oxyde de propylène de 20 mn à RT, et trois bains d'un mélange oxyde de propylène : résine (Epon) dans des proportions 1:2, 1:1, 2:1, chaque bain durant 2h à RT ; puis les échantillons ont été inclus en résine. Des sections semi-fines (0,5 µm) ont été colorées dans une solution à 1% de bleu de méthylène, 1% de bleu azurII, 1% de bleu de toluidine et 1% de tétraborate de sodium dans de l'eau ultrapure ; puis des sections ultra-fines (85 nm) ont été traitées avec 1% d'acétate d'uranyle et

0,4% de citrate de plomb, montées sur des grilles de cuivre de 200-mesh et examinées avec un microscope électronique à transmission Zeiss 902 A, à 80 kV (Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

V. Immunohistochimie et microscopie confocale

Les différentes détections immunohistochimiques présentées dans ce travail ont été réalisées sur des cryosections de testicules de 10 μm d'épaisseur, séchées 20 mn à température ambiante (RT : *Room Temperature*) après sortie du congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et réhydratées dans du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), puis post-fixées dans une solution à 4% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 10 mn à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les sections ont ensuite été lavées dans du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (PBST) 3 x 5 mn à RT, saturées dans une solution à 5% de NGS (*Normal Goat Serum*) dans du PBST pendant 30 mn à RT, et incubées durant la nuit à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec l'anticorps primaire (anti-TIF1 β : polyclonal PF65, 4 $\mu\text{g/ml}$, Weber et al., 2002 ; anti-HP1 α , -HP1 β et -HP1 γ : monoclonaux 2HP1-1H5, 1 Mod-1A9 et 1 Mod-1G6, respectivement, 2 $\mu\text{g/ml}$, Nielsen et al., 1999 ; polyclonaux anti-H3K9Ac, -H3K27Me3, -H3K9Me3, -H4K20Me3 et monoclonal -H3S10P, 1/250, Millipore ; monoclonal anti-vimentine, 1/500, Abcam). Les sections ont ensuite été lavées dans du PBST 3 x 5 mn, incubées pendant 1h à RT avec l'anticorps secondaire (anti-lapin ou anti-souris couplé au fluorochrome Cy3, 1/400, Jackson Laboratories), lavées dans du PBST 3 x 5 mn et montées dans une solution contenant 5% de propylgallate, 80% de glycérol et 10 $\mu\text{g/ml}$ de colorant de Hoechst 33258 dans du PBS. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à tête de scan TCS-SP2 (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne) équipé d'une lentille d'objectif à immersion d'huile HCX PLAPO 63 x 1,4.

VI. Coloration ORO

Les colorations ORO (*Oil-Red-O*) ont été réalisées sur des cryosections de testicules de 10 μm d'épaisseur, séchées 20 mn à RT après sortie du congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et réhydratées dans du PBS. Les sections ont ensuite été colorées pendant 3 mn à RT, sous agitation douce, dans une solution d'ORO préparée en diluant une solution stock, saturée en ORO (Sigma-Aldrich) dans l'isopropanol, dans de l'eau aux proportions 3:2 en volume, puis laissée à sédimenter 15 mn à RT et filtrée. Enfin, les sections ont été rincées dans de l'eau pendant 30 s et montées dans une solution contenant 5% de propylgallate, 80% de glycérol et 10 $\mu\text{g/ml}$ de colorant de Hoechst 33258 dans du PBS.

VII. Purification de cellules de Sertoli

Les deux testicules d'une souris mâle âgée de 14 à 18 jours ont été prélevés et l'albuginée a été retirée à l'aide de pinces fines, puis les testicules ont été dilacérés dans quelques gouttes de milieu de Leibovitz L15 (Gibco). Le milieu contenant les testicules dilacérés a été transféré dans un erlenmeyer contenant 12,5 ml de milieu L15, auquel ont été ajoutés extemporanément 31,2 mg de trypsine en poudre (Sigma-Aldrich, ref. T 8253) et 125 µl d'une solution de DNase (Sigma-Aldrich, ref. DN-25) à 1 mg/ml dans du milieu L15, aliquotée en fractions de 125 µl conservées à -20 °C. Afin d'individualiser les tubes séminifères et d'éliminer les cellules interstitielles, le milieu de digestion a été incubé à 34 °C sous agitation douce pendant 20 à 25 mn, de façon à ce que les tubes séminifères individualisés soient clairement visibles à la fin de la digestion. Le milieu de digestion a ensuite été transféré dans une éprouvette et laissé à sédimenter pendant 2 mn, puis la moitié du surnageant a été éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur. 31 mg d'inhibiteur de trypsine en poudre (Sigma-Adrich, ref. T 9003), repris par agitation vigoureuse dans du milieu L15, ont alors été ajoutés, et le volume a été complété par du milieu L15 qsp 30 ml. Le milieu a été homogénéisé par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette Pasteur et laissé à sédimenter pendant 5 mn, puis le maximum du surnageant a été éliminé. Les tubes séminifères ont alors été repris dans du milieu L15 qsp 4 ml et broyés en 2 x 2 ml, dans un broyeur verre/verre de type Dounce placé dans la glace, par au moins 20 allers/retours à chaque fois. La préparation a ensuite été transférée dans un tube conique de 15 ml et centrifugée à 1000 rpm pendant 5 mn à 4 °C. Le maximum du surnageant a été éliminé, puis les cellules ont été reprises dans 1 ml de milieu L15. La préparation a ensuite été filtrée par dépôt à l'aide d'une pipette Pasteur sur un morceau de toile de nylon (porage 225 µm, Médias Filtrants Durieux, ref. NF-12) posé sur un tube conique, et 2 lavages ont été réalisés par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 mn à 4 °C, élimination du surnageant et reprise des cellules dans 1 ml de milieu L15. Après le dernier lavage, les cellules ont été reprises dans 1 ml de milieu L15 et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Le degré de pureté de la préparation a été estimé sur la base de la morphologie des cellules, trois types cellulaires pouvant être distingués : les érythrocytes, de petite taille et d'aspect uni et réfringent, les cellules germinales, de grosse taille et montrant des granules centraux marron foncé, et les cellules de Sertoli, de taille moyenne et présentant une coloration marron clair en leur centre.

VIII. Marquages de populations hématopoïétiques et cytométrie en flux

1. Préparation des cellules

Pour les souris de 6 semaines, la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques mésentériques et péritonéaux et les deux fémurs (contenant la moelle osseuse) ont été prélevés ; pour les embryons à E18,5, le thymus et le foie ont été prélevés. Les cellules ont été extraites dans 5 ml de PBS à 0,5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) et 2 mM EDTA (milieu de lavage) froid, par écrasement à l'aide d'un piston de seringue concernant la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques et le foie, par broyage dans un mortier concernant les fémurs, et les cellules ont été transférées dans des tubes coniques. Les cellules de thymus et de ganglions lymphatiques ont ensuite été lavées 2 x par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 mn, élimination du surnageant et ajout de 5 ml de milieu de lavage. Les cellules de rate, de moelle osseuse et de foie ont été lavées 1 x, et la lyse des globules rouges a été réalisée par ajout aux culots cellulaires de 500 µl d'une solution à 0,83% de NH₄Cl et incubation pendant 5 mn à RT ; puis la lyse a été neutralisée par ajout de 5 ml de milieu de lavage, et les cellules ont été lavées 2 x comme mentionné ci-dessus. Pour toutes les préparations, les cellules ont ensuite été comptées et reprises dans du milieu de lavage à raison de 25 x 10⁶ de cellules/ml.

2. Marquages et cytométrie en flux

Les combinaisons d'anticorps utilisées pour les différents marquages en fonction de chaque organe sont détaillées en **Annexe II** ; tous les anticorps ont été fournis par BD Biosciences ou eBiosciences, à l'exception des anticorps anti-CD3 (KT3), -CD4 (GK1.5), -CD8 (YT5) et -CD24 (M1/69) qui ont été produits à l'IGBMC. Toutes les dilutions d'anticorps ont été effectuées dans du milieu FACS (3% sérum de cheval inactivé, 30 mM Hepes, 0,1% azide de sodium, dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) sans rouge de phénol). Pour chaque combinaison d'anticorps, 3 x 10⁶ cellules ont été marquées, dans une plaque de microtitration de 96 puits à fond en U. Préalablement aux marquages, les cellules de rate, de moelle osseuse et de foie ont été incubées avec un anticorps anti-CD16/CD32 afin de bloquer les récepteurs Fc (*Fragment constant*). Toutes les étapes de marquages ont été réalisées dans des volumes de 25 µl, avec un temps d'incubation de 10 mn sur glace ; entre deux étapes, les cellules ont été lavées 2 x par ajout de 150 µl de milieu FACS froid, centrifugation à 1200 rpm pendant 1 mn et élimination du surnageant. A la fin de la procédure, les cellules ont été resuspendues dans du milieu

FACS ; les données de cytométrie en flux ont été collectées sur un FACSCalibur avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences), et analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star, Inc.).

IX. Culture de lymphocytes B pour l'induction de la recombinaison de classe et cytométrie en flux

1. Mise en culture des lymphocytes B

En vue de l'isolement des lymphocytes B, la rate des souris a été prélevée le plus stérilement possible et déposée dans un tube conique contenant 10 ml de PBS à 0,5% de BSA (PBS-BSA) froid. Les cellules ont été extraites dans le PBS-BSA par perforation de la capsule splénique et pression à l'aide d'aiguilles, centrifugées à 1200 rpm pendant 5 mn, puis le surnageant a été aspiré et les cellules ont été reprises dans les quelques gouttes restantes. La lyse des globules rouges a été réalisée par ajout d'1 ml de tampon ACK (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, tamponné à pH 7,2) et incubation pendant 30 s à RT ; puis la lyse a été neutralisée par ajout de 13 ml de PBS-BSA froid. La préparation a été laissée à décanter quelques minutes, puis transférée dans un autre tube en évitant de prélever les plus gros débris, et centrifugée à 1200 rpm pendant 5 mn. Le surnageant a été aspiré, puis 10 ml de PBS-BSA froid ont été ajoutés ; les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, et leur concentration ajustée à 100 x 10⁶ cellules/ml avec du PBS-BSA froid. Les lymphocytes B ont alors été purifiés à l'aide de microbilles CD43 (Miltenyi Biotec) en suivant les recommandations du fabricant. A la fin de l'étape de purification, les cellules ont été comptées et reprises dans du milieu « incomplet » (10% sérum de veau foetal inactivé, 10 mM Hepes, pénicilline/streptomycine, dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) préchauffé à 37 °C, à raison de 10 x 10⁶ cellules/ml. Les cellules ont alors été marquées par incorporation de CFSE (*CarboxyFluorescein diacetate, Succinimidyl Ester*) (Invitrogen) à 5 μM pendant 10 mn à 37 °C ; ce colorant fluorescent, incorporé aux cellules au moment de leur mise en culture, se dilue avec les divisions cellulaires, ce qui entraîne une diminution d'intensité de fluorescence à chaque cycle de division, permettant ainsi de suivre par FACS la prolifération cellulaire durant la période de culture. Les cellules ont ensuite été lavées avec 10 ml de milieu « complet » (50 μM β-mercaptoéthanol, 1 mM pyruvate de sodium, acides aminés non essentiels, L-glutamine, dans du milieu « incomplet »), comptées, et mises en culture dans une plaque de culture de 96 puits à raison de 60 x 10⁴ cellules dans 100 μl de milieu « complet » par puits. Les cellules ont été cultivées pendant 72h à 37 °C, dans une atmosphère à 5% de

CO₂, sous différentes stimulations : LPS (*LipoPolySaccharide*, 50 µg/ml, Sigma-Aldrich) pour la commutation en IgG2b et IgG3, LPS + IL-4 (*InterLeukin 4*, 5 ng/ml, Sigma-Aldrich) pour la commutation en IgG1 et LPS + IFN-γ (*InterFeroN γ*, 100 ng/ml, Peprotech) pour la commutation en IgG2a.

2. Marquages et cytométrie en flux

A la fin de la stimulation, les cellules ont été marquées pendant 15 mn, sur glace, avec les anticorps primaires couplés à la biotine anti-IgG1 (BD Biosciences), anti-IgG2a (BD Biosciences), anti-IgG2b (BioLegend) ou anti-IgG3 (BD Biosciences), puis lavées et marquées avec l'anticorps secondaire anti-streptavidine couplé à la phycoérythrine (Beckman Coulter) ; ensuite, 50 nM de ToPro-3 (Invitrogen) ont été ajoutés, permettant d'exclure les cellules mortes de l'analyse. Enfin, les données de cytométrie en flux ont été collectées sur un FACSCalibur avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences), et analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star, Inc.).

Résultats

Partie I

Etude des conséquences de l'inactivation de Cbx3 sur le système immunitaire

Etude des conséquences de l'inactivation de *Cbx3* sur le système immunitaire

Le développement de plusieurs types de cellules hématopoïétiques, ainsi que certains processus intervenant dans la réponse immunitaire, nécessitent des étapes primordiales de recombinaison de l'ADN. Les mécanismes gouvernant ces étapes impliquent d'importantes variations de la structure chromatinienne, ainsi que la coordination entre compaction chromatinienne et réparation de l'ADN. Au cours de cette partie du projet, nous nous sommes donc intéressées au rôle d'HP1 γ dans l'hématopoïèse et le système immunitaire.

I. Inactivation ciblée du gène *Cbx3* chez la souris

1. Cartographie du gène *Cbx3* et stratégie générale d'inactivation

La protéine HP1 γ est codée par le gène *Cbx3*, qui est situé sur le chromosome 6 chez la souris. Ce gène comprend six exons, l'ATG initiateur se trouvant dans l'exon 2 et le codon stop dans l'exon 6. Dans le but d'inactiver *Cbx3*, des sites *LoxP* ont été insérés de part et d'autre de l'exon 3, de telle sorte que leur recombinaison en présence de la recombinaise Cre induise la délétion de cet exon et crée un décalage du cadre de lecture du gène, résultant en la production d'un ARNm codant pour les 8 premiers acides aminés d'HP1 γ et un résidu cystéine ; les codons correspondant à ces acides aminés sont immédiatement suivis d'un codon stop (**figure 35**).

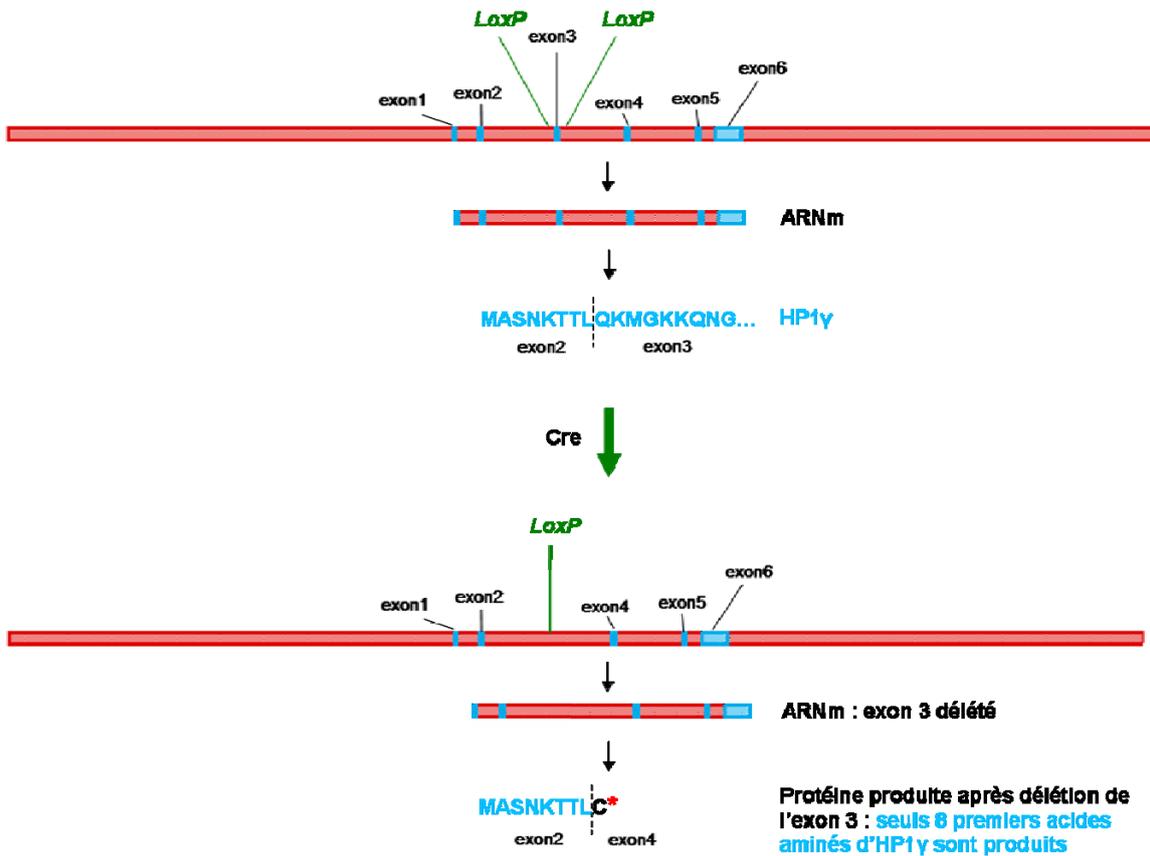


Figure 35 : Stratégie générale d'inactivation du gène *Cbx3*. L'organisation exonique du locus *Cbx3* est indiquée, ainsi que les sites *LoxP* (en vert). La délétion de l'exon 3 en présence de la recombinase Cre entraîne un décalage du cadre de lecture du gène, résultant en l'introduction d'un codon stop (astérisque rouge) après les codons correspondant aux 8 premiers acides aminés d'HP1 γ .

2. Génération des souris *Cbx3*^{+/-}

Un fragment d'ADN de 6,7 kb, comprenant l'exon 3 du gène *Cbx3* ainsi qu'environ 3,7 kb en 5' et 2,8 kb en 3' de ses régions génomiques avoisinantes, a été utilisé pour générer un vecteur de ciblage. Dans ce vecteur, deux sites *LoxP* ont été insérés de part et d'autre de l'exon 3, et une cassette de résistance à la néomycine a été introduite dans la partie d'ADN génomique correspondant au troisième intron de *Cbx3*. Cette cassette a elle-même été entourée de deux sites *FRT*, et un troisième site *LoxP* a été introduit entre la cassette de résistance et le deuxième site *FRT* (**figure 36**).

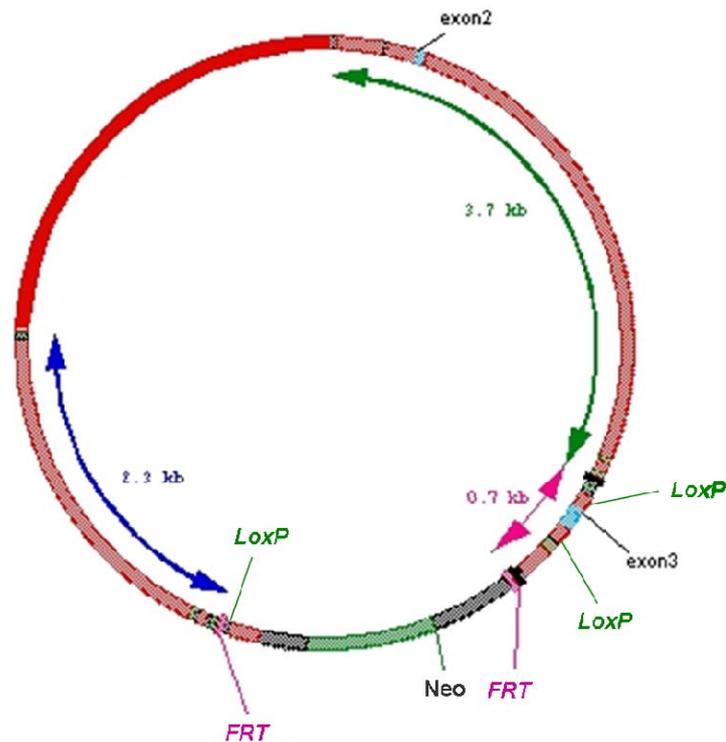


Figure 36 : Vecteur de ciblage utilisé pour l'inactivation du gène *Cbx3*. Les exons 2 et 3 (bandes bleues) ainsi que les sites *LoxP* (en vert) et *FRT* (en violet) et la cassette de résistance à la néomycine (bande verte) sont indiqués.

Le vecteur de ciblage a été électroporé dans des cellules ES P1 [MCI-129Sv/Pas] et 372 clones résistants à la néomycine ont été isolés ; parmi ceux-ci, 2 clones ont été identifiés comme positifs pour la recombinaison homologe grâce à une analyse par Southern blot utilisant une sonde externe spécifique de l'ADN génomique situé en 5' de l'exon 3 (**figure 37 A**). Une autre analyse par Southern blot avec une sonde spécifique de la cassette de résistance a montré que ces deux lignées portent une seule intégration de la construction plasmidique (**figure 37 B**).

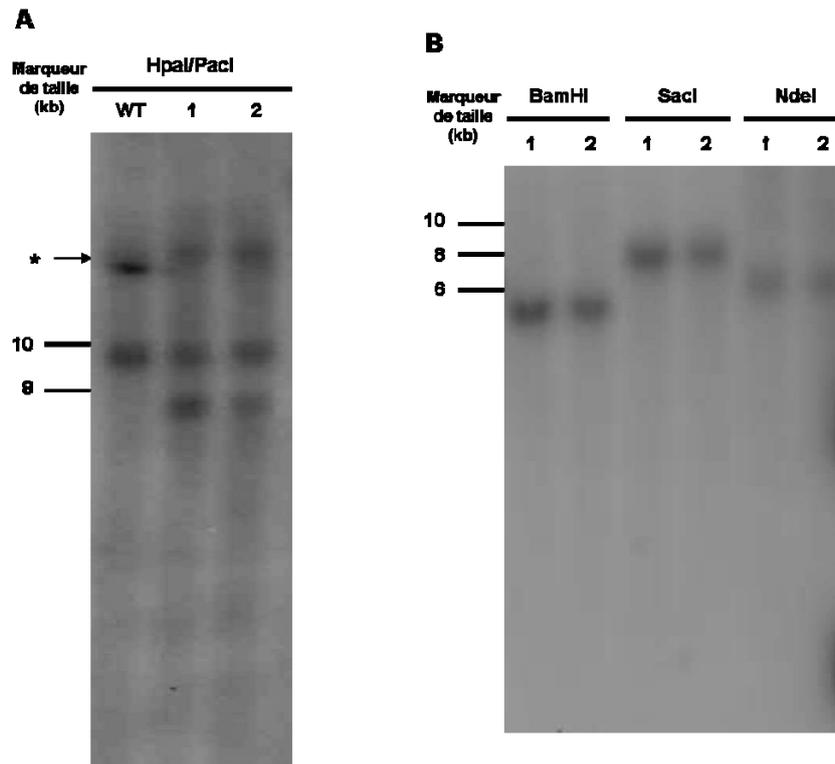


Figure 37 : Analyse par Southern blot des clones de cellules ES positifs pour la recombinaison homologue au locus *Cbx3*. A : deux clones de cellules ES (1 et 2) ont été identifiés positifs pour la recombinaison homologue, par double digestion enzymatique HpaI/PacI et hybridation avec une sonde externe reconnaissant une région génomique située en 5' de l'exon 3 ; astérisque : artefact. Un extrait de cellules WT a été utilisé comme contrôle négatif. B : analyse du nombre d'intégrations de la construction plasmidique de ciblage dans chacun des clones de cellules ES positifs pour la recombinaison homologue (1 et 2), par digestions enzymatiques BamHI, SacI ou NdeI et hybridation avec une sonde spécifique de la cassette de résistance à la néomycine.

L'une des deux lignées de cellules ES positives pour la recombinaison homologue a été utilisée pour l'injection de blastocystes C57BL/6 dans le but de produire des souris chimères, et a contribué à la lignée germinale. Les souris chimères ont ensuite été croisées avec des souris exprimant la recombinase FLP, agissant sur les sites *FRT* pour induire la délétion de la cassette de résistance à la néomycine ; ces croisements ont mené à la génération d'animaux mosaïques, chez lesquels des cellules contenant soit l'allèle ciblé (dit *L3*, **figure 38**), soit l'allèle comportant les sites *LoxP* de part et d'autre de l'exon 3 mais ne comprenant plus la cassette de résistance à la néomycine (dit *L2*, **figure 38**) coexistent. Ces animaux ont été croisés avec des souris C57BL/6, et les souris *Cbx3*^{L2/+} n'exprimant pas la recombinase FLP ont été sélectionnées. Ces souris *Cbx3*^{L2/+} ont ensuite été croisées avec des souris exprimant la recombinase Cre sous contrôle du promoteur du cytomégaloVirus humain (*CMV-Cre* : *CytoMegaVirus-Cre*), agissant sur les sites *LoxP* pour induire la délétion de l'exon 3

de *Cbx3* (**figure 38**) ; ce croisement a entraîné la génération d'autres animaux mosaïques, dont les cellules contiennent soit l'allèle *L2*, soit l'allèle excisé (dit *L-*, **figure 38**) coexistent. Ces animaux ont été croisés avec des souris C57BL/6, et les souris *Cbx3*^{+/*L-*} dépourvues du transgène *CMV-Cre* ont été sélectionnées ; elles seront désignées par la suite sous le nom de souris *Cbx3*^{+/*-*}.

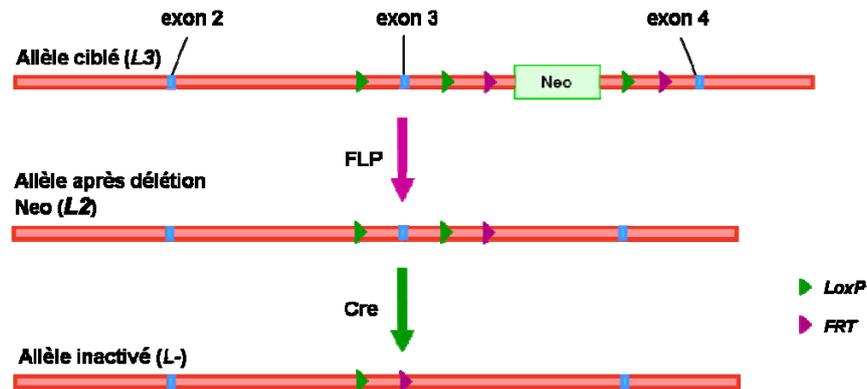


Figure 38 : Représentation schématique des différentes étapes de modification des allèles du gène *Cbx3* au cours de la stratégie d'inactivation : allèle ciblé par le vecteur (*L3*), après délétion de la cassette de résistance à la néomycine (*L2*) suite à l'action de la recombinase FLP sur les sites *FRT* (triangles violets), et inactivé (*L-*) suite à l'action de la recombinase Cre sur les sites *LoxP* (triangles verts). Les exons 2, 3, et 4 de *Cbx3* (bandes bleues) ainsi que la cassette de résistance à la néomycine (bande verte) sont indiqués.

L'efficacité de l'excision de l'allèle *L2* a été évaluée par PCR sur de l'ADN génomique de biopsies de queues de souris *Cbx3*^{+/+} (WT), *Cbx3*^{+/*-*} et *Cbx3*^{-/-}. Le résultat montre que le produit de PCR correspondant à l'allèle *L-* est amplifié chez les souris *Cbx3*^{+/*-*} et *Cbx3*^{-/-} alors que le produit correspondant à l'allèle *L2* n'est pas amplifié, indiquant que l'excision est complète (**figure 39**).

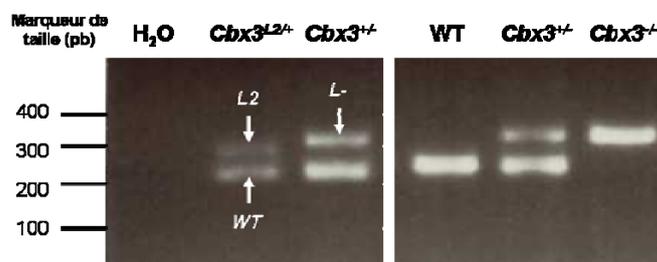


Figure 39 : Analyse de l'efficacité de l'excision de l'allèle *L2* chez les souris *Cbx3*^{+/*-*} et *Cbx3*^{-/-}. PCR sur ADN génomique de biopsies de queues de souris WT, *Cbx3*^{+/*-*} et *Cbx3*^{-/-}. *L2*, *WT*, *L-* : produits de PCR résultant de l'amplification des allèles *L2*, *WT*, et *L-* de *Cbx3*, respectivement.

L'efficacité au niveau protéique de l'inactivation de *Cbx3* a été évaluée par un western blot anti-HP1 γ sur des extraits protéiques de testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Aucun signal n'a été observé pour l'échantillon *Cbx3*^{-/-}, indiquant que l'inactivation de *Cbx3* est bien totale (**figure 40**).

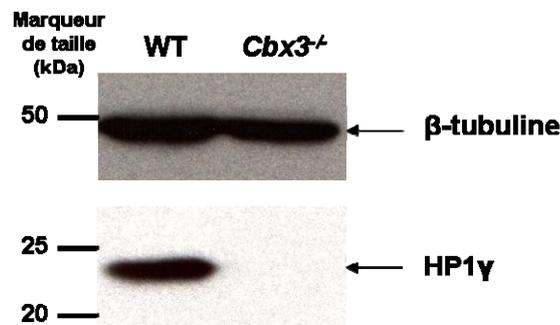


Figure 40 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de *Cbx3*. Western blot anti-HP1 γ sur des extraits protéiques de testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Une hybridation anti- β -tubuline a également été réalisée comme contrôle de charge protéique.

II. Etude de la viabilité, de la croissance et de l'anatomie des souris *Cbx3*^{-/-}

1. Viabilité des souris *Cbx3*^{-/-}

Pour commencer la caractérisation phénotypique des souris *Cbx3*^{-/-}, une étude de leur viabilité a été effectuée en analysant la descendance de croisements de souris hétérozygotes pour *Cbx3* (*Cbx3*^{+/-} x *Cbx3*^{+/-}). Le nombre total de souris *Cbx3*^{-/-} à la naissance est très inférieur aux ratios mendéliens (8%), suggérant une importante létalité *in utero* (**figure 41**). Pour savoir à quel stade du développement meurent les embryons *Cbx3*^{-/-}, des embryons issus de femelles gestantes de croisements *Cbx3*^{+/-} x *Cbx3*^{+/-} ont été analysés au jour embryonnaire 18,5 de la gestation (E18,5), soit un jour avant la naissance. A ce stade, les proportions des génotypes embryonnaires sont de 29% pour les WT, 45% pour les *Cbx3*^{+/-} et 26% pour les *Cbx3*^{-/-}, montrant que la proportion d'embryons *Cbx3*^{-/-} correspond à la proportion mendélienne (**figure 41**). Ces résultats indiquent que les embryons *Cbx3*^{-/-} meurent entre E18,5 et la naissance. De plus, une importante proportion de souris *Cbx3*^{-/-} meurent le jour de la naissance (38% de mortalité chez les souris *Cbx3*^{-/-} contre 6% chez les WT et 7% chez les *Cbx3*^{+/-}). Chez les animaux *Cbx3*^{-/-} qui survivent, un autre pic de mortalité survient autour de 4 semaines (18% de mortalité chez les *Cbx3*^{-/-} contre 6% chez les WT et 3% chez les *Cbx3*^{+/-}) (**figure 41**). L'inactivation de *Cbx3* entraîne donc une létalité à trois niveaux :

embryonnaire (entre E18,5 et la naissance), périnatal et autour de 4 semaines. En raison de ces différentes vagues de mortalité, seuls 16% des souris $Cbx3^{-/-}$ atteignent l'âge adulte ; ces résultats indiquent qu'HP1 γ est cruciale pour la survie des souris.

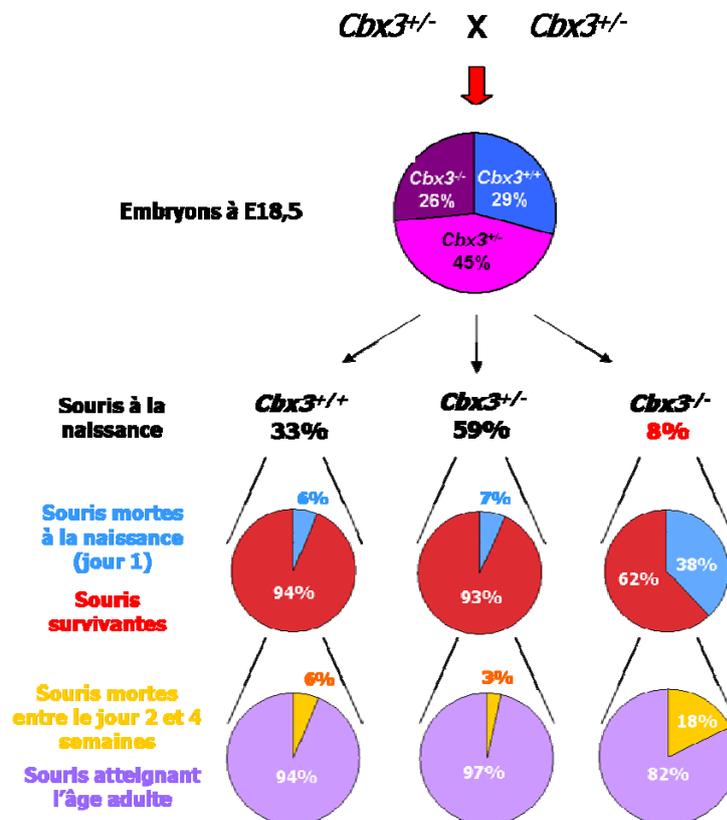


Figure 41 : Analyse de la mortalité des souris WT, $Cbx3^{+/-}$ et $Cbx3^{-/-}$ au cours des premières semaines de vie.

2. Croissance des souris $Cbx3^{-/-}$

Les souris $Cbx3^{-/-}$ ont un poids significativement plus faible que les souris WT (environ 60% du poids des WT) (**figure 42**). Cette différence est significative jusqu'à l'âge de 7 semaines, stade au-delà duquel elle devient non significative. Ce phénotype est également présent, quoique moins marqué, chez les souris $Cbx3^{+/-}$ qui pèsent 90 à 95% du poids des WT (**figure 42**) ; la différence de poids entre les souris $Cbx3^{+/-}$ et WT est significative jusqu'à l'âge de 3 semaines, et suggère que pendant cette période ce phénotype est sensible à la dose d'HP1 γ . Ainsi, HP1 γ est essentielle à la croissance normale des souris au cours de leurs premières semaines de vie.

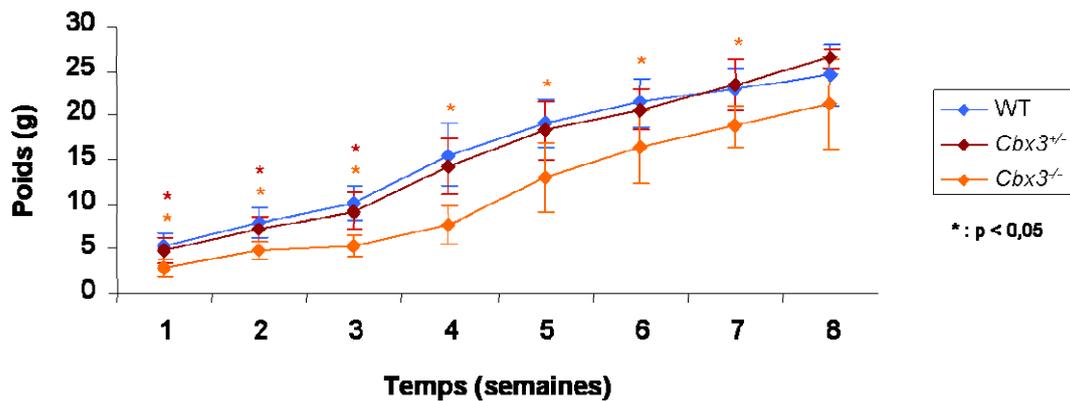


Figure 42 : Evolution du poids des souris WT, *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} au cours du temps.

3. Nécropsie des souris *Cbx3*^{-/-}

Afin de poursuivre la caractérisation du phénotype des souris *Cbx3*^{-/-}, 6 souris WT et 8 souris *Cbx3*^{-/-} ont été disséquées à l'âge de 4 semaines. Une étude systématique des organes de ces souris a montré que la rate des souris *Cbx3*^{-/-} est très petite comparée à celle des WT ; en effet, le rapport poids de la rate/poids de l'animal est significativement plus faible chez les *Cbx3*^{-/-} que chez les WT, alors que le rapport poids d'un rein/poids de l'animal est similaire entre *Cbx3*^{-/-} et WT (**figure 43 A et B**). Une nécrose partielle de la rate a également été mise en évidence chez 5 souris *Cbx3*^{-/-} sur 8 (62,5%) et 1 WT sur 6 (17%). Ces observations suggèrent qu'HP1 γ est nécessaire pour le développement normal de la rate.

Par ailleurs, le rapport poids d'un testicule/poids de l'animal est significativement plus faible chez les mâles *Cbx3*^{-/-} que chez les mâles WT et *Cbx3*^{+/-}, indiquant que les mâles *Cbx3*^{-/-} présentent un hypogonadisme sévère (**figure 43 C**). Ces résultats suggèrent qu'HP1 γ est essentielle pour le développement normal des testicules.

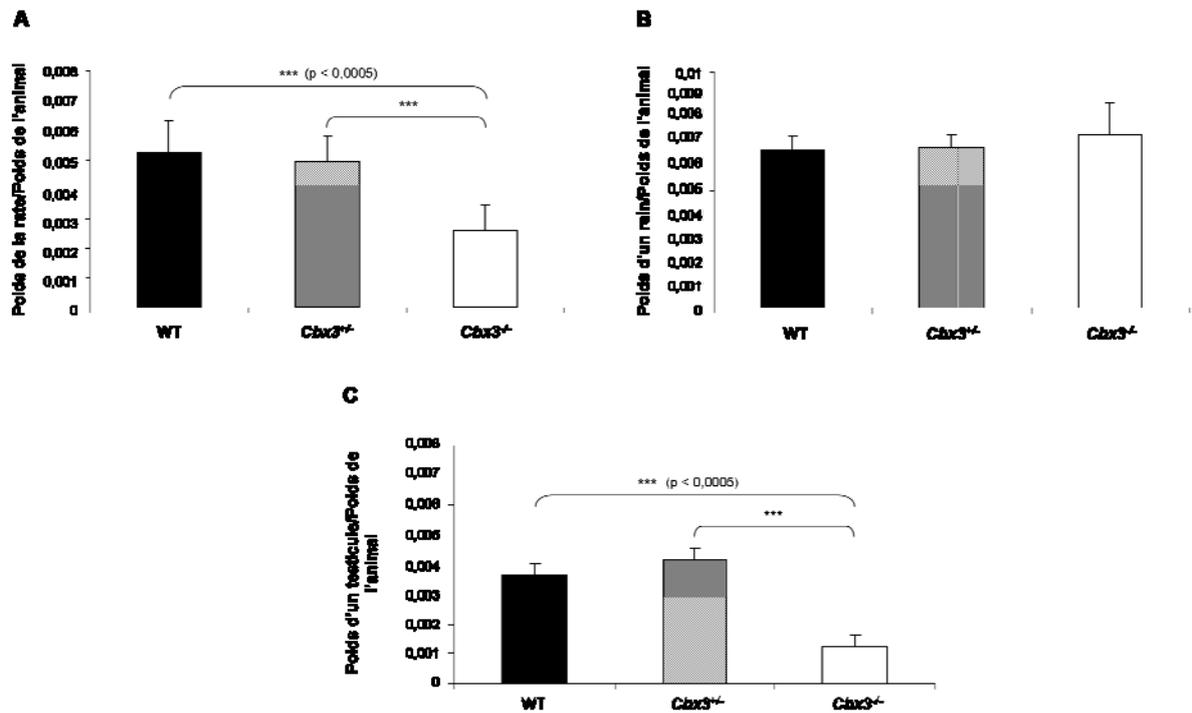


Figure 43 : Analyse du poids de la rate (A), d'un rein (B) et d'un testicule (C) chez les souris WT, *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-}. Le poids de chaque organe a été normalisé par le poids de l'animal.

III. Implication d'HP1 γ dans le système immunitaire

1. Histologie splénique des souris *Cbx3*^{-/-}

La rate est le plus grand des organes lymphoïdes secondaires et joue un rôle important au sein du système immunitaire ; la très petite taille de la rate chez les souris *Cbx3*^{-/-} pourrait donc être le signe de défauts immunitaires. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une étude histologique de la rate des souris *Cbx3*^{-/-}.

La rate des souris WT est organisée en deux zones fonctionnelles, la pulpe rouge et la pulpe blanche (**figure 44 WT**), qui sont très différentes dans leur architecture et leur composition cellulaire et accomplissent trois grandes activités (pour revues, Mebius et Kraal, 2005 ; Cesta, 2006 ; Brendolan et al., 2007). La pulpe rouge, constituant la majeure partie de la rate, assure la filtration du sang pour en éliminer les érythrocytes endommagés ou sénescents grâce à de nombreux macrophages ; elle constitue également un site d'hématopoïèse extramédullaire, c'est-à-dire qui se déroule hors de la moelle osseuse, particulièrement chez les embryons et les jeunes animaux. Les zones de pulpe blanche interviennent dans l'initiation des réactions immunitaires contre les antigènes présents dans le sang et se trouvent autour des artérioles centrales, qui font partie du système de vascularisation splénique. Chaque zone de

pulpe blanche est subdivisée en trois sous-compartiments (**figure 44 WT**) : les follicules lymphoïdes, le manchon lymphoïde périartériolaire (ou PALS : *PeriArteriolar Lymphoid Sheath*) qui entoure les follicules lymphoïdes, et la zone marginale située à l'interface entre ces deux régions et la pulpe rouge. Le PALS et les follicules lymphoïdes sont essentiellement composés de lymphocytes et sont directement impliqués dans la réponse immunitaire ; la zone marginale contient de nombreux lymphocytes ainsi que des macrophages et constitue une importante zone de transit pour les antigènes qui quittent la circulation sanguine pour entrer dans la pulpe blanche.

L'analyse histologique de la rate de 3 souris WT et 5 souris *Cbx3*^{-/-} a révélé des défauts de la pulpe blanche chez les souris *Cbx3*^{-/-} (**figure 44**), avec une pénétrance variable selon les souris. En effet, une diminution modérée à très sévère de la quantité de pulpe blanche a été observée chez 4 souris *Cbx3*^{-/-} sur 5 ; en particulier, les PALS sont beaucoup moins larges et contiennent moins de lymphocytes chez 5 souris sur 5, et les follicules lymphoïdes sont très rares ou beaucoup plus petits que ceux des WT chez 4 souris sur 5. De plus, les rates des souris *Cbx3*^{-/-} présentent des nombres réduits de macrophages et de cellules hématopoïétiques dans la pulpe rouge chez 4 souris sur 5, suggérant une altération de l'hématopoïèse extramédullaire. Ces défauts suggèrent qu'HP1 γ joue un rôle dans l'hématopoïèse extramédullaire splénique ainsi que dans les réponses immunitaires au niveau de la rate.

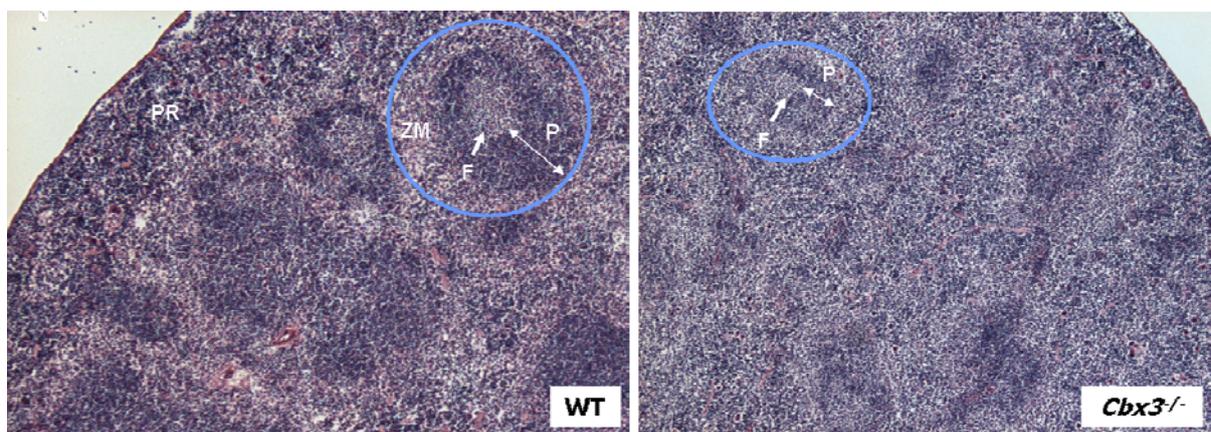


Figure 44 : Analyse histologique de la rate chez des souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Les coupes de rates colorées en hématoxyline-éosine montrent des défauts de la pulpe blanche chez les souris *Cbx3*^{-/-}. Cercles bleus : zones de pulpe blanche, F : follicule lymphoïde, P : PALS, PR : pulpe rouge, ZM : zone marginale.

2. Rôle d'HP1 γ dans l'hématopoïèse

Les anomalies de la structure splénique observées chez les souris *Cbx3*^{-/-} suggèrent des défauts hématopoïétiques ; nous avons donc analysé les proportions de différents types de cellules hématopoïétiques chez des souris WT et *Cbx3*^{-/-}.

a. Notions générales d'hématopoïèse

i. Organisation du système hématopoïétique

Le sang contient de nombreux types de cellules hématopoïétiques qui sont impliqués dans les réponses immunitaires ou le transport de l'oxygène. Tous sont générés à partir d'une cellule souche hématopoïétique multipotente, qui subit une série de restrictions progressives de ses possibilités de différenciation. La première restriction entraîne l'apparition de deux progéniteurs qui peuvent engendrer seulement certains types cellulaires : le précurseur myéloïde commun (CMP, *Common Myeloid Progenitor*) et le précurseur lymphoïde commun (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*). Le CMP peut se différencier en de nombreux types cellulaires de la lignée dite myéloïde, comme par exemple les érythrocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles ou les basophiles, alors que le CLP peut se différencier en cellules appartenant à la lignée dite lymphoïde, comme les lymphocytes B et les lymphocytes T (**figure 45**). Chez les mammifères adultes, les cellules hématopoïétiques se développent dans les organes lymphoïdes primaires : le thymus pour les lymphocytes T et la moelle osseuse pour les autres types cellulaires. Les cellules matures ou en voie de maturation colonisent ensuite les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate et les ganglions lymphatiques (Alberts et al., 2002).

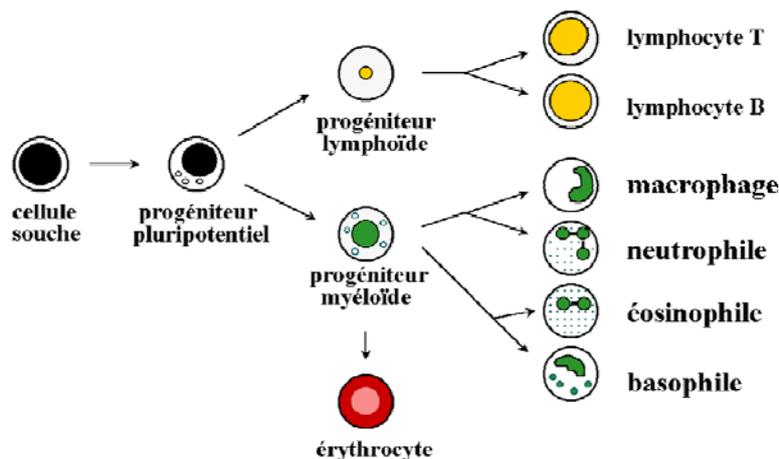


Figure 45 : Les principaux types de cellules hématopoïétiques et leurs progéniteurs (adapté de

http://www.unites.uqam.ca/biologie_moleculaire/images.html).

ii. La maturation des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont une population de cellules qui expriment clonalement divers récepteurs de surface, les BCR (*B Cell Receptor*). Les BCR sont des immunoglobulines (Ig : *Immunoglobuline*) spécifiques d'un antigène donné et ancrées à la membrane des lymphocytes, appartenant donc à l'isotype IgM (*Immunoglobuline Membranaire*) des Ig. La liaison d'un BCR à son antigène correspondant déclenche la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte, capable de produire en masse des anticorps, qui sont les formes sécrétées des Ig, spécifiques de cet antigène (pour revues, LeBien et Tedder, 2008 ; Martensson et al., 2010).

Chez les mammifères, la maturation des lymphocytes B se déroule en majeure partie dans la moelle osseuse et englobe plusieurs stades, dont les principaux sont les stades pré-pro-lymphocyte B, pro-lymphocyte B et pré-lymphocyte B. Chaque stade est caractérisé par l'expression de marqueurs particuliers à la surface des cellules (pour revue, Hardy et Hayakawa, 2001) (**figure 46**). Dans un souci de simplification, seules quelques combinaisons de marqueurs caractérisant chaque stade sont détaillées ici. Ainsi, les cellules du stade pré-pro-lymphocyte B, qui correspondent à la restriction des CLP à la lignée des lymphocytes B, montrent l'expression des marqueurs B220 et CD43 ; elles sont dites du phénotype « B220⁺CD43⁺ ». D'autre part, les cellules des stades pro-lymphocyte B et pré-lymphocyte B présentent les profils d'expression B220⁺CD43⁺CD19⁺ et B220⁺CD43⁺CD19⁺BP-1⁺, respectivement. De plus, des réarrangements génomiques ordonnés se produisent au niveau des loci codant pour les chaînes d'immunoglobulines aux stades pro- et pré-lymphocytes B, ce qui permet de produire le BCR et entraîne ainsi l'expression par les cellules du marqueur IgM. Après le stade pré-lymphocyte B, les lymphocytes B immatures quittent la moelle osseuse pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, où ils achèvent leur maturation fonctionnelle ; cependant, la maturation terminale des lymphocytes B a également été mise en évidence dans la moelle osseuse (Cariappa et al., 2007). Les lymphocytes B matures acquièrent l'expression du marqueur IgD, un autre type d'immunoglobuline ; ils sont ainsi caractérisés par le phénotype B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺.

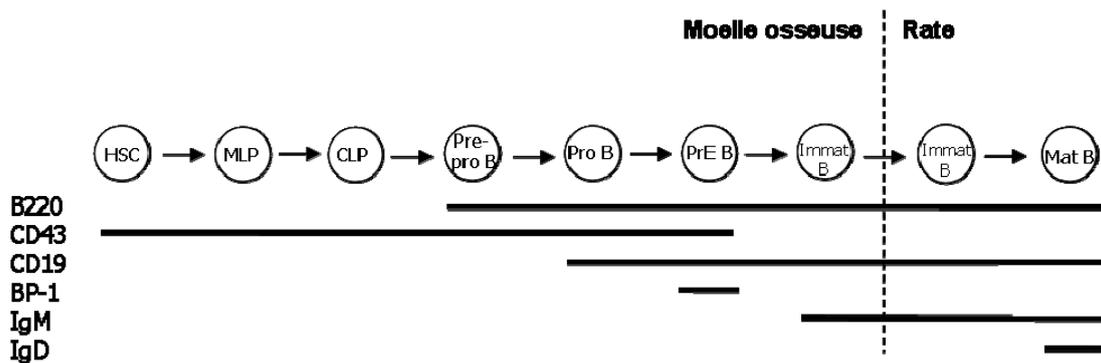


Figure 46 : Les principaux stades de maturation des lymphocytes B et leurs marqueurs de surface associés (adapté de Hardy et Hayakawa, 2001 ; Martensson et al., 2010).

iii. La maturation des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont d'autres acteurs de la réponse immunitaire dont les rôles sont complémentaires à ceux des lymphocytes B. En effet, il existe deux classes fonctionnellement différentes de lymphocytes T : les lymphocytes Tc (*T cytotoxic*) tuent les cellules infectées par un virus ou un autre pathogène intracellulaire, et les lymphocytes Th (*T helper*) sécrètent de nombreuses protéines de signal ou cytokines, qui stimulent l'activation des lymphocytes B, des lymphocytes Tc et de cellules phagocytaires appelées macrophages (Alberts et al., 2002).

Le développement des lymphocytes T nécessite la migration, de la moelle osseuse vers le thymus, d'un progéniteur multipotent de la lignée des lymphocytes T, dont la nature est encore controversée. Ce progéniteur passe alors par plusieurs stades de maturation caractérisés, entre autres, par l'expression différentielle de deux marqueurs à la surface des cellules, CD4 et CD8 (**figure 47**). Les cellules du premier stade, dit DN (*Double Negative*), n'expriment ni CD4 ni CD8 ; de plus, elles subissent des réarrangements génomiques qui permettent de produire le TCR (*T Cell Receptor*), un récepteur spécifique d'un antigène donné similaire à un BCR. Au cours du stade de maturation suivant, appelé DP (*Double Positive*), les cellules expriment à la fois CD4 et CD8 ; enfin, lors du stade terminal SP (*Single Positive*), elles se différencient soit en lymphocytes Tc, qui montrent le profil d'expression $CD4^-CD8^+$, soit en lymphocytes Th présentant le profil $CD4^+CD8^-$ (pour revues, Rothenberg et Taghon, 2005 ; Vicente et al., 2010).

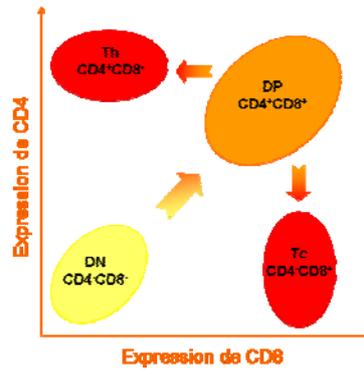


Figure 47 : Expression de CD4 et CD8 au cours des principaux stades de maturation des lymphocytes T.

b. Implication d'HP1 γ dans l'hématopoïèse

i. Analyse de souris *Cbx3*^{-/-} adultes

Afin d'approfondir l'étude du rôle d'HP1 γ dans l'hématopoïèse, nous avons réalisé des analyses de populations de cellules sanguines par cytométrie en flux ou FACS (*Fluorescence Assisted Cell Sorting*) sur 4 souris WT et 4 souris *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines, âge auquel le système immunitaire est stabilisé chez la souris. Lors de la dissection, contrairement aux souris analysées à 4 semaines, la rate des souris *Cbx3*^{-/-} ne semblait pas atrophiée et était rarement nécrosée, suggérant une compensation de ce phénotype avec le temps. L'analyse par FACS a montré chez les souris *Cbx3*^{-/-} une diminution significative, par rapport aux souris WT, des lymphocytes T de classe Th spécifiquement dans la rate, mais pas dans le thymus, laissant supposer un défaut de migration de ces cellules vers la rate (**figure 48**). Dans la moelle osseuse, nous avons également observé une diminution significative, chez les souris *Cbx3*^{-/-}, de deux populations de cellules. La première montre le profil d'expression B220⁻CD43⁺ ; le marqueur CD43 étant exprimé par de nombreux types cellulaires dans la moelle osseuse, comme des lymphocytes B immatures, des neutrophiles et des macrophages, il est difficile de déterminer ce que représente cet ensemble. La deuxième population montre le profil d'expression B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺, caractéristique de lymphocytes B matures (**figure 48**). Par ailleurs, l'étude dans la rate et la moelle osseuse des populations d'érythrocytes, de neutrophiles et de macrophages, ainsi que l'analyse dans le thymus et les ganglions lymphatiques de différents stades de maturation de lymphocytes T, n'ont pas révélé de différences reproductibles entre les souris WT et *Cbx3*^{-/-} (résultats non montrés). Nos résultats suggèrent qu'HP1 γ intervient dans les étapes de maturation finale des lymphocytes B dans la moelle osseuse, ainsi que dans la migration et/ou la rétention des lymphocytes Th au niveau de la rate.

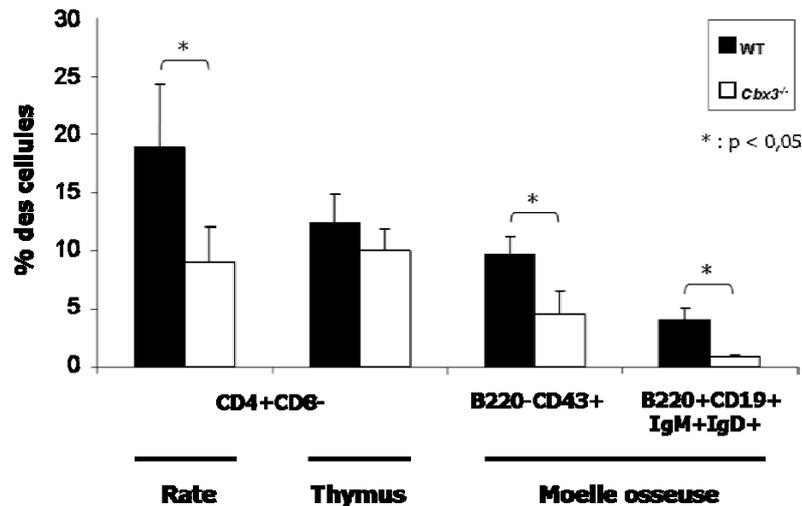


Figure 48 : Analyse des cellules hématopoïétiques chez les souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules lymphoïdes de chaque organe.

Le phénotype concernant la taille de la rate des souris *Cbx3*^{-/-} semblant être compensé avec le temps, nous avons également effectué cette analyse par FACS sur 1 souris *Cbx3*^{-/-} de 4 mois et 2 souris *Cbx3*^{-/-} de 10 mois avec leurs contrôles WT, afin de voir si le phénotype observé au niveau des populations de cellules hématopoïétiques évolue avec l'âge des souris ; nous n'avons pas retrouvé les défauts observés chez les souris *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines (résultats non montrés), ce qui indique que ce phénotype est compensé avec le temps.

ii. Analyse d'embryons *Cbx3*^{-/-} à E18,5

Le fait que le phénotype concernant les populations de cellules hématopoïétiques perd en sévérité avec le temps suggère qu'il pourrait être plus drastique au niveau embryonnaire que chez les souris *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines, pouvant peut-être expliquer la létalité embryonnaire et/ou périnatale des souris *Cbx3*^{-/-}. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné 6 embryons WT et 9 embryons *Cbx3*^{-/-} à E18,5, c'est-à-dire juste avant la première vague de mortalité des souris *Cbx3*^{-/-} ; nous avons analysé par FACS les populations hématopoïétiques présentes dans le thymus et le foie des embryons, car à ce stade de l'embryogenèse l'hématopoïèse se déroule principalement dans le thymus pour les lymphocytes T et dans le foie pour les autres types cellulaires hématopoïétiques (pour revue, Cumano et Godin, 2007). De façon intéressante, nous avons observé qu'environ 20% des embryons *Cbx3*^{-/-} présentaient une coloration très pâle comparés aux autres mutants et aux WT (**figure 49 A**), suggérant une sévère anémie sanguine chez ces embryons et donc un défaut de cellules hématopoïétiques.

Nous avons donc comparé les populations de cellules hématopoïétiques entre les embryons WT et les embryons *Cbx3*^{-/-} « pâles » et « non pâles ». La comparaison entre les embryons WT et *Cbx3*^{-/-} « non pâles » pour différentes populations hématopoïétiques du foie n'a pas montré de différences significatives, sauf dans le cas d'une population de cellules exprimant IgM et B220, qui correspond à des lymphocytes B en fin de maturation (**figure 49 B et C**). En revanche, les embryons pâles présentent une diminution de plusieurs sous-populations de lymphocytes B du foie correspondant à différents stades de maturation, par rapport aux embryons WT et aux autres embryons *Cbx3*^{-/-} (**figure 49 B et C**).

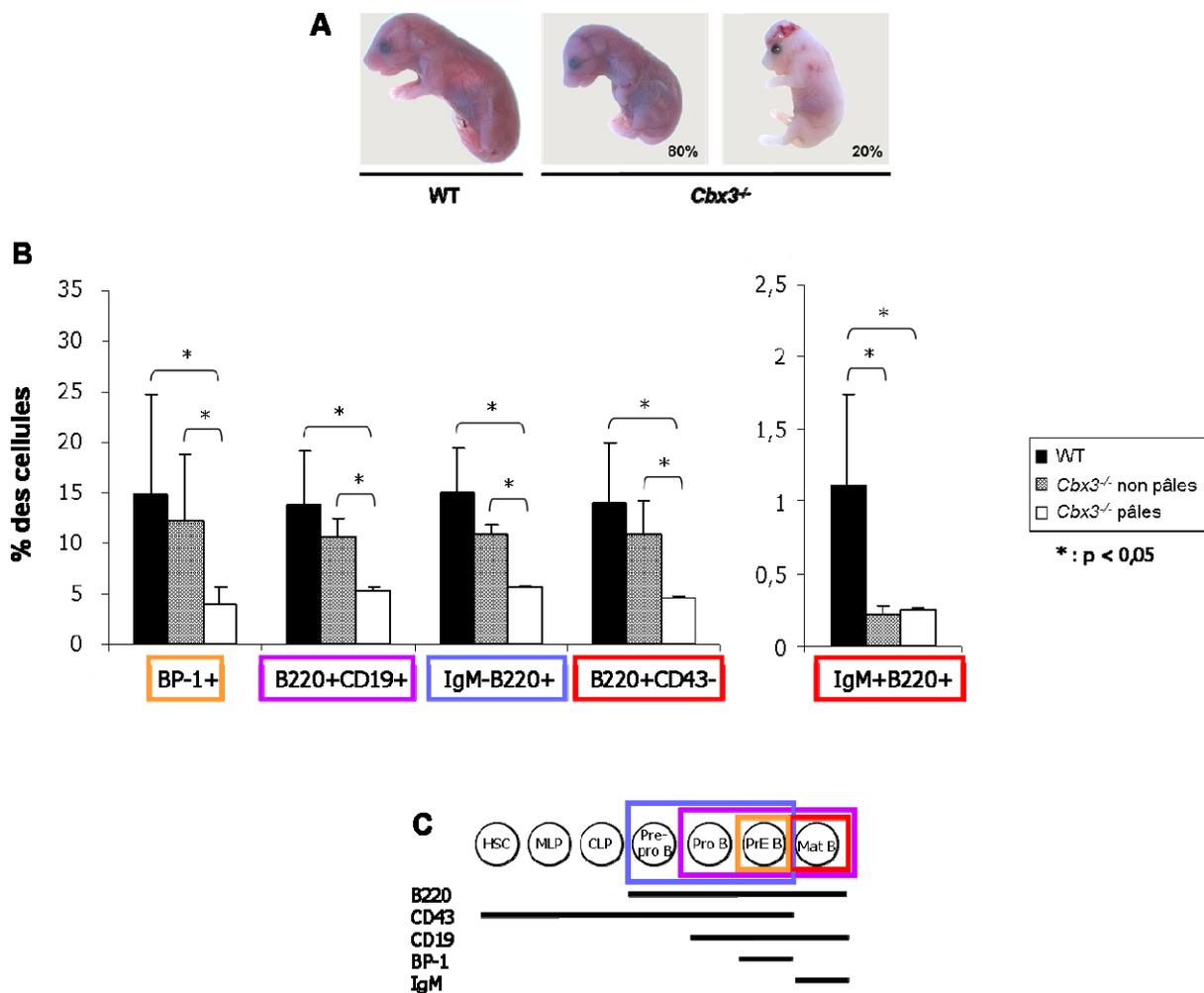


Figure 49 : Analyse des cellules hématopoïétiques chez des embryons WT, *Cbx3*^{-/-} non pâles et *Cbx3*^{-/-} pâles. A : différentes populations d'embryons *Cbx3*^{-/-} observées à E18,5. B : diminution de plusieurs populations de cellules hématopoïétiques chez des embryons *Cbx3*^{-/-} pâles et non pâles comparés aux WT ; les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules lymphoïdes du foie. C : place dans le processus de maturation des lymphocytes B des populations hématopoïétiques mises en évidence dans la figure B.

Aucune différence significative n'a été observée dans l'analyse du thymus entre les embryons des différents génotypes (résultats non montrés). Ainsi, HP1 γ semble avoir des fonctions importantes dans les étapes finales de maturation des lymphocytes B dès le stade embryonnaire, avec cependant une certaine variabilité d'un embryon à l'autre. Nos résultats suggèrent également que les sévères défauts du système immunitaires observés chez les embryons *Cbx3*^{-/-} « pâles » pourraient être à l'origine d'une plus grande fragilité de ces embryons, favorisant ainsi leur mortalité ; toutefois, étant donné la faible proportion des embryons *Cbx3*^{-/-} « pâles » (environ 20%), cette interprétation n'explique pas entièrement le phénotype de mortalité *in utero* et périnatale des embryons *Cbx3*^{-/-}.

3. Rôle d'HP1 γ dans la recombinaison de classe

Dans la suite de cette partie du projet, nous avons décidé de nous concentrer sur la population de souris *Cbx3*^{-/-} qui survivent au moins 4 semaines. Nous avons voulu savoir si les lymphocytes B des souris *Cbx3*^{-/-}, qui sont affectés au moment de leur maturation, peuvent également l'être au niveau de leur rôle dans les réponses immunitaires. De façon intéressante, il a été montré que la marque H3K9 triméthylée, site de liaison des protéines HP1, est associée aux régions génomiques subissant un processus appelé recombinaison de classe ou CSR (*Class Switch Recombination*) ; ce processus, qui est spécifique des lymphocytes B, est essentiel lors de l'induction de la réponse immunitaire (Kuang et al., 2009). Nous avons donc testé l'efficacité de la CSR chez les souris *Cbx3*^{-/-}.

a. Généralités sur la recombinaison de classe

Nous avons vu qu'un clone de lymphocytes B matures exprime un BCR spécifique d'un antigène donné, et peut se différencier en plasmocytes produisant les anticorps correspondants. Le BCR et les anticorps sont des Ig composées de quatre sous-unités : deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques. La région N-terminale des chaînes, appelée région V, contient le site de liaison aux antigènes et définit la spécificité de l'anticorps vis-à-vis d'un antigène donné ; cette région est donc hautement variable d'un clone de lymphocytes B à l'autre. La partie C-terminale, appelée région C, est constante ; la région C des chaînes lourdes (*C_H*, *Constant Heavy*) détermine les fonctions effectrices des anticorps. La région V des Ig est constituée de trois segments V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) assemblés lors de réarrangements génomiques regroupés sous le nom de recombinaison V(D)J, qui se produisent au cours du développement des lymphocytes B (pour revue, Perlot et Alt, 2008).

A la fin de leur maturation, les lymphocytes B migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent rencontrer l'antigène dont leur BCR est spécifique, ce qui entraîne leur activation. Cette activation déclenche la prolifération clonale des lymphocytes B, qui est essentielle pour l'induction d'une autre forme de réarrangement génomique appelée recombinaison de classe ou CSR, un processus permettant la génération d'anticorps qui partagent la même région V mais diffèrent par leurs régions C_H. En effet, le locus de la chaîne lourde des Ig comporte, en 3' de la région V, 8 gènes codant pour la région C_H : C_μ, C_δ, C_{γ3}, C_{γ1}, C_{γ2α}, C_{γ2β}, C_ε et C_α, chacun associé à une fonction effectrice particulière. Chaque gène C_H, à l'exception de C_δ, est précédé de séquences spécialisées d'ADN appelées régions S (*Switch*). Le mécanisme de CSR requiert une enzyme spécifique des lymphocytes B activés, AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*), dont l'activité induit des cassures double brin dans la région S située en 5' de C_μ, S_μ, et dans une autre région S du locus ; la recombinaison de ces deux régions entraîne la délétion des régions intermédiaires, incluant C_μ (**figure 50**). La région V peut se trouver ainsi juxtaposée à différents gènes C_H, ce qui entraîne la production, dans un même clone de plasmocytes, d'anticorps ayant la même spécificité de région V pour un antigène donné mais des fonctions effectrices différentes, selon l'isotype (IgG3, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgE ou IgA) auquel appartiennent leurs régions C_H (pour revues, Chaudhuri et Alt, 2004 ; Stavnezer et al., 2008).

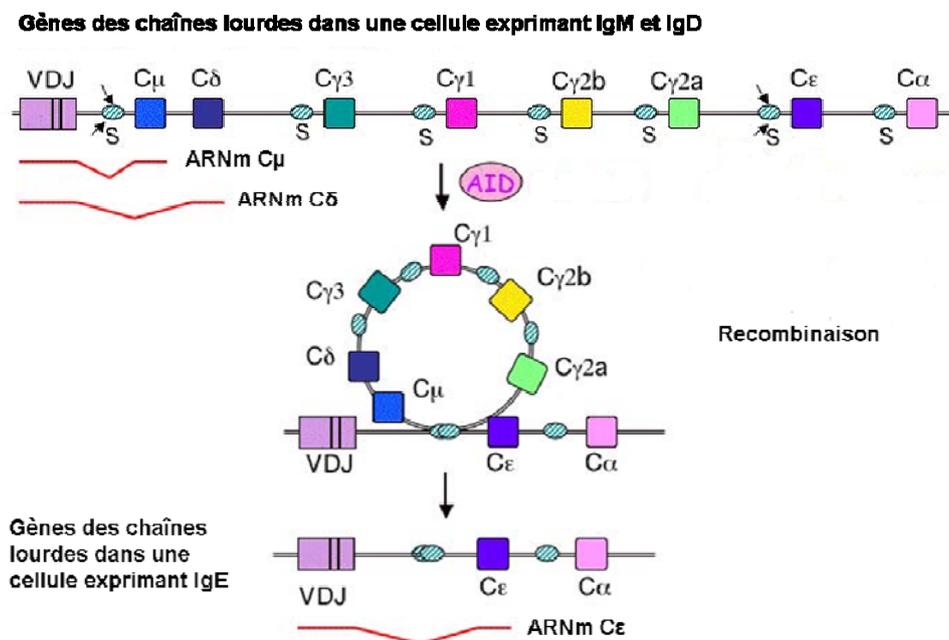


Figure 50 : Le mécanisme de la CSR (adapté de <http://www.umassmed.edu>).

b. Rôle d'HP1 γ dans la CSR

i. Analyse des souris *Cbx3*^{-/-}

Nous avons testé l'efficacité de la CSR chez les souris *Cbx3*^{-/-} grâce à des expériences de culture *ex vivo* de lymphocytes B spléniques, sous différentes stimulations induisant l'expression des isotypes d'anticorps IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3, analysable ensuite par FACS. Afin de mesurer la prolifération des lymphocytes B, qui est indispensable à la CSR, nous avons également effectué un marquage CFSE (*CarboxyFluorescein diacetate, Succinimidyl Ester*). L'analyse de souris *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} âgées de 6 à 8 semaines a montré que chez 1 souris *Cbx3*^{-/-} sur 3, la proportion de cellules exprimant l'isotype IgG1 après stimulation est diminuée d'environ 60% par rapport à celle du contrôle *Cbx3*^{+/-} (**figure 51 A**). De façon importante, le marquage CFSE indique que la prolifération des lymphocytes B est similaire entre les souris *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} (**figure 51 B**) ; ainsi, cette diminution ne semble pas être causée par un défaut de prolifération des lymphocytes B. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les souris *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} concernant les autres isotypes d'anticorps analysés (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent qu'HP1 γ joue un rôle dans la CSR spécifiquement pour l'isotype IgG1, mais que ce rôle est variable d'un animal à l'autre.

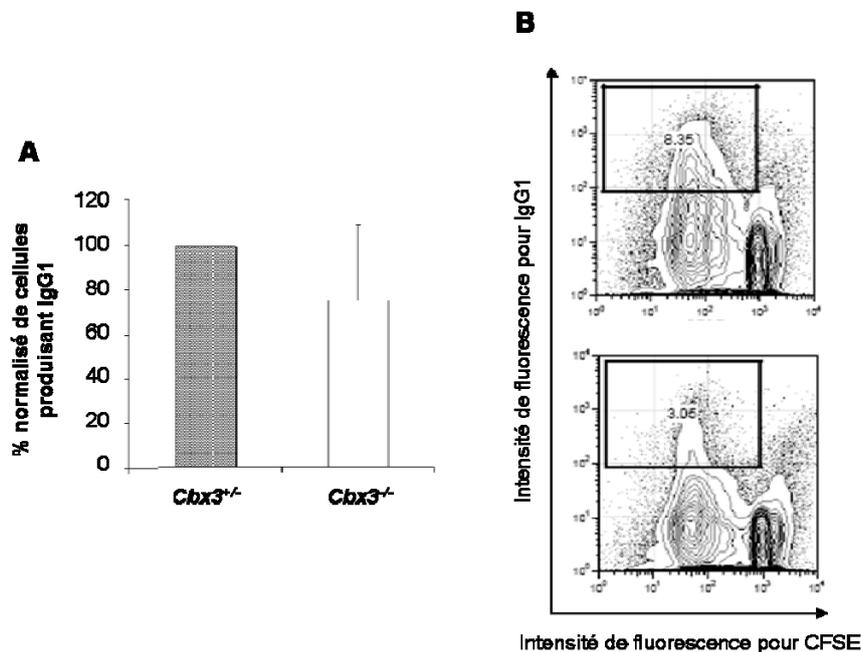


Figure 51 : Analyse de la production de cellules exprimant IgG1 chez des souris *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} adultes. A : les souris *Cbx3*^{-/-} montrent une diminution très variable de la proportion de cellules exprimant IgG1 (normalisée par rapport à celle du contrôle *Cbx3*^{+/-}) après stimulation *ex vivo* des lymphocytes B matures. B : la diminution de la proportion de cellules produisant IgG1 (encadrées) chez les souris *Cbx3*^{-/-} n'est pas causée par un blocage de la prolifération cellulaire, mise en évidence par la diminution d'intensité de fluorescence pour le CFSE.

Plusieurs de nos résultats semblent suggérer que les phénotypes causés par l'inactivation de *Cbx3* évoluent vers la compensation au cours du temps. Nous avons donc voulu savoir si le phénotype de CSR observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} adultes était plus sévère et/ou pénétrant chez des animaux plus jeunes, et donc s'il peut également être évolutif. Pour répondre à cette question, nous avons analysé 12 souris *Cbx3*^{-/-} de 4 semaines, l'âge auquel certaines de nos souris *Cbx3*^{-/-} meurent ; nous avons classé les résultats en phénotypes après stimulation « sévère » ou « léger », en établissant la limite entre les deux catégories à 40% de cellules exprimant IgG1, le niveau observé chez la souris montrant un phénotype au cours de notre expérience précédente. Les résultats ont montré que 33% des souris *Cbx3*^{-/-} (4 souris sur 12) ont un phénotype « sévère » concernant la production d'IgG1 (de 3 à 27% de la production d'IgG1 du WT), et 66% des souris *Cbx3*^{-/-} ont un phénotype « léger » (de 69 à 116% de la production d'IgG1 du WT). Pour les deux groupes, nous n'avons pas observé de défaut de prolifération des lymphocytes, ni d'altération significative dans la production des autres isotypes d'anticorps (**figure 52**). Le phénotype de CSR ne semble donc pas plus pénétrant à 4 semaines que chez les souris adultes, mais les souris présentant un phénotype « sévère » sont davantage affectées. Ces résultats suggèrent soit que ce phénotype évolue vers la compensation avec l'âge des souris, soit que les souris très affectées au niveau de la CSR meurent vers l'âge de 4 semaines. Ainsi, HP1 γ semble impliquée dans la CSR, en particulier pour la production d'IgG1, mais cette fonction semble très variable d'une souris à l'autre.

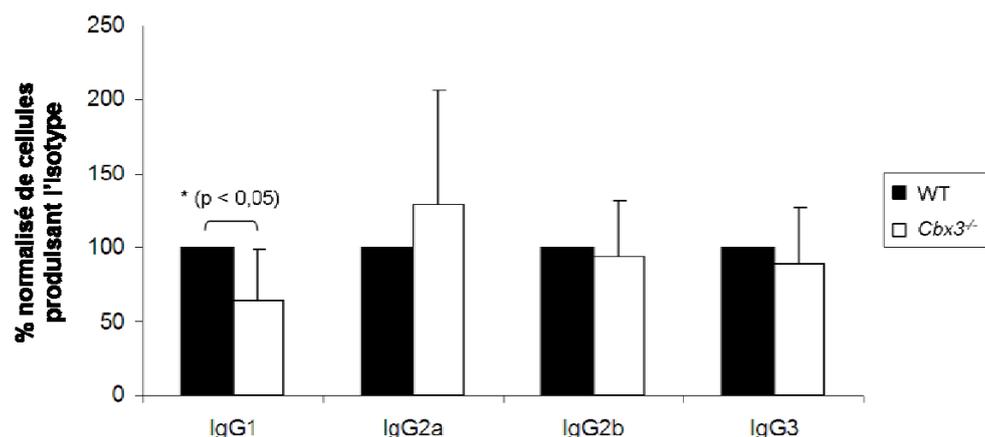


Figure 52 : Analyse de la production de cellules exprimant différents isotypes d'IgG chez des souris WT et *Cbx3*^{-/-} de 4 semaines. Les souris *Cbx3*^{-/-} montrent une diminution très variable de la proportion de cellules exprimant IgG1 (normalisée par rapport à celle du contrôle WT) après stimulation *ex vivo* des lymphocytes B matures.

ii. Analyse des souris $Cbx3^{LB/-}$

Afin de déterminer si le défaut observé dans les lymphocytes B est cellulaire-autonome, nous avons généré des souris chez lesquelles $Cbx3$ est inactivé spécifiquement dans les lymphocytes B en cours de maturation grâce à l'utilisation de souris $CD19-Cre^{tg/0}$, qui expriment la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur du gène $CD19$, actif uniquement dans les lymphocytes B en développement (Rickert et al., 1997).

- Obtention des souris $Cbx3^{LB/-}$

Nous avons croisé des souris $CD19-Cre^{tg/0}$, exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur du gène $CD19$, avec des souris $Cbx3^{+/-}$ pour produire des souris $CD19-Cre^{tg/0}/Cbx3^{+/-}$. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris $Cbx3^{L2/L2}$, chez lesquelles les deux allèles de $Cbx3$ sont floxés, pour obtenir des souris $CD19-Cre^{tg/0}/Cbx3^{L2/-}$ et des souris contrôles $CD19-Cre^{tg/0}/Cbx3^{L2/+}$; elles seront par la suite appelées souris $Cbx3^{LB/-}$ et $Cbx3^{LB+/-}$, respectivement. Nous avons évalué chez ces souris l'efficacité de l'excision de l'allèle $L2$ de $Cbx3$ par PCR sur de l'ADN génomique de lymphocytes B matures purifiés. Le résultat montre que le produit de PCR correspondant à l'allèle $L-$ est amplifié chez les souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB/-}$ alors que le produit correspondant à l'allèle $L2$ n'est pas amplifié, indiquant que l'excision est complète dans les lymphocytes B matures (**figure 53**). De plus, le produit correspondant à l'allèle $L-$ n'est pas amplifié dans des biopsies de queues de souris $Cbx3^{LB+/-}$, suggérant que l'excision est spécifique des lymphocytes B (**figure 53**).

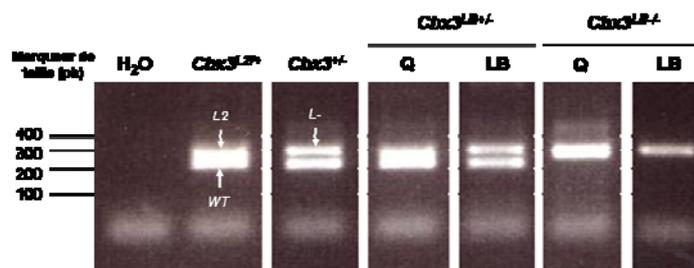


Figure 53 : Analyse de l'efficacité et de la spécificité de l'excision de l'allèle $L2$ chez les souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB/-}$. PCR sur ADN génomique de biopsies de queues (Q) ou de lymphocytes B matures purifiés (LB) de souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB/-}$. $L2$, WT , $L-$: produits de PCR résultant de l'amplification des allèles $L2$, WT , et $L-$ de $Cbx3$, respectivement.

Afin d'évaluer l'efficacité au niveau protéique de l'excision de l'allèle $L2$, nous avons réalisé un western blot anti-HP1 γ sur des extraits protéiques issus de lymphocytes B matures

purifiés de souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB-/-}$. Aucun signal n'a été observé pour l'échantillon issu d'une souris $Cbx3^{LB-/-}$ (**figure 54**), indiquant que l'inactivation de $Cbx3$ est bien totale au niveau protéique dans les lymphocytes B matures.

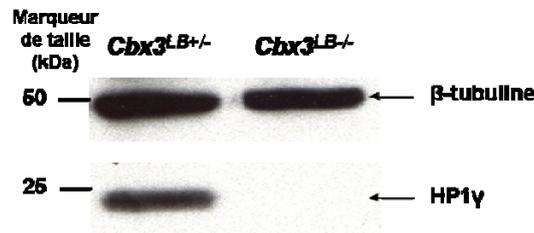


Figure 54 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de $Cbx3$ dans les lymphocytes B matures. Western blot anti-HP1 γ sur des extraits protéiques de lymphocytes B matures purifiés de souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB-/-}$. Une hybridation anti- β -tubulline a également été réalisée comme contrôle de charge protéique.

- Analyse de la CSR chez les souris $Cbx3^{LB-/-}$

Nous avons réalisé la même étude de la CSR chez les souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB-/-}$ que chez les souris WT et $Cbx3^{-/-}$. L'analyse de 3 souris contrôles $Cbx3^{LB+/-}$ et 4 souris $Cbx3^{LB-/-}$ adultes n'a pas montré de différence significative, entre les souris de ces génotypes, dans la proportion de cellules exprimant IgG1 après stimulation (**figure 55**), indiquant que le rôle d'HP1 γ dans la CSR n'est pas intrinsèque aux lymphocytes B matures.

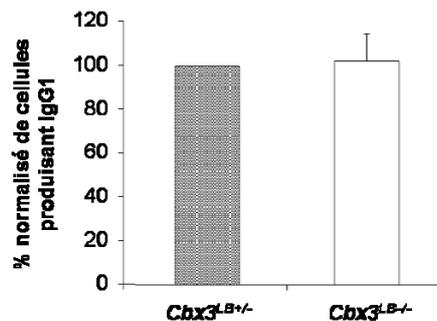


Figure 55 : Analyse de la production de cellules exprimant IgG1 chez des souris $Cbx3^{LB+/-}$ et $Cbx3^{LB-/-}$ adultes. Les souris $Cbx3^{LB-/-}$ montrent une proportion de cellules exprimant IgG1 (normalisée par rapport à celle du contrôle $Cbx3^{LB+/-}$) similaire à celle du contrôle après stimulation *ex vivo* des lymphocytes B matures.

La grande variabilité observée pour le phénotype de CSR ainsi que le taux élevé de mortalité des souris $Cbx3^{-/-}$ rendant très difficile une caractérisation plus poussée de ce phénotype, nous nous sommes concentrées dans la suite de ce travail sur les conséquences de l'inactivation de $Cbx3$ au niveau de la spermatogenèse.

IV. Discussion

1. Rôle d'HP1 γ dans la survie des souris

Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié les conséquences physiologiques de l'inactivation du gène *Cbx3*, dans le but de comprendre les fonctions *in vivo* d'HP1 γ , la protéine codée par ce gène. L'un des premiers phénotypes observés était qu'une importante proportion de souris *Cbx3*^{-/-} meurent avant l'âge adulte, au cours de trois grandes vagues de mortalité : *in utero* entre E18,5 et la naissance, juste après la naissance et vers l'âge de 3 ou 4 semaines, indiquant qu'HP1 γ est cruciale pour la survie des souris.

De façon intéressante, les deux dernières vagues de mortalité coïncident avec des étapes du développement pendant lesquels les rapports entre la mère et les souriceaux sont modifiés : la vague de mortalité périnatale coïncide avec la rupture du cordon ombilical lors de la mise bas, et la vague de mortalité entre 3 et 4 semaines coïncide avec le sevrage. Une fonction importante du lien entre la mère et les petits, que ce soit *via* le cordon ombilical ou l'allaitement, est la transmission aux petits d'anticorps leur permettant de renforcer leur système immunitaire en développement durant les premières semaines de vie (pour revues, Mestecky et Russell, 1998 ; Van de Perre, 2003). Il est envisageable que les souris *Cbx3*^{-/-} présentent des déficiences immunitaires, compensées lors de la gestation et au début du développement post-natal par le lien avec la mère, mais qui seraient brutalement révélées au moment de la rupture de ce lien, fragilisant l'organisme et ayant ainsi une influence néfaste sur la viabilité. En lien avec cette interprétation, nous avons effectivement montré que les embryons *Cbx3*^{-/-} présentent un déficit de lymphocytes B matures, et qu'une sous-population d'embryons *Cbx3*^{-/-} montre des défauts immunitaires plus graves ; les embryons de cette sous-population font probablement partie de ceux qui meurent entre E18,5 et la naissance ou au stade périnatal. Ces résultats impliquent qu'HP1 γ est nécessaire à la maturation des lymphocytes B. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre une lymphopoïèse défaillante et une létalité embryonnaire ou périnatale : par exemple, il a été montré que des souris déficientes en enzymes impliquées dans la voie de réparation NHEJ (*Non Homologous End Joining*) montrent un manque de lymphocytes B et T ainsi qu'une sensibilité accrue aux radiations ionisantes ; ces défauts sont associés à une forte létalité embryonnaire (Karanjawala et al., 2002). Les liens entre létalité et déficit de lymphocytes B spécifiquement sont plus rares ; cependant, une étude a mis en évidence que des souris portant une mutation dans le gène *Syk* (*Spleen tyrosine kinase*), codant pour une tyrosine kinase cytoplasmique, montrent un blocage de différenciation des lymphocytes B au-delà du stade pro-lymphocyte B associé à

une létalité périnatale (Cheng et al., 1995 ; Turner et al., 1995). Ainsi, on pourrait supposer que les défauts immunitaires observés chez les embryons *Cbx3*^{-/-} à E18,5 et la mortalité de ces embryons au stade périnatal sont liés. Cependant, la majorité des embryons *Cbx3*^{-/-} présentent un phénotype beaucoup moins sévère que les souris des études précédemment citées, et la proportion d'embryons ou de souriceaux *Cbx3*^{-/-} montrant les défauts immunitaires les plus graves (20% des embryons *Cbx3*^{-/-} à E18,5) est très inférieure à la proportion d'embryons *Cbx3*^{-/-} qui meurent au stade périnatal (80% au total). Bien que l'analyse d'un plus grand nombre d'embryons *Cbx3*^{-/-} montrant ce phénotype sévère doive être réalisée afin d'obtenir une statistique plus conséquente, la faible pénétrance du phénotype immunitaire que nous observons suggère que les défauts immunitaires pourraient ne pas être la cause première de la mortalité des embryons *Cbx3*^{-/-} à ces moments du développement, mais plutôt un facteur de fragilisation contribuant à cette mortalité ; la cause de la mortalité pré- et postnatale des embryons *Cbx3*^{-/-} reste donc à déterminer.

D'autres hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette mortalité, comme par exemple un défaut respiratoire : ainsi, il a été montré que des souris déficientes en *Etl1*, une protéine nucléaire appartenant à la famille SWI/SNF, présentent une importante létalité péri- et postnatale et montrent un volume thoracique sévèrement réduit, qui pourrait conduire à des défauts de ventilation et contribuer à la létalité périnatale (Schoor et al., 1999). Une autre étude a montré que la létalité périnatale peut effectivement être causée par un défaut d'initiation de la respiration au moment de la naissance (Li et Hoyle, 2001). Le phénotype de létalité périnatale a également été relié à des défauts cardiaques. De façon intéressante, des souris déficientes en *CXCR7* (*C-X-C motif Receptor 7*), un récepteur de chémokines, présentent un phénotype rappelant fortement celui des souris *Cbx3*^{-/-} : la population d'embryons *Cxcr7*^{-/-} à E18,5 est très hétérogène, comportant des embryons normaux anatomiquement ainsi que des embryons pâles dans un sac embryonnaire rempli de sang. De plus, les embryons *Cxcr7*^{-/-} montrent une létalité embryonnaire autour de E18 ou juste après la naissance, qui a été corrélée à des défauts de développement des valves cardiaques (Yu et al., 2011). Une létalité dans les premières semaines post-natales a également été associée à une cardiomyopathie mitochondriale (Freyer et al., 2010) ainsi qu'à des anomalies neurologiques et intestinales (Pritchard et al., 1996). Des analyses anatomiques et histologiques plus poussées d'embryons *Cbx3*^{-/-} entre E18,5 et la naissance, mais aussi de souriceaux nouveau-nés et de souris entre 3 et 4 semaines, seront nécessaires afin de mieux caractériser la ou les causes de mortalité des souris *Cbx3*^{-/-} et donc le rôle d'HP1 γ dans la survie des souris.

2. Rôle d'HP1 γ dans la croissance des souris

Par ailleurs, les souris *Cbx3*^{-/-} présentent un important retard de croissance au cours de leurs premières semaines de vie. Ce retard est rattrapé au bout de quelques semaines, suggérant qu'HP1 γ est nécessaire pour la croissance normale des souris durant leurs premières semaines de vie. Un tel défaut pourrait être expliqué par une dérégulation hormonale ; plusieurs défauts de croissance chez l'homme ont en effet été attribués à une dérégulation des sécrétions hormonales par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Par exemple, un déficit du facteur de transcription LHX3 (*LIM Homeobox 3*) et un défaut d'hormone de croissance, deux produits de sécrétion de l'hypophyse, ont été identifiés chez des patients montrant un retard de croissance (pour revue, Mullis, 2005). Un dosage d'hormones hypophysaires pourra donc être réalisé chez les souris *Cbx3*^{-/-}, ainsi qu'une caractérisation histologique et immunohistochimique de leur axe hypothalamo-hypophysaire.

3. Rôle d'HP1 γ dans la migration splénique des lymphocytes Th

La diminution de lymphocytes Th visible spécifiquement dans la rate des souris *Cbx3*^{-/-}, et non au niveau du thymus, suggère que la maturation des lymphocytes Th est normale chez les souris *Cbx3*^{-/-} mais que ces lymphocytes ne peuvent pas migrer au niveau de la rate et/ou y être retenus ; ces résultats impliquent qu'HP1 γ est essentielle au processus de migration splénique des lymphocytes Th.

Le fait que de tels défauts ne soient pas observés au niveau d'autres organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques suggère l'existence de mécanismes de migration des lymphocytes Th spécifiques de la rate, auxquels participerait HP1 γ . De façon intéressante, la migration des lymphocytes T vers chaque organe lymphoïde secondaire, ou au niveau d'une lésion dans le cadre d'une réponse immunitaire, est contrôlée par des codes d'adressage spécifiques faisant intervenir des combinaisons uniques de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chémokines, mais aussi de lipides chémoattractants (pour revues, von Andrian et Mackay, 2000 ; Ward, 2006). L'acheminement des lymphocytes T au sein des ganglions lymphatiques est assuré par des vaisseaux sanguins spécialisés, les veinules endothéliales, et les lymphocytes migrent dans le tissu vasculaire grâce au phénomène de diapédèse impliquant la traversée de la paroi de ces vaisseaux sanguins. Les événements moléculaires intervenant dans cette migration sont bien caractérisés et impliquent des sélectines, des chémokines et des intégrines, ainsi qu'un réseau de cellules réticulaires fibroblastiques soutenant physiquement la migration des lymphocytes T (Bajénoff et al., 2006). Cependant, les mécanismes gouvernant la migration des lymphocytes T de la

circulation sanguine à l'intérieur de la rate sont beaucoup moins bien caractérisés. Il a été montré que certaines chémokines, communes à plusieurs organes lymphoïdes, sont également nécessaires à la navigation des lymphocytes dans la rate ; en effet, une déficience en chémokines CXCR5 ou CCR7 (*C-C motif Receptor 7*) perturbe sévèrement l'architecture splénique (Förster et al., 1996 ; Förster et al., 1999). D'autres aspects du mécanisme de migration semblent toutefois différents entre la rate et les ganglions lymphatiques. La rate ne comporte en effet pas de veinules endothéliales, et la migration splénique des lymphocytes T semble assurée exclusivement *via* le support d'un réseau de cellules réticulaires fibroblastiques (Bajénoff et al., 2008) ; de plus, une étude a montré que la migration des lymphocytes T vers la pulpe blanche de la rate implique des molécules de surface, probablement des intégrines, qui sont différentes des récepteurs impliqués dans la migration vers les ganglions lymphatiques (Nolte et al., 2002). Ces molécules de surface sont à l'heure actuelle très mal caractérisées, mais il est envisageable qu'HP1 γ régule positivement l'expression de certains de leurs gènes. A l'inverse, HP1 γ pourrait réguler négativement l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués spécifiquement dans la migration des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques. Etant donné le rôle des protéines de la famille HP1 dans la formation d'hétérochromatine, un tel mode de régulation pourrait impliquer l'hétérochromatinisation de ces gènes, comme cela a été montré pour les gènes spécifiques des lymphocytes T *CD4* et *CD8*, qui sont transcriptionnellement régulés grâce à leur association à l'hétérochromatine (Merkenschlager et al., 2004).

4. Implication d'HP1 γ dans la recombinaison de classe

Nous avons observé que les souris *Cbx3*^{-/-} présentent un défaut de recombinaison de classe, conduisant à une diminution de la production de cellules exprimant l'isotype IgG1 spécifiquement ; ce résultat suggère qu'HP1 γ est impliquée dans la régulation de la recombinaison de classe spécifiquement pour l'isotype IgG1.

Une telle spécificité pourrait sembler étonnante, mais il a déjà été montré que certains facteurs favorisent la CSR au niveau d'un isotype particulier : ainsi, l'enzyme Suv39h1 stimule la CSR spécifiquement vis-à-vis de l'isotype IgA (Bradley et al., 2006). Il est donc possible que les mécanismes de commutation spécifiques aboutissant à l'expression de l'isotype IgG1 nécessitent la présence d'HP1 γ .

De façon intéressante, le résultat de notre analyse des souris *Cbx3*^{LB-/-}, chez lesquelles *Cbx3* a été inactivé spécifiquement dans les lymphocytes B matures, indique que le phénotype de CSR observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} n'est pas cellulaire-autonome, suggérant soit que le

rôle d'HP1 γ dans la CSR ne se situe pas au niveau des lymphocytes B eux-mêmes, soit qu'HP1 γ n'intervient pas dans le mécanisme de CSR en tant que tel mais très en amont de celui-ci. Ce résultat est surprenant car plusieurs évidences suggèrent un lien fonctionnel entre les protéines HP1 et la CSR ; ainsi, il a été montré que la marque H3K9me3 est enrichie au niveau du locus IgH, et qu'HP1 γ est présente au niveau des régions S subissant la recombinaison dans les lymphocytes B murins et humains (Chowdhury et al., 2008 ; Kuang et al., 2009 ; Jeevan-Raj et al., 2011). De plus, une étude a montré tout récemment que les protéines HP1 forment un complexe avec le corépresseur TIF1 β et AID, l'enzyme induisant les cassures double brin requises pour la CSR. En effet, TIF1 β et les HP1 sont recrutés au niveau des résidus modifiés H3K9me3 du locus IgH dans les lymphocytes B au repos, et formeraient une plate-forme permettant le recrutement d'AID lors de la stimulation ; ce recrutement nécessite l'association de TIF1 β avec les protéines HP1 (Jeevan-Raj et al., 2011). L'analyse de souris chez lesquelles le gène *Cbx5*, codant pour HP1 α , a été inactivé, ne montre pas de déficience de CSR pour aucun des isotypes testés (B. Jeevan-Raj, communication personnelle), suggérant que les protéines HP1 fonctionnellement impliquées dans la CSR sont HP1 γ et HP1 β . Nos résultats laissent penser qu'HP1 β intervient principalement dans les mécanismes moléculaires se déroulant dans les lymphocytes B matures, et que le rôle d'HP1 γ pourrait se situer très en amont. On pourrait en effet envisager qu'au niveau du locus IgG1, HP1 γ soit impliquée dans l'établissement, mais pas forcément dans la maintenance, d'une structure chromatinienne « préparatoire » qui serait requise pour la mise en place des mécanismes faisant intervenir TIF1 β et HP1 β , et préluant à l'activation des lymphocytes B ; de façon étonnante, nos résultats suggèrent qu'une telle structure pourrait être établie avant le stade auquel les allèles de *Cbx3* ont été excisés chez les souris *Cbx3*^{LB-/-}, c'est-à-dire avant le stade pré-pro-lymphocyte B, et maintenue à travers les stades de différenciation jusqu'à la fin de la maturation des lymphocytes B.

Par ailleurs, la commutation pour IgG1 est induite *in vitro* par la présence d'IL-4, une molécule également produite par les lymphocytes Th. Etant donné la déplétion splénique de lymphocytes Th observée chez les souris *Cbx3*^{-/-}, il n'est pas exclu que la diminution de LTh puisse également avoir un effet délétère sur la CSR *in vivo* chez les souris *Cbx3*^{-/-}, ce qui contribuerait aussi à la fragilisation immunitaire de ces souris.

Partie II

Etude des conséquences de l'inactivation de Cbx3 sur la spermatogenèse

Etude des conséquences de l'inactivation de *Cbx3* sur la spermatogenèse

De très nombreuses modifications chromatiniennes sont essentielles au déroulement de la spermatogenèse. On peut donc envisager que ce processus biologique soit sévèrement affecté par l'inactivation du gène *Cbx3*, codant pour une protéine appartenant à une famille jouant un rôle essentiel dans la compaction de l'hétérochromatine. De plus, lors de la nécropsie des souris *Cbx3*^{-/-}, nous avons constaté que les mâles *Cbx3*^{-/-} présentaient un hypogonadisme sévère, suggérant une déficience de la spermatogenèse chez ces animaux ; nous nous sommes donc intéressées aux conséquences de l'inactivation de *Cbx3* sur la spermatogenèse.

I. Rôle d'HP1γ dans la fertilité

Nous avons analysé les effets de l'inactivation de *Cbx3* sur la fertilité des souris ; pour cela, nous avons croisé des souris WT ou *Cbx3*^{-/-} avec des souris WT de fond génétique C57/BL6, et comparé la descendance de chaque type de croisement. Les résultats de cette étude pour 3 femelles WT et 5 femelles *Cbx3*^{-/-}, sur une durée de 5 mois, ont montré que les portées sont significativement moins fréquentes et comprennent moins de petits chez les femelles *Cbx3*^{-/-} que chez les femelles WT (**figure 56**) ; ces données indiquent que les femelles *Cbx3*^{-/-} sont hypofertiles. D'autre part, le croisement de 5 mâles *Cbx3*^{-/-} avec des femelles WT pendant 3 mois n'a engendré aucune portée, indiquant que les mâles *Cbx3*^{-/-} sont stériles. Dans la suite du projet, nous nous sommes concentrées sur le phénotype de stérilité des mâles *Cbx3*^{-/-}.

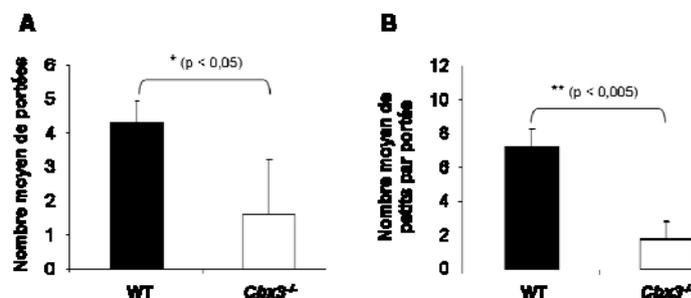


Figure 56 : Analyse de la fertilité des femelles WT et *Cbx3*^{-/-}. A : comparaison du nombre moyen de portées issues de croisements WT x WT et WT x *Cbx3*^{-/-} sur une durée de 5 mois. B : comparaison du nombre moyen de petits par portée issue de croisements WT x WT et WT x *Cbx3*^{-/-} au cours de ce même laps de temps.

II. Analyse de la spermatogenèse chez les souris *Cbx3*^{-/-}

1. Profil d'expression testiculaire et localisation sub-nucléaire d'HP1 γ

Pour tenter de mieux cerner le rôle que peut jouer HP1 γ dans la spermatogenèse, nous avons étudié par immunohistochimie le profil d'expression d'HP1 γ dans le testicule de souris WT. Nous avons observé un signal intense dans les cellules somatiques du testicule (cellules de Leydig et de Sertoli) ainsi que dans presque tous les types de cellules germinales ; mais le signal est beaucoup plus faible au niveau des spermatides allongées (**figure 57 A et B**). Ces résultats suggèrent qu'au niveau du testicule, HP1 γ est fortement exprimée dans les cellules somatiques et dans presque toutes les cellules germinales, et plus faiblement exprimée dans les spermatides allongées. Toutefois, ces cellules présentent une chromatine très condensée ; il est donc possible que la diminution d'intensité du signal observée dans ces cellules soit due à une accessibilité réduite des épitopes d'HP1 γ . Nous avons également observé que dans tous les types cellulaires testiculaires dans lesquels elle est exprimée, HP1 γ montre une localisation nucléaire et plus précisément, semble enrichie au niveau de l'hétérochromatine (**figure 57 C**).

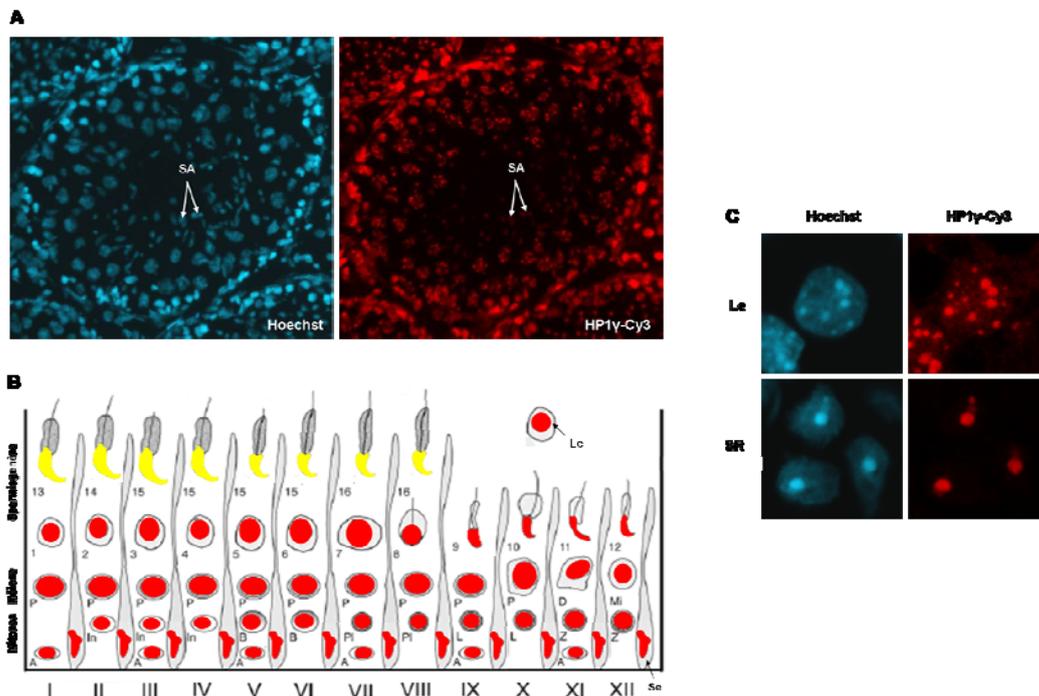


Figure 57 : Analyse du profil d'expression d'HP1 γ dans le testicule WT. A : immunohistochimie anti-HP1 γ sur coupe de testicule de souris WT de 6 semaines, SA : spermatides allongées. B : diagramme représentant le profil d'expression d'HP1 γ au cours des stades de la spermatogenèse, en rouge : noyaux des cellules exprimant fortement HP1 γ , en jaune : noyaux des cellules exprimant faiblement HP1 γ , Le : cellule de Leydig, autres abréviations : voir figure 28 de l'introduction. C : exemples de localisation sub-nucléaire hétérochromatinienne d'HP1 γ dans des cellules de Leydig (Le) et des spermatides rondes (SR).

2. Analyse histologique des testicules de mâles *Cbx3*^{-/-}

a. Etude à 6 semaines

Pour mieux comprendre le défaut de fertilité observé chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, nous avons réalisé une analyse histologique des testicules. Nous avons commencé par une étude à 6 semaines, âge auquel les mâles WT deviennent normalement matures sexuellement, afin d'évaluer la mise en place chez les mâles *Cbx3*^{-/-} de la première vague de spermatogenèse, qui est normalement complète à 35 jours. L'analyse de 3 mâles *Cbx3*^{-/-} et 3 contrôles *Cbx3*^{+/-} ou WT de sections de testicules colorées à l'hématoxyline-éosine a révélé que les mâles *Cbx3*^{+/-} montrent une spermatogenèse normale et complète, similaire à celle des WT ; par contre, les mâles *Cbx3*^{-/-} présentent de sévères perturbations de la spermatogenèse. Chez ces animaux, le diamètre de tous les tubes séminifères est réduit par rapport aux témoins, et ces tubes peuvent être répartis en 2 catégories : les tubes contenant des cellules germinales et les tubes « Sertoli-only », vides de cellules germinales ne contenant que des cellules de Sertoli ou parfois quelques spermatogonies. La proportion de chaque catégorie est très variable d'un animal à l'autre (**figure 58**).

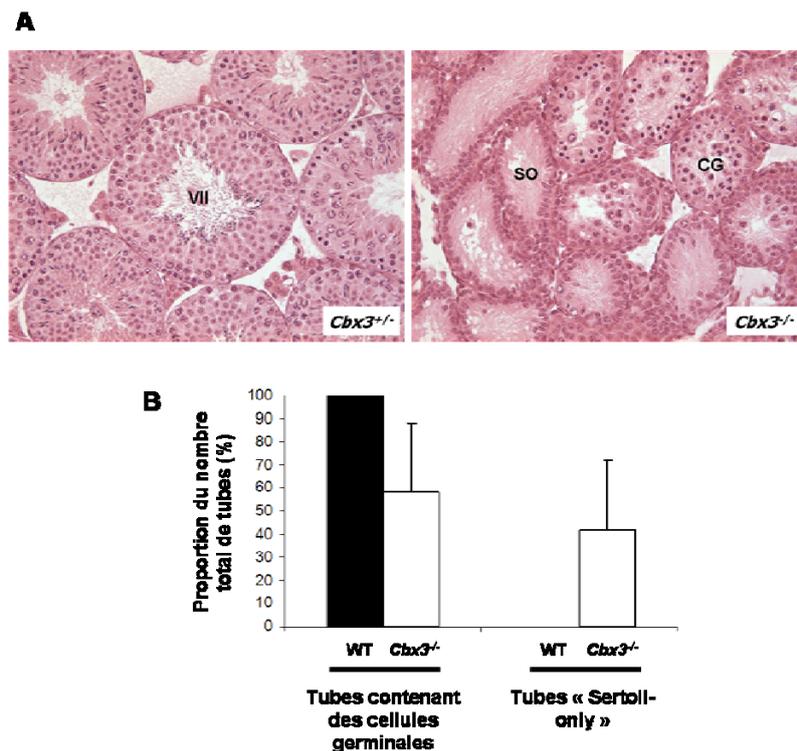


Figure 58 : La spermatogenèse est sévèrement affectée chez les souris *Cbx3*^{-/-}. A : comparaison des tubes séminifères de mâles *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines après coloration des sections de testicules à l'hématoxyline-éosine, VII : tube séminifère au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère, CG : tube contenant des cellules germinales, SO : tube « Sertoli-only ». B : proportion de tubes séminifères contenant des cellules germinales et « Sertoli-only » chez les souris WT et *Cbx3*^{-/-} ; tous les tubes d'une section de testicule ont été comptés chez 3 mâles WT et 3 mâles *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines.

Chez les mâles WT de 6 semaines, la première vague de spermatogenèse est complète et tous les stades de différenciation des cellules germinales sont présents. Par exemple, les tubes séminifères au stade VII présentent des spermatocytes préleptotènes et pachytène, ainsi que des dizaines de spermatides rondes et de spermatides allongées qui sont prêtes à être libérées dans la lumière du tube lors de l'étape de spermiation se produisant au stade VIII (**figure 59 WT**). Cependant, chez les mâles *Cbx3*^{-/-} du même âge, l'analyse histologique des testicules montre que la spermatogenèse est considérablement retardée dans les tubes séminifères contenant des cellules germinales. Tous les types de spermatocytes sont présents mais seules quelques spermatides rondes sont visibles, les plus avancées étant au stade VI du cycle de l'épithélium séminifère, et il n'y a pas de spermatides allongées (**figure 59**). L'absence ou la rareté de plusieurs types de cellules germinales rend ainsi très difficile l'identification des stades de l'épithélium séminifère chez les mâles *Cbx3*^{-/-}. Ces résultats montrent qu'HP1 γ est nécessaire à la mise en place de la première vague de spermatogenèse.

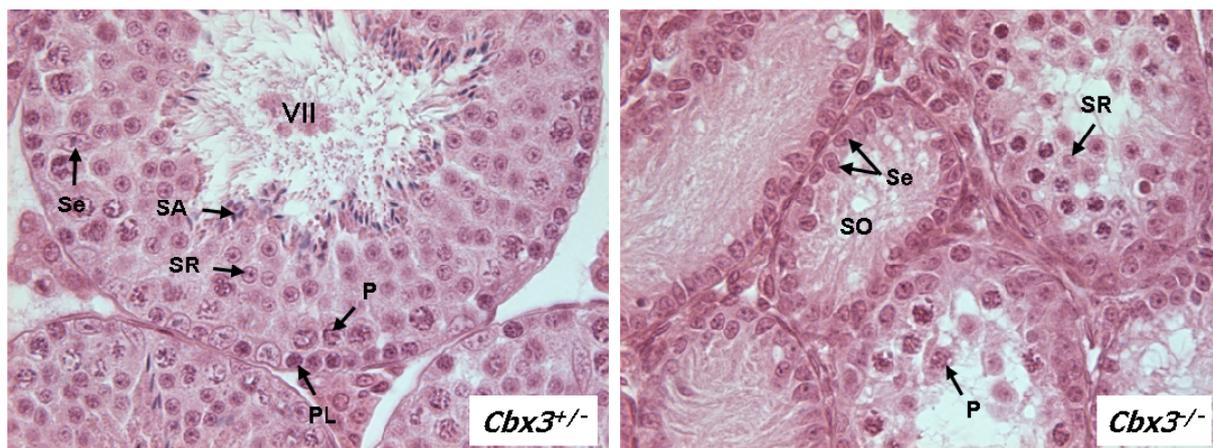


Figure 59 : La spermatogenèse est retardée chez les mâles *Cbx3*^{-/-}. Coloration à l'hématoxyline-éosine de sections de testicules de souris *Cbx3*^{+/+} et *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines, VII : tube séminifère au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère, P : spermatocyte pachytène, PL : spermatocyte préleptotène, SA : spermatide allongée, Se : cellule de Sertoli, SO : tube « Sertoli-only », SR : spermatide ronde.

b. Etude à 7 mois

Les résultats de notre analyse histologique montrent que la première vague de spermatogenèse est incomplète chez les mâles *Cbx3*^{-/-} de 6 semaines. Nous avons voulu savoir si ce défaut est dû à un simple retard de la spermatogenèse, pouvant donc être rattrapé au cours du temps, ou à des défauts de différenciation des cellules germinales. Pour répondre à cette question, les mâles *Cbx3*^{-/-} ont été analysés à l'âge de 7 mois. L'examen de 3 mâles WT

et 3 mâles *Cbx3*^{-/-} a montré que chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, le diamètre de tous les tubes séminifères est réduit par rapport aux mâles WT. On retrouve les 2 types de tubes décrits précédemment : environ 50% de tubes « Sertoli-only », dans lesquels la spermatogenèse est vraisemblablement arrêtée de façon définitive, et environ 50% de tubes contenant des cellules germinales. Ces derniers montrent une spermatogenèse complète, ce dont témoigne la présence de spermatides allongées. De plus, les associations cellulaires caractérisant le cycle de l'épithélium séminifère sont maintenues, signifiant que la synchronisation des étapes de différenciation des cellules germinales est respectée. L'aspect morphologique des spermatides est normal mais leur nombre est réduit (**figure 60 A**), indiquant que la spermiogenèse a lieu et suggérant qu'en l'absence d'HP1 γ , la spermatogenèse peut être menée à son terme une fois initiée, mais que son déroulement est globalement ralenti. Par ailleurs, les tubes séminifères qui contiennent des cellules germinales présentent un déficit majeur de la spermiation ; ce défaut, qui se traduit par la rétention de spermatides allongées dans l'épithélium séminifère, est particulièrement visible au stade IX, qui suit l'étape à laquelle les spermatozoïdes sont normalement libérés dans la lumière du tube (**figure 60 B**). Ainsi, HP1 γ est nécessaire non seulement pour le bon déroulement de la première vague de spermatogenèse, mais également au cours des cycles ultérieurs de spermatogenèse.

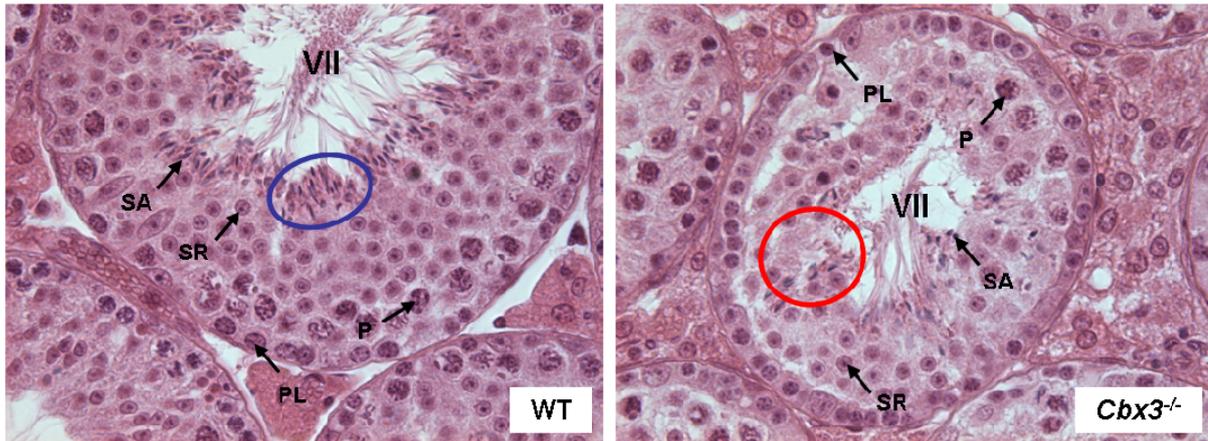
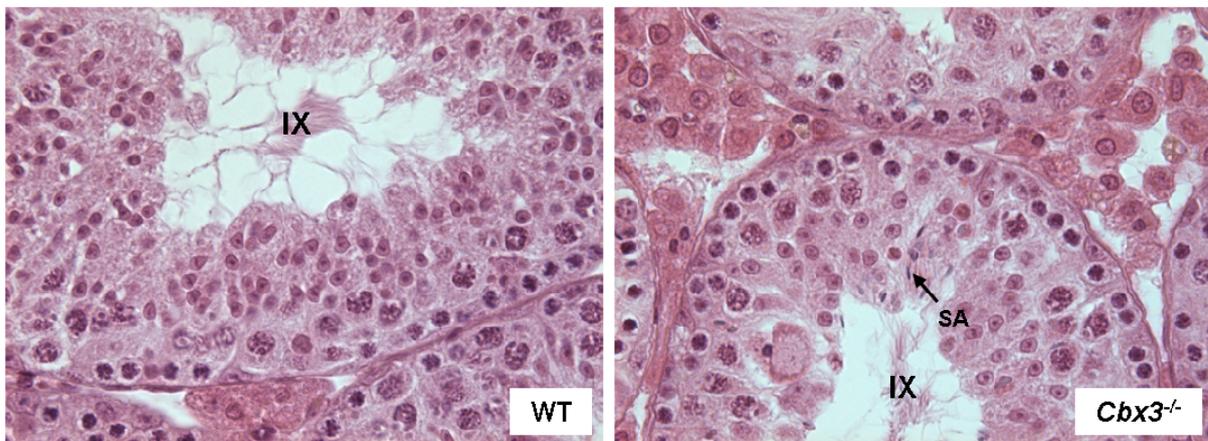
A**B**

Figure 60 : Les mâles $Cbx3^{-/-}$ de 7 mois présentent des perturbations de la spermatogenèse. Coloration à l'hématoxyline-éosine de sections de testicules de souris WT et $Cbx3^{-/-}$. A : les mâles $Cbx3^{-/-}$ montrent un déficit de spermatides allongées mais les associations cellulaires de l'épithélium séminifère sont maintenues, VII : tube séminifère au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère, cercle bleu : zone riche en spermatides allongées chez le WT, cercle rouge : zone présentant un déficit en spermatides allongées chez le $Cbx3^{-/-}$, P : spermatocyte pachytène, PL : spermatocyte préleptotène, SA : spermatide allongée, SR : spermatide ronde. B : rétention de spermatides allongées dans l'épithélium séminifère des mâles $Cbx3^{-/-}$ après le stade de libération des spermatozoïdes, IX : tube séminifère au stade IX du cycle de l'épithélium séminifère, SA : spermatide allongée.

3. Topologie sub-nucléaire des cellules testiculaires chez les mâles $Cbx3^{-/-}$

HP1 γ faisant partie d'une famille de protéines jouant des rôles essentiels dans la compaction de l'hétérochromatine, nous avons ensuite examiné, par coloration à l'Hoechst, l'organisation de l'hétérochromatine dans les cellules testiculaires à 6 semaines. Cette analyse sur 3 mâles WT et 3 mâles $Cbx3^{-/-}$ a montré que chez les mâles $Cbx3^{-/-}$, l'organisation sub-nucléaire des cellules de Leydig et des cellules germinales ne présente pas de défauts évidents.

Cependant, les cellules de Sertoli présentent une topologie sub-nucléaire anormale : alors que chez les WT, l'hétérochromatine est regroupée en deux ou trois blocs ou « spots » comme décrit dans la littérature, dans environ 30% des cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-}, l'hétérochromatine est divisée en plus de trois spots (**figure 61**). De façon curieuse, la taille de ces spots n'est pas homogène : en effet, l'un des spots est souvent plus gros que les autres, d'une taille comparable à ceux des cellules de Sertoli WT. Les cellules de Sertoli montrant ce profil d'hétérochromatine scindée en plusieurs blocs seront appelées cellules MS (*MultiSpots*) dans la suite de ce travail.

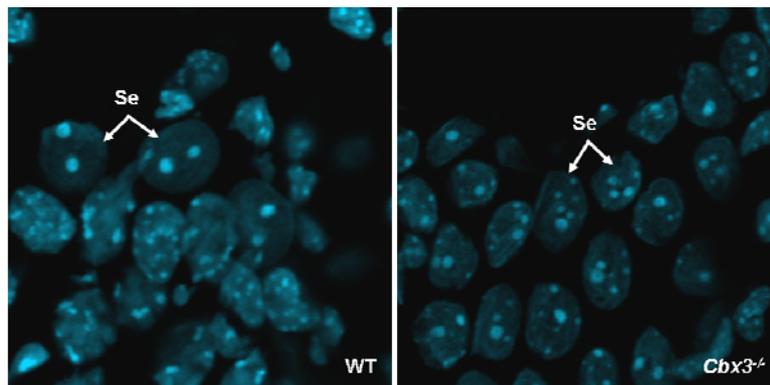


Figure 61 : HP1 γ est impliquée dans l'organisation de l'hétérochromatine des cellules de Sertoli.

Coloration à l'Hoechst de coupes de testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Une organisation sub-nucléaire anormale est visible dans environ 30% des cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{-/-}. Se : cellule de Sertoli.

Afin de confirmer l'identité sertolienne des cellules MS, nous avons réalisé un marquage immunohistochimique de la vimentine, qui est un sous-type de filament intermédiaire présent dans les cellules de Sertoli mais pas dans les cellules germinales (Franke et al., 1979). Cette analyse sur des testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines montre que les cellules de Sertoli des mâles WT ainsi que les cellules MS des mâles *Cbx3*^{-/-} expriment cette protéine, qui forme un halo autour du noyau (**figure 62**). Ce résultat suggère que les cellules MS des mâles *Cbx3*^{-/-} sont bien des cellules de Sertoli.

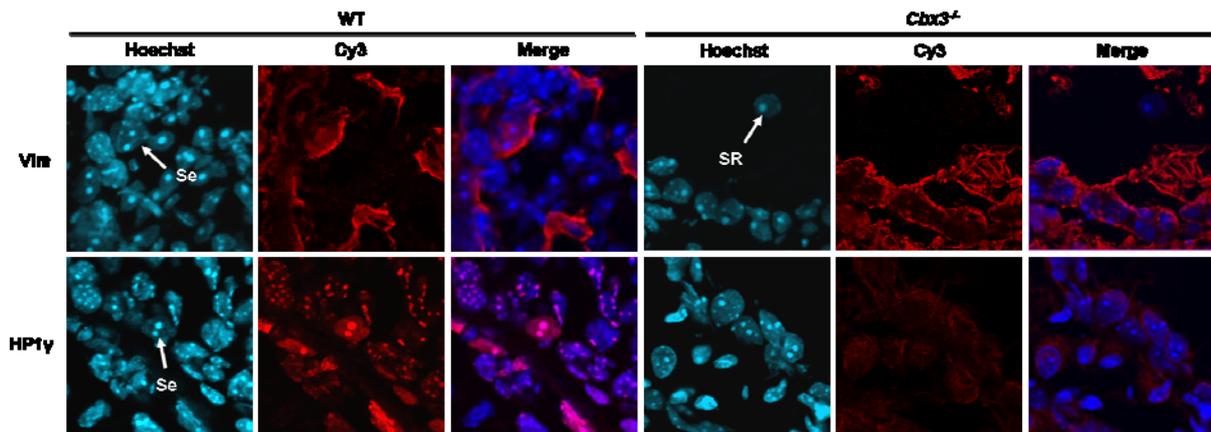


Figure 62 : Marquage de la vimentine dans les testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-}. La vimentine (Vim) est exprimée dans les cellules de Sertoli (Se) des souris WT et dans les cellules MS des souris *Cbx3*^{-/-}, mais pas dans les cellules germinales comme les spermatides rondes (SR).

Chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, les tubes séminifères contenant des cellules de Sertoli MS représentent environ 40% des tubes d'une section testiculaire, avec une grande variabilité d'un animal à l'autre (**figure 63 A**). De plus, la proportion des cellules MS est significativement plus importante autour des tubes « Sertoli-only » qu'autour des tubes contenant des cellules germinales (**figure 63 B**), ce qui suggère une corrélation fonctionnelle entre la fragmentation des blocs d'hétérochromatine sertolienne et l'absence des cellules germinales. Ces résultats suggèrent qu'HP1γ joue un rôle dans l'organisation sub-nucléaire des cellules de Sertoli, et que cette organisation pourrait être importante pour les fonctions des cellules de Sertoli.

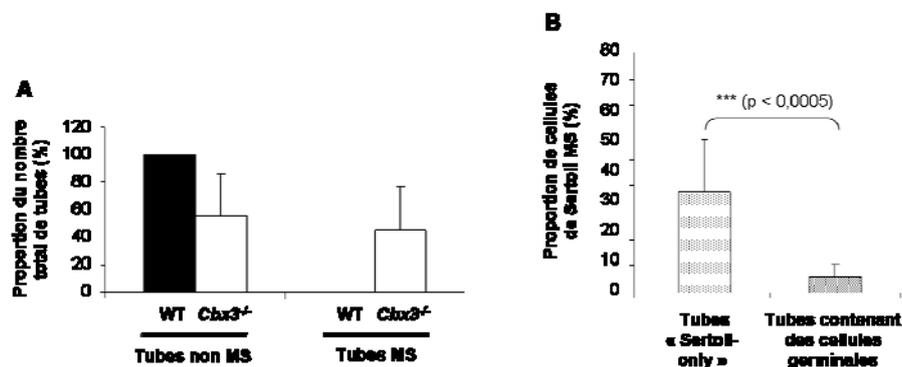


Figure 63 : Quantification des effets de l'inactivation de *Cbx3* sur l'organisation de l'hétérochromatine des cellules de Sertoli. A : les testicules des mâles *Cbx3*^{-/-} montrent une proportion élevée de tubes contenant des cellules MS ; les sections de testicules de 3 souris WT et 3 souris *Cbx3*^{-/-} ont été comptées. B : les cellules MS sont significativement enrichies autour des tubes « Sertoli-only » dans les testicules des mâles *Cbx3*^{-/-} ; les sections de testicules de 3 souris *Cbx3*^{-/-} ont été comptées.

4. Etude de l'activité de phagocytose sertolienne chez les mâles *Cbx3*^{-/-}

Nos résultats laissent envisager que l'organisation sub-nucléaire des cellules de Sertoli pourrait être importante pour leurs fonctions. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'une de ces fonctions est la phagocytose des cellules germinales ayant dégénéré au cours de la spermatogenèse. De façon intéressante, une étude de ChIP-seq réalisée au laboratoire a montré que le gène *Gas6*, codant pour l'un des principaux marqueurs de la phagocytose, est une cible directe d'HP1 γ (Riclet et al., en préparation) ; nous nous sommes donc intéressées au lien entre topologie nucléaire et fonction des cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, en nous concentrant sur leur activité de phagocytose.

a. La phagocytose sertolienne chez les mâles *Cbx3*^{-/-}

Une analyse préliminaire de la structure de l'épithélium séminifère, par coloration au bleu de toluidine de coupes testiculaires de mâles WT et *Cbx3*^{-/-}, a montré la présence de trous circulaires dans l'épithélium séminifère des mâles *Cbx3*^{-/-} (**figure 64**). Ces trous, situés à proximité immédiate des cellules de Sertoli, pourraient être causés par la disparition de syncytia de cellules germinales phagocytés de façon anarchique lors de la spermatogenèse, suggérant ainsi une suractivation de la fonction de phagocytose sertolienne chez les mâles *Cbx3*^{-/-}.

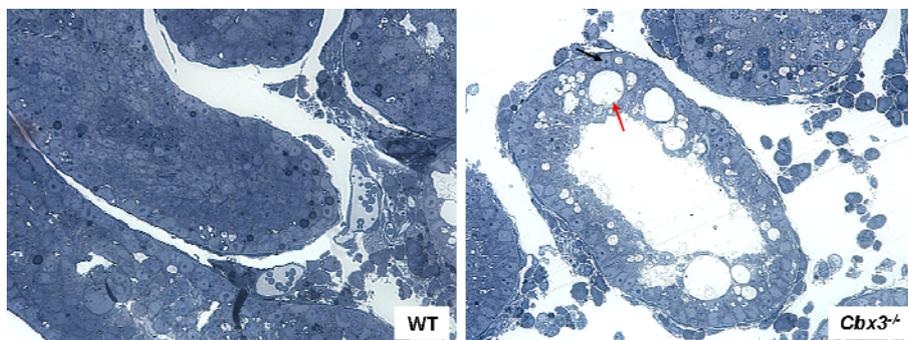


Figure 64 : Coloration au bleu de toluidine de coupes de testicules de souris WT et *Cbx3*^{-/-}. Flèche noire : cellule de Sertoli, flèche rouge : trou dans l'épithélium séminifère.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une coloration ORO (*Oil-Red-O*) sur coupes de testicules de 3 mâles WT et 3 mâles *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines ; cette coloration révèle les vésicules lipidiques générées lors de la phagocytose et constitue ainsi un bon indicateur de l'activité phagocytaire. Chez les souris WT, très peu de vésicules lipidiques sont présentes dans le cytoplasme des cellules de Sertoli (**figure 65 A**). Cependant chez les souris *Cbx3*^{-/-}, nous avons

observé la présence de trois catégories de tubes séminifères : des tubes « blancs », ne contenant presque pas de vésicules lipidiques, qui sont similaires à ceux des WT, des tubes « intermédiaires » montrant un peu plus de vésicules, et des tubes présentant de très nombreuses vésicules, organisées autour des noyaux sertoliens en une structure de type « nid d'abeilles » (**figure 65 A**). La comparaison, entre les souris WT et *Cbx3*^{-/-}, des proportions de chaque catégorie de tube a montré que les proportions de tubes du type « blancs » et « nid d'abeilles » sont significativement diminuée et augmentée, respectivement, chez les mâles *Cbx3*^{-/-} par rapport aux mâles WT (**figure 65 B**).

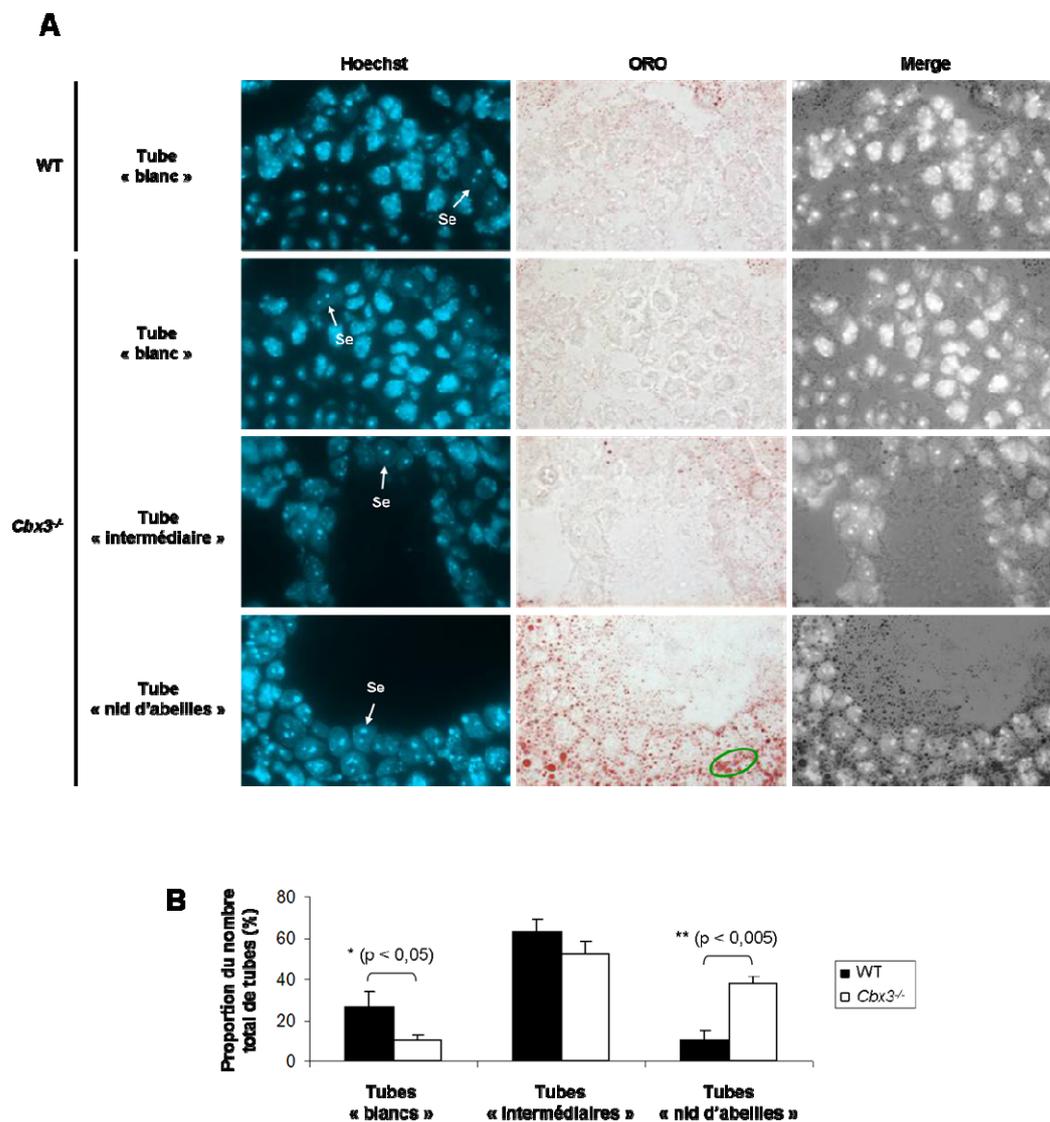


Figure 65 : Analyse de la phagocytose sertolienne par coloration ORO sur des coupes de testicules de souris

WT et *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. A : trois types de tubes séminifères sont visibles chez les souris *Cbx3*^{-/-} après coloration ORO : « blanc », « intermédiaire » et « nid d'abeille », Se : cellule de Sertoli, cercle vert : vésicules lipidiques. B : comparaison entre mâles WT et *Cbx3*^{-/-} de la proportion de chacun de ces types de tubes ; les comptages ont été réalisés sur 3 souris WT et 3 souris *Cbx3*^{-/-}.

Nous avons également analysé l'expression sertolienne de *Gas6* chez les mâles WT et *Cbx3^{-/-}*. L'étude de l'expression de *Gas6* dans des cellules de Sertoli purifiées à 2 semaines montre une tendance à la surexpression de cette protéine chez les souris *Cbx3^{-/-}* (**figure 66**). L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi une suractivation de la fonction phagocytaire chez les souris *Cbx3^{-/-}*.

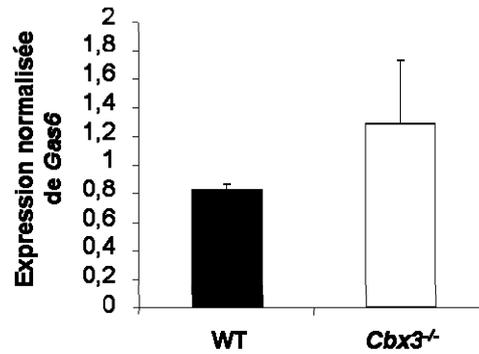


Figure 66 : Expression de *Gas6* dans les cellules de Sertoli chez les mâles WT et *Cbx3^{-/-}*. RT-qPCR sur préparations de cellules de Sertoli purifiées de 4 mâles WT et 4 mâles *Cbx3^{-/-}* ; l'expression de *Gas6* a été normalisée par celle du gène *HPRT*.

b. Etude de la corrélation phagocytose/phénotypes testiculaires

Nous avons ensuite recherché un lien entre d'une part le phénotype de suractivation de l'activité phagocytaire sertolienne chez les mâles *Cbx3^{-/-}*, et d'autre part la présence de cellules de Sertoli MS ou de tubes « Sertoli-only ». Nous avons ainsi comparé chez les mâles *Cbx3^{-/-}* les proportions de tubes « blancs », « intermédiaires » et « nid d'abeilles » entre les tubes contenant ou non des cellules MS : cette étude n'a pas révélé de différences significatives, quel que soit le type de tube, entre ces deux catégories (**figure 67 A**). Nous avons procédé aux mêmes comptages en comparant les tubes contenant des cellules germinales et les tubes « Sertoli-only » ; les résultats n'ont pas non plus montré de différences significatives entre ces deux catégories de tubes (**figure 67 B**). Ces résultats semblent indiquer que la suractivation de la phagocytose est un phénotype parallèle à celui des cellules de Sertoli MS ou à la déplétion totale des cellules germinales, mais qui ne leur est pas lié.

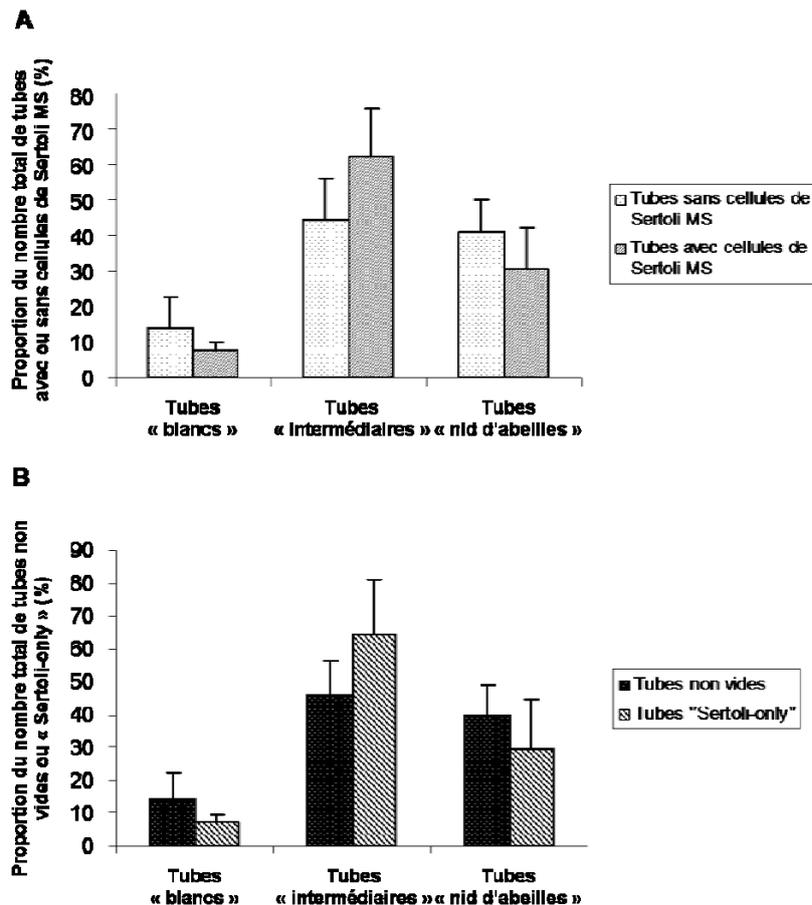


Figure 67 : Absence de corrélation entre les tubes séminifères du type « nid d'abeilles » et les tubes vides ou montrant des cellules de Sertoli MS chez les mâles $Cbx3^{-/-}$ à 6 semaines. Les comptages ont été réalisés sur des coupes de testicules de 3 mâles $Cbx3^{-/-}$.

5. Etude des cellules de Sertoli chez les mâles $Cbx3^{-/-}$

La topologie « multispots » observée dans le noyau des cellules de Sertoli chez les mâles $Cbx3^{-/-}$ rappelle fortement celle des cellules de Sertoli immatures et pourrait donc être le signe d'un défaut de maturation de ces cellules, ou bien d'une désorganisation de l'hétérochromatine dans les cellules matures. Nous avons donc examiné différents aspects de la maturation des cellules de Sertoli, ainsi que l'expression et la localisation sub-nucléaire de facteurs connus pour jouer un rôle dans l'organisation de l'hétérochromatine.

a. Analyse de la maturation des cellules de Sertoli

i. Expression de marqueurs de maturation sertoliens

Nous avons réalisé une analyse, par RT-qPCR sur testicules totaux de mâles WT et $Cbx3^{-/-}$ à 6 semaines, de plusieurs marqueurs de différenciation sertoliens : des marqueurs des

cellules de Sertoli immatures comme GDNF (*Glial cell Derived Neurotrophic Factor*), un facteur impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules de Sertoli immatures (Wu et al., 2005), et Col9a3 (*Collagen, type IX, alpha 3*), un sous-type de collagène exprimé dans les cordons séminifères en développement (McClive et Sinclair, 2003), et des marqueurs des cellules de Sertoli matures comme Cldn11 (*Claudin 11*), un composant essentiel des jonctions serrées constituant la BHT (Mazaud-Guittot et al., 2010), et Trsfm (*Transferrin*), une protéine de sécrétion des cellules de Sertoli matures impliquée dans le transport du fer (Skinner et Griswold, 1980). Nous n'avons pas observé de surexpression concernant les marqueurs d'immaturité sertoliens, ni d'importante diminution d'expression concernant les marqueurs des cellules matures (**figure 68**), ce qui suggère que la majorité des cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} sont matures à 6 semaines. Cependant, la déplétion de plusieurs populations de cellules germinales chez les mâles *Cbx3*^{-/-} biaise les proportions de cellules testiculaires et peut ainsi fausser les données d'expression de gènes spécifiques de certains types cellulaires. Nous avons donc adapté à notre modèle une technique de purification de cellules de Sertoli ; mais il faut souligner que pour des raisons liées au développement du testicule et à la structure tridimensionnelle des cellules de Sertoli, cette purification ne peut pas être réalisée sur des souris d'un âge supérieur à 2 semaines. La comparaison de l'expression des marqueurs de maturation cités précédemment sur cellules de Sertoli purifiées n'a pas révélé de différences entre les souris WT et *Cbx3*^{-/-} (**figure 68**), suggérant que les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} initient normalement leur processus de maturation.

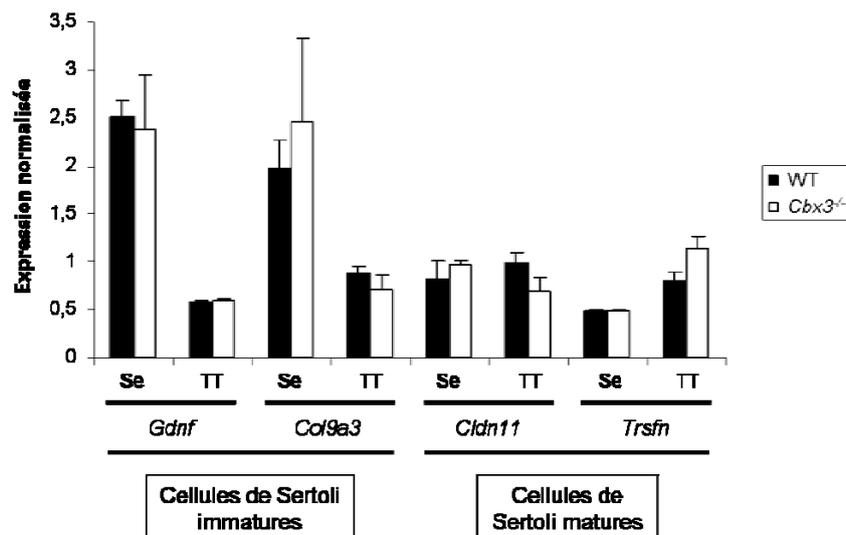


Figure 68 : Analyse de marqueurs de différenciation des cellules de Sertoli chez les souris WT et *Cbx3*^{-/-}. RT-qPCR sur préparations de cellules de Sertoli purifiées à 2 semaines (Se) ou sur testicules totaux à 6 semaines (TT) ; l'expression de chaque gène a été normalisée par celle du gène *HPRT*.

ii. Etude de l'intégrité de la BHT chez les mâles *Cbx3*^{-/-}

La mise en place de la barrière hémato-testiculaire est une étape importante de la maturation des cellules de Sertoli ; nous avons donc analysé, par microscopie électronique à transmission sur des coupes de testicules, l'intégrité de la BHT chez 2 mâles WT et 2 mâles *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. Comme nous l'avons vu, cette barrière est essentiellement composée de jonctions serrées ; elle est repérable en microscopie électronique sous la forme d'une structure de trois feuilletts parallèles denses aux électrons, qui correspondent à des faisceaux de filaments d'actine associés aux jonctions serrées et situés de part et d'autre de la zone de contact entre les membranes plasmiques de deux cellules de Sertoli (**figure 69 WT**). L'examen de la BHT chez des souris WT et *Cbx3*^{-/-} a montré que sa structure était similaire entre les souris de ces deux génotypes (**figure 69**) ; en particulier, aucun intervalle n'est visible entre les trois feuilletts chez les souris *Cbx3*^{-/-}, comme décrit dans la littérature chez des souris ayant subi un traitement entraînant une désorganisation de la BHT (Yao et al., 2010). Ainsi, cette étape de la maturation des cellules de Sertoli ne semble pas affectée chez les mâles *Cbx3*^{-/-} ; puisque la mise en place de la barrière hémato-testiculaire a lieu entre 10 et 16 jpp chez la souris, ces résultats indiquent que soit les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} sont matures, soit que leur maturation s'est arrêtée au-delà du stade de mise en place de la barrière hémato-testiculaire. Conjugés aux données d'expression des marqueurs de maturation sertoliens, ces résultats semblent cependant suggérer que les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} sont matures.

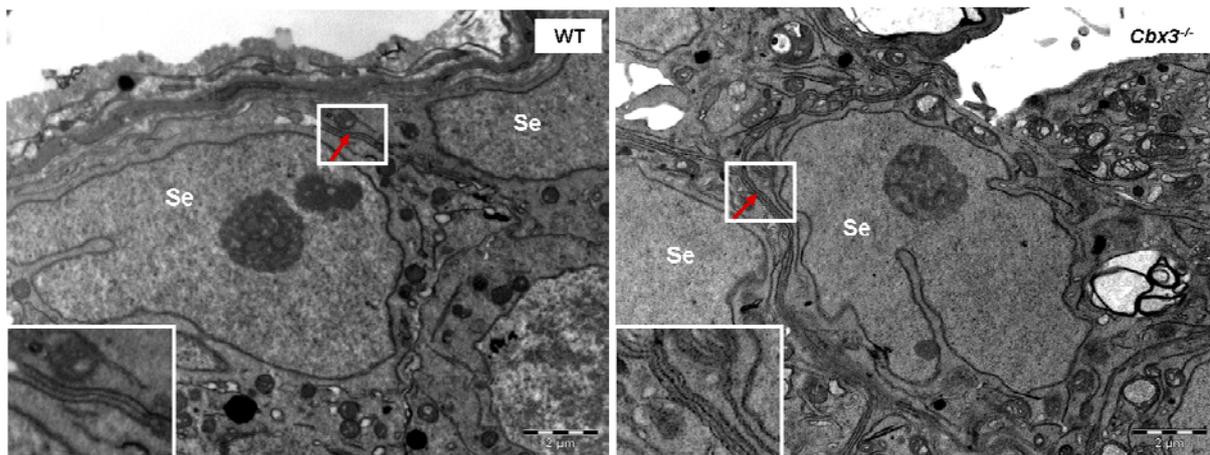


Figure 69 : Observation en microscopie électronique de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire chez des mâles WT et *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. Deux souris WT et deux souris *Cbx3*^{-/-} ont été analysées. Se : cellule de Sertoli, cadres blancs : agrandissements de régions de la barrière (flèches rouges) montrant sa structure en triple feuillet, identique chez les souris WT et *Cbx3*^{-/-}.

b. Analyse de l'hétérochromatine sertolienne chez les mâles *Cbx3*^{-/-}

Puisque nos résultats suggèrent que les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} sont matures, il est probable que la fragmentation des blocs d'hétérochromatine observée dans ces cellules résulte de perturbations de l'organisation sub-nucléaire de l'hétérochromatine. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé plusieurs caractères hétérochromatiniens, comme l'expression d'éléments répétés, le profil de plusieurs modifications d'histones et la localisation sub-nucléaire de facteurs associés à l'hétérochromatine.

i. Etude de l'expression d'éléments répétés

Les éléments répétés présents dans le génome sont normalement rendus silencieux par leur compaction en hétérochromatine ; une désorganisation de l'hétérochromatine pourrait ainsi entraîner la dérégulation de ces éléments. Nous avons donc analysé par RT-qPCR sur testicules totaux l'expression de plusieurs catégories d'éléments répétés, comme les rétrotransposons LINE 1 et SINE B2, les satellites majeurs et les rétrovirus endogènes IAP, U3-II et U3-III. Cette analyse a montré que ces éléments ne sont pas surexprimés chez les mâles *Cbx3*^{+/-} ou *Cbx3*^{-/-} comparés aux WT ; au contraire, on observe une diminution significative d'expression de LINE 1 chez les mâles *Cbx3*^{-/-} comparés aux WT (**figure 70**), suggérant que si l'hétérochromatine est désorganisée chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, cette désorganisation n'entraîne pas de dérégulation des éléments transposables.

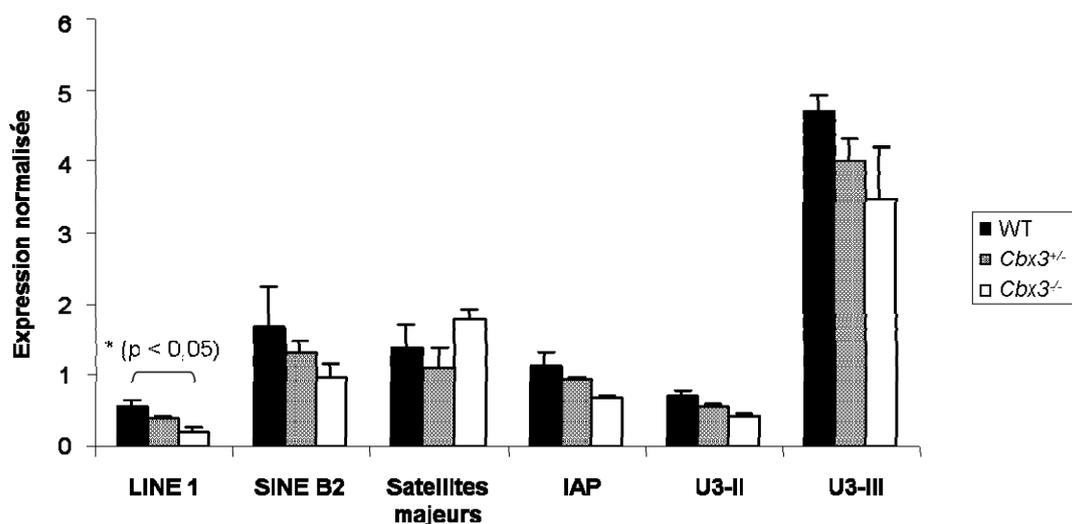


Figure 70 : Comparaison de l'expression testiculaire de divers éléments répétés entre souris WT, *Cbx3*^{+/-} et *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. RT-qPCR sur testicules totaux de 3 souris WT, 3 souris *Cbx3*^{+/-} et 3 souris *Cbx3*^{-/-} ; l'expression de chaque sous-type d'élément a été normalisée par l'expression de *HPRT*.

ii. Organisation sub-nucléaire de la chromatine sertolienne

Nous avons ensuite voulu savoir si le profil de modifications post-traductionnelles des histones était perturbé dans les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} par rapport aux mâles WT. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques de H3K9 acétylée, H3K27 triméthylée, H3K9 triméthylée, H4K20 triméthylée et H3S10 phosphorylée, sur des coupes de testicules de 3 mâles WT et 3 mâles *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. Les résultats montrent que dans les cellules de Sertoli des souris WT, les marques H3K9 acétylée, H3K27 triméthylée et H3S10 phosphorylée sont enrichies au niveau de l'euchromatine ; de plus, les marques H3K9 triméthylée et H4K20 triméthylée sont très fortement enrichies au niveau de l'hétérochromatine (**figure 71**). Le même profil de ces modifications est observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} (**figure 71**), suggérant que la structure de la chromatine dans les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} n'est pas affectée de façon significative concernant ces modifications.

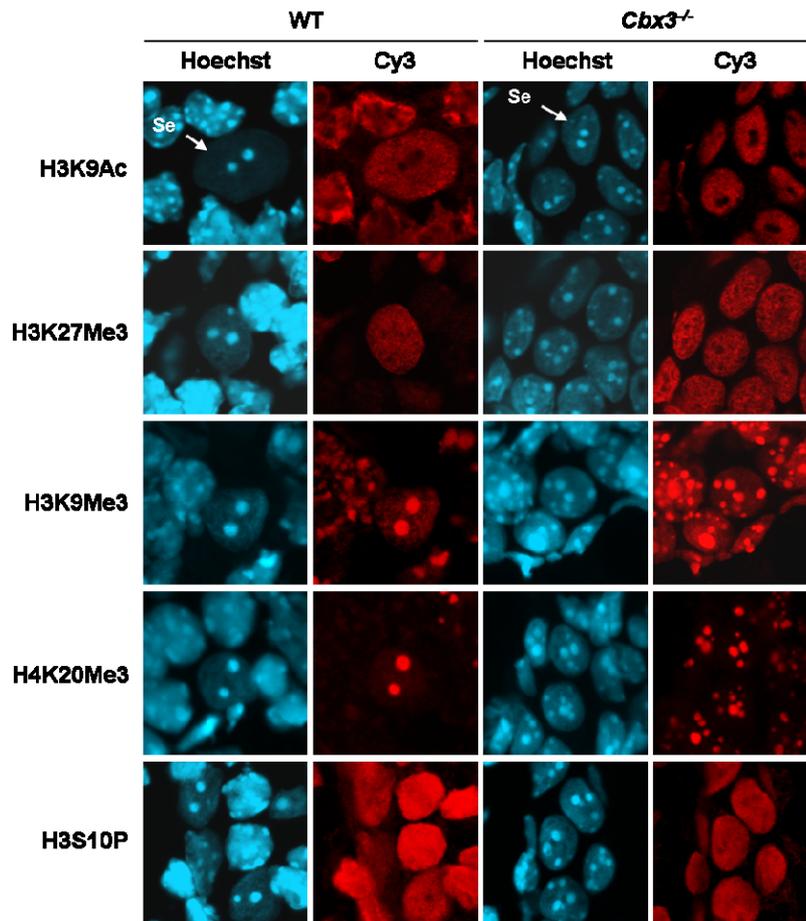


Figure 71 : Marquage de différentes modifications post-traductionnelles d'histones dans les cellules de Sertoli WT et *Cbx3*^{-/-}. H3K9Ac : H3K9 acétylée, H3K27Me3 : H3K27 triméthylée, H3K9Me3 : H3K9 triméthylée, H4K20Me3 : H4K20 triméthylée, H3S10P : H3S10 phosphorylée, Se : cellule de Sertoli. Les images choisies pour les souris *Cbx3*^{-/-} ne montrent que des cellules de Sertoli.

iii. Localisation sub-nucléaire de facteurs associés à l'hétérochromatine

Nous avons également effectué des marquages sur coupes de testicules de protéines présentes au niveau de l'hétérochromatine, comme HP1 α , HP1 β et TIF1 β . Ces trois protéines sont fortement exprimées dans le testicule, notamment dans les cellules de Sertoli, et interagissent avec HP1 γ (Nielsen et al., 1999 ; Nielsen et al., 2001a). De plus, il a été montré que TIF1 β intervient dans la spermatogenèse ; en effet, l'inactivation conditionnelle de TIF1 β dans la lignée germinale mâle entraîne la dégénérescence des tubes séminifères et la disparition totale des cellules germinales (Weber et al., 2002). Une étude réalisée récemment au laboratoire a également mis en évidence que TIF1 β est indispensable aux fonctions des cellules de Sertoli, mais que son recrutement à l'hétérochromatine n'est pas nécessaire à cette fonction (Herzog et al., 2011).

- Marquage d'HP1 α

Dans les cellules de Sertoli des mâles WT, HP1 α est très fortement enrichie au niveau de l'hétérochromatine (**figure 72**). Chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, nous avons observé qu'HP1 α est un peu moins fortement localisée à l'hétérochromatine et semble davantage présente au niveau de l'euchromatine (**figure 72**), suggérant qu'HP1 γ pourrait être nécessaire pour stabiliser la liaison d'HP1 α à l'hétérochromatine.

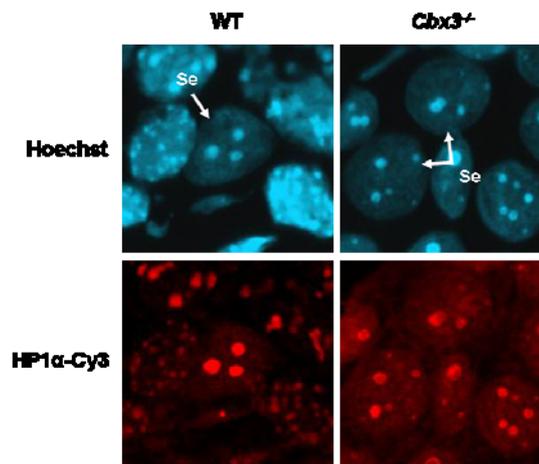


Figure 72 : HP1 α est davantage enrichie au niveau de l'euchromatine des cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{-/-} que chez les mâles WT. Se : cellule de Sertoli.

- Marquage d'HP1 β

Chez les mâles WT, HP1 β est également principalement présente au niveau de l'hétérochromatine dans les cellules de Sertoli (**figure 73 A**). De façon intéressante, chez les mâles *Cbx3*^{-/-} cette protéine présente deux profils de localisation sub-nucléaire, étant soit hétérochromatinienne dans 60% des cellules, soit complètement délocalisée de l'hétérochromatine dans 40% des cellules (**figure 73 A**). De plus, les cellules présentant une délocalisation d'HP1 β sont significativement enrichies autour des tubes « Sertoli-only » par rapport aux tubes contenant des cellules germinales (**figure 73 B**) ; ces données suggèrent qu'HP1 γ est impliquée dans la localisation et/ou le maintien à l'hétérochromatine d'HP1 β , et que cette délocalisation d'HP1 β pourrait participer au phénotype observé dans les tubes séminifères « Sertoli-only » des mâles *Cbx3*^{-/-}.

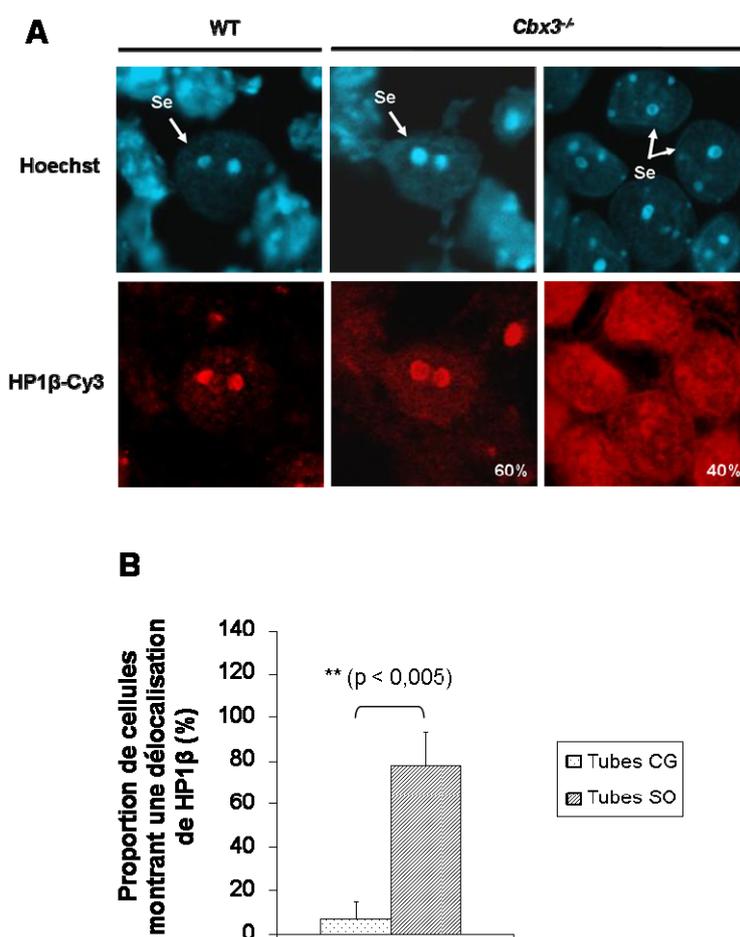


Figure 73 : Localisation sub-nucléaire d'HP1 β dans les cellules de Sertoli des mâles WT et *Cbx3*^{-/-}. A : HP1 β est délocalisée de l'hétérochromatine dans 40% des cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{-/-} ; Se : cellule de Sertoli. B : chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, les cellules montrant une délocalisation d'HP1 β sont significativement enrichies autour des tubes séminifères « Sertoli-only » ; tubes CG : tubes contenant des cellules germinales, tubes SO : tubes « Sertoli-only ».

- Marquage de TIF1 β

Dans les cellules de Sertoli WT, TIF1 β présente une localisation hétérochromatinienne (**figure 74**). Cependant, chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, TIF1 β est délocalisé de l'hétérochromatine dans 90% des cellules de Sertoli (**figure 74**), suggérant qu'HP1 γ est également nécessaire à la localisation et/ou au maintien de TIF1 β à l'hétérochromatine.

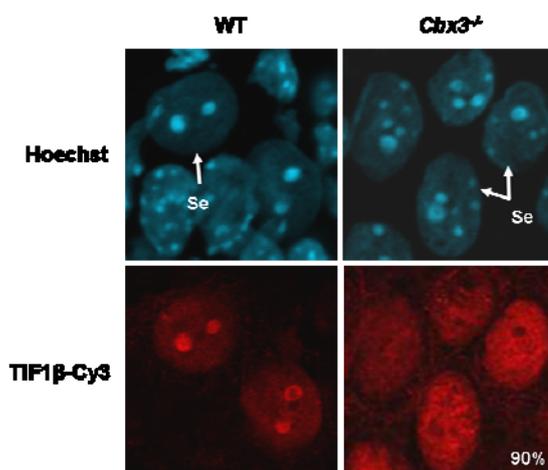


Figure 74 : TIF1 β est délocalisé de l'hétérochromatine dans 90% des cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{-/-}. Se : cellule de Sertoli.

- Marquage sertolien d'HP1 α , HP1 β et TIF1 β chez les souris *Cbx5*^{-/-}

Nos résultats suggèrent qu'HP1 γ est impliquée dans l'association d'HP1 β et TIF1 β , et dans une moindre mesure HP1 α , à l'hétérochromatine. Afin de vérifier si cette propriété est spécifique à HP1 γ , nous avons réalisé les mêmes marquages sur des coupes de testicules de souris *Cbx5*^{-/-}, chez lesquelles HP1 α a été inactivée dans toutes les cellules de l'organisme. De façon étonnante, les résultats montrent que la localisation d'HP1 α , HP1 β et TIF1 β est hétérochromatinienne dans les cellules de Sertoli des souris WT ou *HP1 α* ^{-/-} (**figure 75**), suggérant qu'HP1 α n'est pas indispensable à l'association de ces protéines à l'hétérochromatine dans les cellules de Sertoli. L'ensemble de ces données suggère donc qu'HP1 γ , mais non HP1 α , joue un rôle essentiel dans l'établissement et/ou le maintien de l'hétérochromatine dans les cellules de Sertoli.

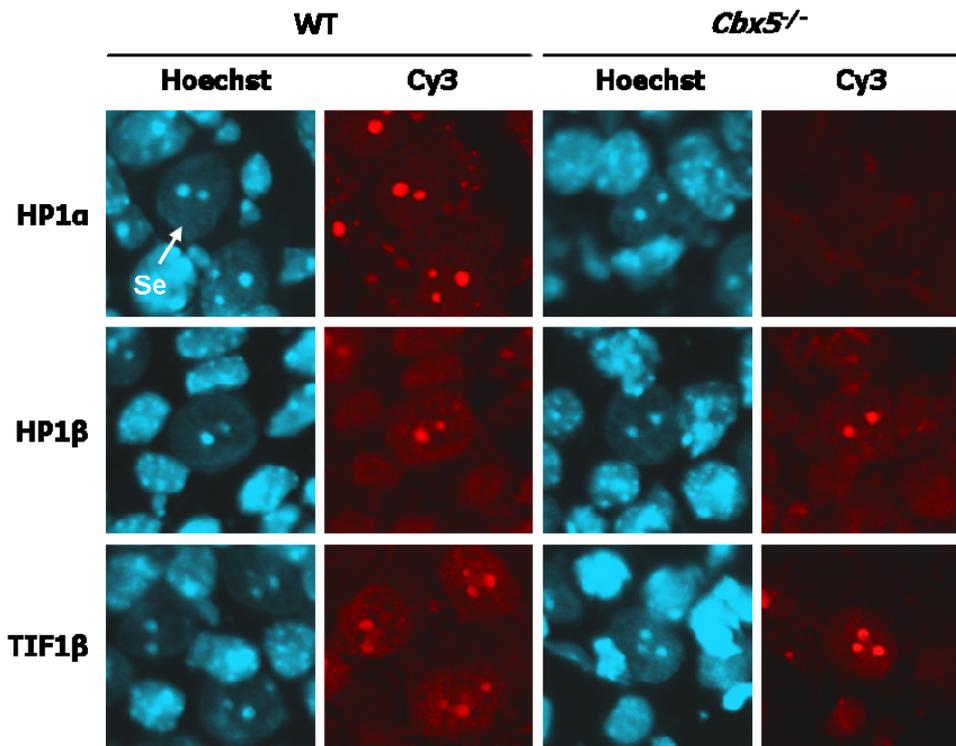


Figure 75 : HP1 α n'est pas indispensable à l'association d'HP1 β et TIF1 β à l'hétérochromatine dans les cellules de Sertoli. Se : cellule de Sertoli.

III. Analyse de la spermatogenèse chez les souris *Cbx3*^{CS/-}

Comme nous l'avons vu, les cellules de Sertoli soutiennent le développement de toute la lignée germinale dans le testicule ; de plus, certains de nos résultats suggèrent que chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, les phénotypes observés dans les cellules de Sertoli et la présence de tubes séminifères vides de cellules germinales pourraient être liés. Nous avons donc voulu savoir si a) chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, l'absence de cellules germinales dans les tubes séminifères « Sertoli-only » est causée par un dysfonctionnement des cellules de Sertoli, et b) si le phénotype concernant la topologie MS des cellules de Sertoli est cellulaire-autonome. Pour répondre à ces questions, nous avons inactivé HP1 γ spécifiquement dans les cellules de Sertoli grâce à l'utilisation de souris *Amh-Cre*^{tg/0}, qui expriment la recombinaison Cre sous contrôle du promoteur de l'hormone anti-Müllérienne AMH, actif uniquement dans les cellules de Sertoli (Lécureuil et al., 2002).

1. Obtention des souris *Cbx3*^{CS/-}

Nous avons croisé des souris *Amh-Cre*^{tg/0} avec des souris *Cbx3*^{L2/+} pour obtenir des souris *Amh-Cre*^{tg/0}/*Cbx3*^{L2/+}. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris *Cbx3*^{L2/L2}, chez

lesquelles les deux allèles de *Cbx3* sont floxés, pour générer des souris *Amh-Cre^{tg/0}/Cbx3^{L2/L2}* et des souris contrôles *Amh-Cre^{0/0}/Cbx3^{L2/L2}*, qui seront par la suite appelées souris *Cbx3^{CS-/-}* et *Cbx3^{CSL2/L2}*, respectivement.

Nous avons évalué l'efficacité de l'excision de l'allèle *L2* de *Cbx3* chez les souris *Cbx3^{CS-/-}* par PCR sur de l'ADN génomique de cellules de Sertoli purifiées à 2 semaines, le promoteur de l'hormone AMH étant actif dès E13,5 chez les souris WT. Le résultat montre que le produit de PCR correspondant à l'allèle *L-* est amplifié chez les souris *Cbx3^{CS-/-}* mais pas chez des souris contrôles *Cbx3^{CSL2/+}*, indiquant que l'excision a lieu uniquement en présence de la recombinaise Cre. De plus, le produit correspondant à l'allèle *L-* n'est pas amplifié dans des biopsies de queues de souris *Cbx3^{CS-/-}*, suggérant que l'excision est spécifique des cellules de Sertoli (**figure 76**). Cependant, l'observation d'un produit PCR correspondant à l'allèle *L2* dans les cellules de Sertoli des souris *Cbx3^{CS-/-}* montre que l'excision n'est pas complète (**figure 76**).

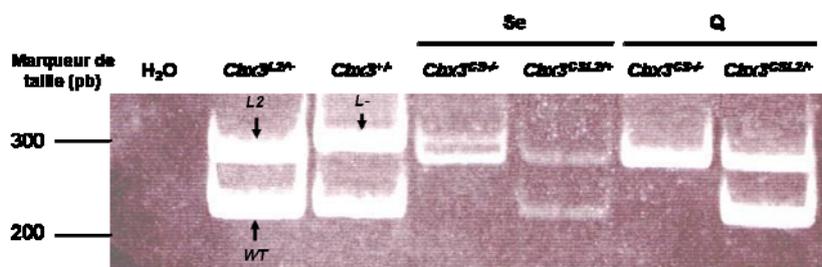


Figure 76 : Analyse de l'efficacité et de la spécificité de l'excision de l'allèle *L2* chez des souris *Cbx3^{CSL2/+}* et *Cbx3^{CS-/-}*. PCR sur ADN génomique de biopsies de queues (Q) ou de cellules de Sertoli purifiées (Se) de souris *Cbx3^{CSL2/+}* et *Cbx3^{CS-/-}* ; les produits de PCR ont été séparés sur un gel à 10% d'acrylamide. *L2*, *WT*, *L-* : produits de PCR résultant de l'amplification des allèles *L2*, *WT*, et *L-* de *Cbx3*, respectivement.

L'efficacité, au niveau protéique, de l'excision sertolienne de l'allèle *L2* chez les souris *Cbx3^{CS-/-}* a été évaluée par western blot anti-HP1 γ sur des extraits protéiques issus de cellules de Sertoli purifiées de souris *Cbx3^{CSL2/L2}* et *Cbx3^{CS-/-}* de 2 semaines. Nous avons observé un signal pour les échantillons de ces deux génotypes ; ce signal est cependant un peu moins intense pour l'échantillon *Cbx3^{CS-/-}* (**figure 77**). Ce résultat indique que l'inactivation au niveau protéique de *Cbx3* est incomplète dans les cellules de Sertoli des souris *Cbx3^{CS-/-}* de 2 semaines.

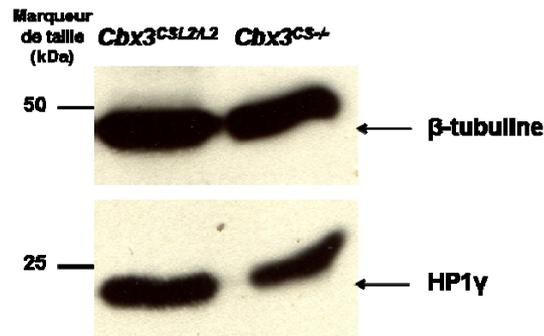


Figure 77 : Analyse de l'efficacité de l'inactivation au niveau protéique de *Cbx3* dans les cellules de Sertoli. Western blot anti-HP1γ sur des extraits protéiques de cellules de Sertoli purifiées de souris *Cbx3*^{CSL2/L2} et *Cbx3*^{CS-/-}. Une hybridation anti-β-tubulline a également été réalisée comme contrôle de charge protéique.

Nous avons également analysé l'efficacité et la spécificité de l'inactivation de *Cbx3* par immunohistochimie anti-HP1γ, sur des coupes de testicules de 3 mâles *Cbx3*^{CSL2/L2} et 3 mâles *Cbx3*^{CS-/-} de 6 semaines. Les résultats montrent que l'expression d'HP1γ est très diminuée spécifiquement dans les cellules de Sertoli, mais pas dans les cellules germinales, chez les mâles *Cbx3*^{CS-/-} comparés aux mâles *Cbx3*^{CSL2/L2} ; cependant, des traces de cette protéine sont encore visibles au niveau de l'hétérochromatine, contrairement à ce qui est observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} (**figure 78**). Ces observations suggèrent que dans les testicules des mâles *Cbx3*^{CS-/-} de 6 semaines, l'inactivation au niveau protéique de *Cbx3* a lieu spécifiquement dans les cellules de Sertoli et entraîne une forte diminution de l'expression d'HP1γ, sans toutefois l'abolir totalement.

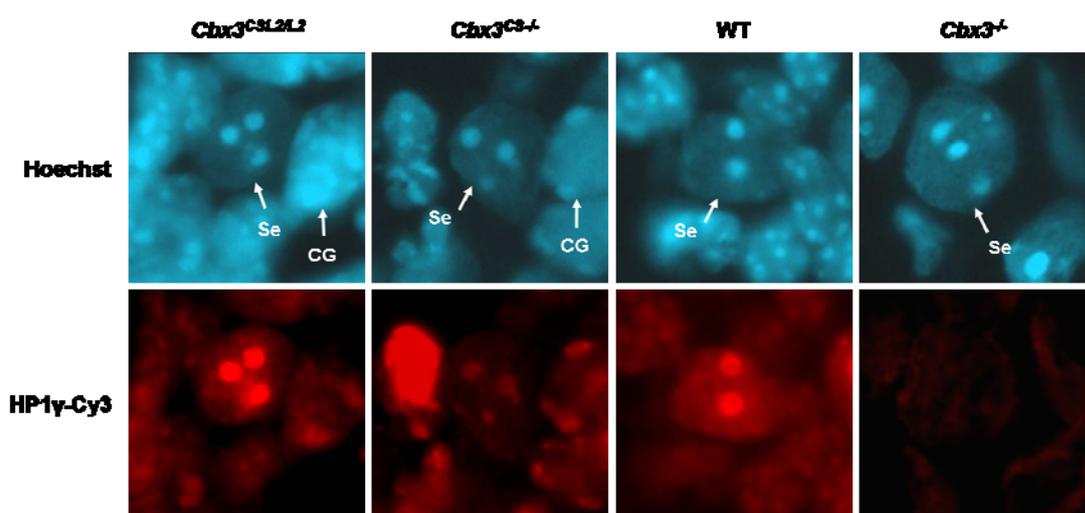


Figure 78 : Analyse par immunohistochimie de l'expression d'HP1γ dans les cellules de Sertoli chez les mâles *Cbx3*^{CSL2/L2}, *Cbx3*^{CS-/-}, WT et *Cbx3*^{-/-} à 6 semaines. Se : cellule de Sertoli, CG : cellule germinale.

2. Etude de la topologie sub-nucléaire sertolienne chez les mâles $Cbx3^{CS-/-}$

Nous avons voulu savoir si les cellules de Sertoli des mâles $Cbx3^{CS-/-}$ présentaient également la topologie MS observée chez les mâles $Cbx3^{-/-}$. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des colorations à l'Hoechst sur coupes de testicules pour 3 mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ et 3 mâles $Cbx3^{CS-/-}$ de 6 semaines ; les résultats ont révélé la présence de cellules MS similaires à celles des mâles $Cbx3^{-/-}$ dans environ 30% des cellules de Sertoli, non seulement chez les mâles $Cbx3^{CS-/-}$ mais également, de façon surprenante, chez les mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ (**figure 79**). La présence chez les mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$, indépendamment de la présence de la recombinaise Cre, du défaut de topologie sub-nucléaire observé dans les cellules de Sertoli chez les mâles $Cbx3^{CS-/-}$ suggère que ce défaut n'est pas causé, ou du moins pas uniquement, par l'inactivation de $Cbx3$ dans les cellules de Sertoli.

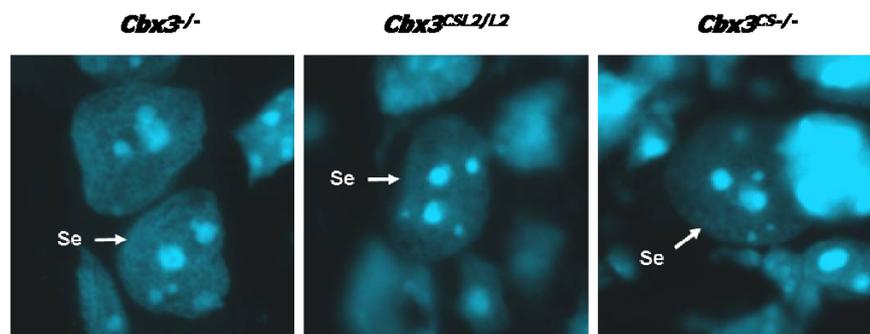


Figure 79 : Analyse de la topologie sub-nucléaire des cellules de Sertoli chez les mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ et $Cbx3^{CS-/-}$ à 6 semaines. Environ 30% des cellules de Sertoli (Se) chez les mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ et $Cbx3^{CS-/-}$ présentent une topologie MS similaire à celle observée dans les cellules de Sertoli des mâles $Cbx3^{-/-}$.

3. Etude histologique des testicules des mâles $Cbx3^{CS-/-}$

Afin de déterminer les conséquences de l'inactivation sertolienne de $Cbx3$ sur la spermatogenèse, nous avons réalisé une analyse histologique des testicules de 4 mâles $Cbx3^{CS-/-}$ et 3 mâles contrôles $Cbx3^{CSL2/L2}$ âgés de 6 semaines. Chez les mâles $Cbx3^{CS-/-}$, le nombre de spermatides allongées dans les tubes au stade VII est faible et des spermatides allongées sont retenues dans l'épithélium séminifère des tubes au-delà du stade VII, qui correspond à la spermiation ; cependant les étapes de différenciation des cellules germinales et les stades de l'épithélium séminifères sont maintenus (**figure 80**). De très rares sections de tubes « Sertoli-only », correspondant à moins de 5% du nombre total de tubes, ont également été observées. De façon inattendue, les coupes de testicules des mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ ont un aspect similaire à

celles des mâles $Cbx3^{CS-/-}$ et présentent les mêmes défauts, à l'exception toutefois de la présence de tubes « Sertoli-only ».

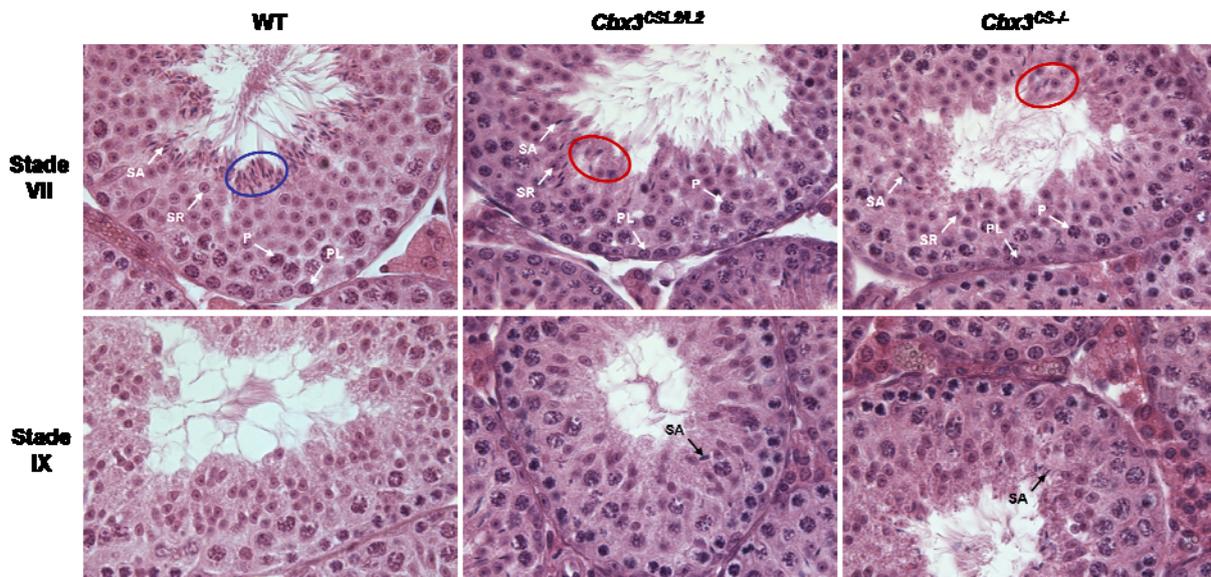


Figure 80 : Analyse histologique de la spermatogenèse chez les mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ et $Cbx3^{CS-/-}$. La coloration en hématoxyline-éosine de coupes de testicules de mâles $Cbx3^{CSL2/L2}$ et $Cbx3^{CS-/-}$ de 6 semaines révèle des perturbations de la spermatogenèse indépendamment de la présence de la recombinase Cre : déficit de spermatides allongées au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère et rétention de spermatides allongées dans l'épithélium séminifère au stade IX ; cercle bleu : zone riche en spermatides allongées chez le WT, cercle rouge : zone pauvre en spermatides allongées, P : spermatocyte pachytène, PL : spermatocyte préleptotène, SA : spermatide allongée, SR : spermatide ronde.

Ainsi les mâles $Cbx3^{-/-}$, $Cbx3^{CSL2/L2}$ et $Cbx3^{CS-/-}$ montrent tous des défauts similaires de topologie sub-nucléaire sertolienne et de spermatogenèse, avec cependant des degrés de sévérité différents. De plus, l'analyse histologique des testicules de mâles issus de croisements $Cbx3^{L2/L2} \times Cbx3^{L2/L2}$, dont les partenaires n'expriment pas la recombinase Cre, a révélé la présence chez 50% de ces mâles d'un léger déficit de spermatides matures, ainsi que d'un défaut de spermiation et de plusieurs tubes « Sertoli-only ». La seule présence de l'allèle $L2$ de $Cbx3$ semble donc suffire à induire des défauts de spermatogenèse rappelant fortement ceux des souris $Cbx3^{-/-}$. L'ensemble de ces résultats suggère qu'un évènement incontrôlé a eu lieu lors du ciblage du gène $Cbx3$, et que cet évènement est partiellement responsable des phénotypes testiculaires observés chez les souris $Cbx3^{-/-}$; de plus, les souris WT et $Cbx3^{+/-}$ ne présentant aucun défaut de spermatogenèse, il est très probable que cet évènement soit génétiquement lié à l'allèle $L2$ de $Cbx3$.

4. Etude de l'évènement lié à l'allèle *L2* de *Cbx3* et influençant la spermatogenèse

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées quant à la nature de cet évènement. Ainsi, le phénotype décrit chez les souris *Cbx3*^{CSL2/L2}, *Cbx3*^{CS-/-} et *Cbx3*^{3-/-} pourrait en partie être dû à une intégration ectopique, au niveau par exemple d'un locus important pour la spermatogenèse, du vecteur de ciblage utilisé pour la recombinaison homologue. Cependant, comme nous l'avons vu, les analyses par Southern blot réalisées lors de l'établissement de la lignée portant l'inactivation germinale de *Cbx3* ont mis en évidence une seule intégration génomique de ce vecteur. Même si cette analyse n'exclut pas définitivement la possibilité d'une intégration ectopique non détectée, nous avons recherché d'autres causes possibles du phénotype testiculaire observé. Nous avons donc testé plusieurs hypothèses, comme l'existence d'anomalies dans l'expression de *Cbx3* ou des gènes avoisinant le locus de *Cbx3* induites par l'insertion des sites *LoxP*, ou des défauts d'épissage de l'ARNm de *Cbx3* liés au ciblage du gène et pouvant résulter en la production d'une protéine HP1 γ tronquée à action dominante négative.

a. Analyse de l'expression d'HP1 γ

La présence des sites *LoxP* au niveau du locus de *Cbx3* pourrait entraîner une perturbation de l'expression d'HP1 γ chez les souris *Cbx3*^{CSL2/L2}, qui ne serait pas visible en immunohistochimie et influencerait la spermatogenèse. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé par western blot l'expression d'HP1 γ entre des préparations de cellules de Sertoli purifiées de souris WT, *Cbx3*^{3-/-}, *Cbx3*^{CSL2/L2} et *Cbx3*^{CS-/-}. Les résultats ne montrent pas de différence majeure d'expression de cette protéine entre les souris des différents génotypes (**figure 81**), indiquant que l'insertion des sites *LoxP* n'a pas causé de modifications importantes de l'expression d'HP1 γ dans les cellules de Sertoli. Nous n'avons pas non plus observé de signal qui pourrait correspondre à une protéine tronquée issue de la traduction d'un variant d'épissage de *Cbx3*; cependant, l'anticorps anti-HP1 γ que nous utilisons reconnaissant la partie N-terminale de la protéine, il est possible qu'une telle protéine tronquée soit exprimée mais simplement indétectable du fait de la spécificité de l'anticorps.



Figure 81 : Analyse de l'expression d'HP1γ dans les cellules de Sertoli des mâles WT, *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CSL2/L2} et *Cbx3*^{CS-/-}. Western blot anti-HP1γ sur des extraits protéiques de préparations de cellules de Sertoli purifiées ; une hybridation anti-β-tubuline a également été réalisée comme contrôle de charge protéique.

b. Analyse de l'expression des gènes situés à proximité de *Cbx3*

Nous avons également envisagé l'hypothèse que la présence des sites *LoxP* puisse influencer l'expression des gènes voisins du locus de *Cbx3*, entraînant des conséquences fonctionnelles. Nous avons donc analysé par RT-qPCR, dans les cellules de Sertoli de souris WT, *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2}, l'expression des gènes situés à proximité de *Cbx3* : *Hnrnpa2b1* (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2/b1*), *Nfe2l3* (*Nuclear factor erythroid-derived 2-like 3*) et *Snx10* (*Sorting nexin 10*), ainsi que l'expression de *Skap2* (*Src kinase-associated phosphoprotein 2*), un gène situé à environ 400 kb de *Cbx3* qui joue un rôle important dans les lymphocytes B au cours de la réponse immunitaire (Togni et al., 2005) (**figure 82 A**). L'expression des gènes *Nfe2l3* et *Snx10* dans les cellules de Sertoli est trop faible pour être analysable quel que soit le génotype des souris étudiées, et l'expression du gène *Skap2* ne montre pas de différences significatives entre les souris WT d'une part et les souris *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2} d'autre part (**figure 82 B**). L'expression du gène *Hnrnpa2b1* est significativement plus faible dans les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-} comparés aux mâles WT, mais ne montre pas de différence entre les mâles WT et *Cbx3*^{CSL2/L2}, suggérant que la délétion de l'exon 3 de *Cbx3* perturbe l'expression de ce gène mais que la présence des sites *LoxP* en eux-mêmes n'a pas d'influence sur cette expression (**figure 82 B**). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'insertion génomique des sites *LoxP* n'a pas entraîné de perturbation majeure de l'expression des gènes avoisinant le locus de *Cbx3*.

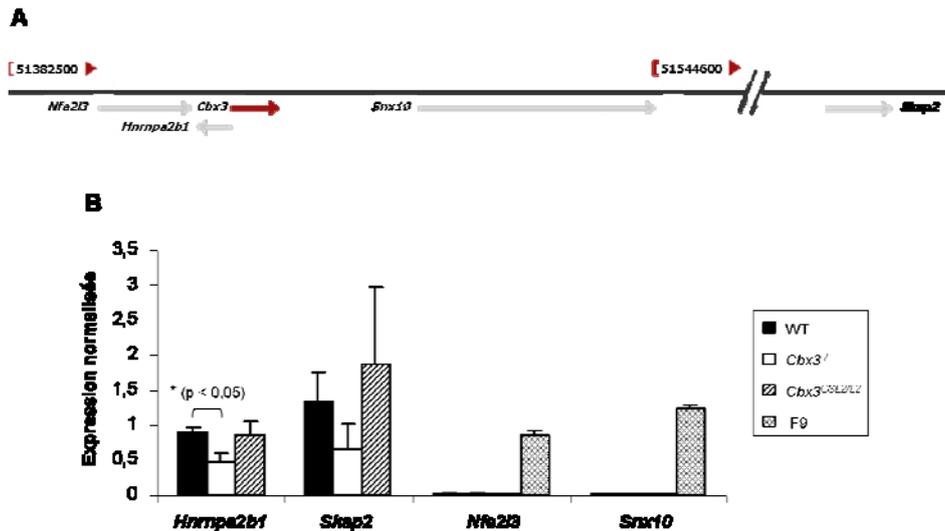


Figure 82 : Analyse de l'expression des gènes situés à proximité de *Cbx3*. A : cartographie de la région génomique autour du locus de *Cbx3*. B : comparaison par RT-qPCR sur cellules de Sertoli purifiées de l'expression des gènes *Hnrnpa2b1*, *Skap2*, *Nfe2l3* et *Snx10* entre les cellules de Sertoli de souris WT, *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2} ; des cellules de tétarocarcinome embryonnaire F9 ont été utilisées comme contrôle positif pour l'expression de *Nfe2l3* et *Snx10*. L'expression de chaque gène a été normalisée par l'expression du gène GAPDH.

c. Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3*

Nous avons ensuite voulu savoir si la présence des sites *LoxP* pouvait modifier l'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3*, induisant chez les souris *Cbx3*^{CSL2/L2} la production de variants d'épissage qui pourraient potentiellement coder pour des protéines HP1 γ tronquées ayant une influence délétère sur la spermatogenèse. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé l'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3* chez les mâles WT, *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CSL2/L2} et *Cbx3*^{CS-/-}, en utilisant une stratégie de RT-PCR sur cellules de Sertoli purifiées qui permet d'amplifier l'ADNc de *Cbx3* entre l'exon 1 et l'exon 6. Le profil de PCR résultant de cette expérience montre la présence, chez les mâles *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CS-/-}, des produits correspondant à l'amplification de l'ADNc issu des allèles *L*⁻, pour les mâles *Cbx3*^{-/-}, et *L2* et *L*⁻, pour les mâles *Cbx3*^{CS-/-}. De plus, un autre produit de PCR est également amplifié ; ce produit, plus petit que ceux correspondant aux allèles WT ou *L2* et *L*⁻, pourrait indiquer la présence d'un variant d'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3* (**figure 83**), car de tels variants ont souvent été décrits chez les souris génétiquement modifiées. Cependant, ce produit n'est pas visible chez les mâles WT et *Cbx3*^{CSL2/L2}, dont le profil de PCR montre uniquement le produit issu de l'amplification de l'allèle WT ou *L2* de *Cbx3* (**figure 83**).

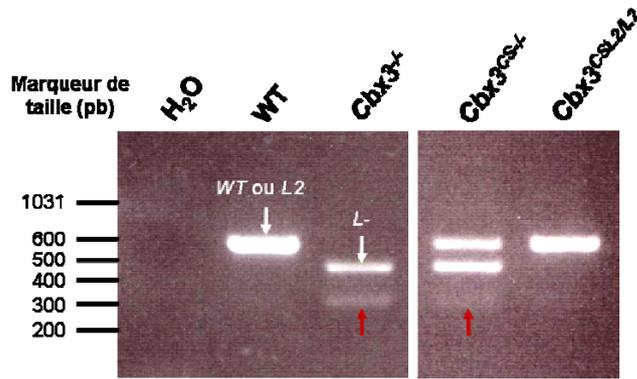


Figure 83 : Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3*. RT-PCR sur préparations de cellules de Sertoli purifiées de mâles WT, *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CS-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2}. WT ou L2, L- : produits de PCR résultant de l'amplification de l'ADNc issu respectivement des allèles WT ou L2 et L- de *Cbx3*. Flèches rouges : produit de PCR présent chez les mâles *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CS-/-}.

L'expression de certains transcrits peut être très faible ; il est donc possible que le produit de PCR non identifié présent chez les mâles *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{CS-/-} le soit également chez les mâles *Cbx3*^{CSL2/L2} mais ne puisse pas être détecté en PCR conventionnelle. Pour tester cette hypothèse, nous avons tiré parti de la technique de PCR « nichée » en réamplifiant, avec des oligonucléotides s'hybridant au niveau des exons 2 et 5 de *Cbx3*, le produit issu de l'amplification entre les exons 1 et 6 de l'ADNc de *Cbx3*. Le résultat montre à nouveau la présence d'un produit plus petit que ceux correspondant à l'amplification de l'ADNc issu des allèles WT ou L2 et L- de *Cbx3* ; de façon intéressante, ce produit est visible chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CSL2/L2} et *Cbx3*^{CS-/-}, mais pas chez les mâles WT (**figure 84**).

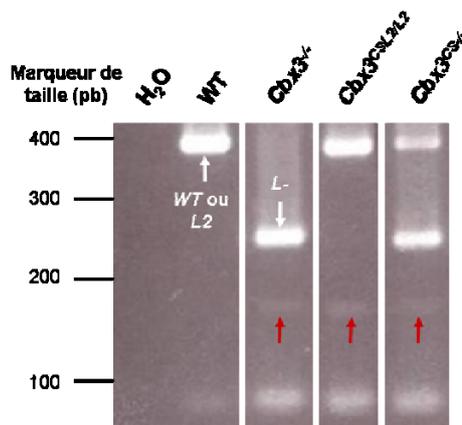


Figure 84 : Analyse de l'épissage de l'ARN pré-messager de *Cbx3*. RT-PCR nichée sur préparations de cellules de Sertoli purifiées de mâles WT, *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CS-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2}. WT ou L2, L- : produits de PCR résultant de l'amplification de l'ADNc issu respectivement des allèles WT ou L2 et L- de *Cbx3*. Flèches rouges : produit de PCR nichée présent chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, *Cbx3*^{CS-/-} et *Cbx3*^{CSL2/L2}.

Nous avons cloné et séquencé ce produit, et nous avons comparé sa séquence, traduite dans les 6 phases de lecture possibles, à celle d'HP1 γ . Cette analyse a révélé que ce produit correspond effectivement à un variant d'épissage de *Cbx3*, dont les exons 3 et 4 ont été épissés (**figure 85**). De façon intéressante, la délétion simultanée des exons 3 et 4 n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture de *Cbx3*, contrairement à la situation observée chez les souris *Cbx3*^{-/-}, chez lesquelles l'exon 3 seulement est délété. Cet épissage alternatif entraîne ainsi la production d'un ARNm comprenant uniquement la séquence correspondant au chromoshadowdomaine complet d'HP1 γ en phase avec le codon initiateur ; la protéine tronquée résultant de la traduction de cet ARNm pourrait donc montrer une action dominante négative, mimant les effets de l'inactivation de *Cbx3* chez les mâles *Cbx3*^{CSL2/L2}.

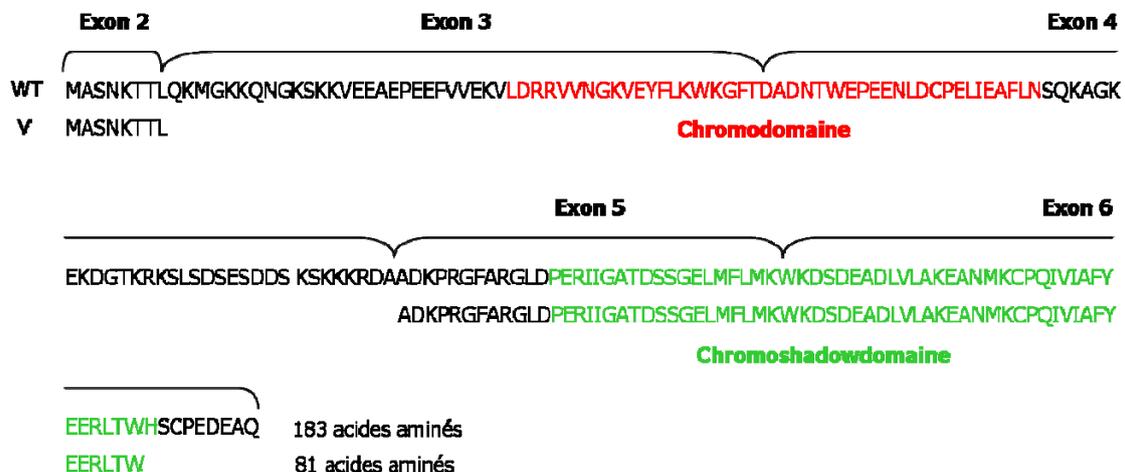


Figure 85 : Comparaison des séquences protéiques de la protéine HP1 γ entière (WT) et du variant présent chez les mâles *HP1 γ* ^{-/-} et *AMH-Cre*⁺/*HP1 γ* ^{L2/L2} (V). Dans ce variant, les exons 3 et 4 sont délétés, ce qui pourrait permettre la production uniquement du chromoshadowdomaine entier d'HP1 γ .

Malheureusement, l'amplification par RT-PCR du produit correspondant à ce variant d'épissage n'est pas reproductible chez une même souris *Cbx3*^{CSL2/L2}, suggérant que son expression est très faible et son amplification stochastique ; de plus, nous avons également observé une amplification non reproductible de ce produit chez les souris WT. Ces résultats permettent de supposer que le phénotype testiculaire présent chez les souris *Cbx3*^{CSL2/L2} n'est probablement pas causé par la présence de ce variant d'épissage ; l'origine de ce phénotype reste donc à déterminer.

IV. Discussion

1. Implication d'HP1 γ dans la spermatogénèse

Nous avons observé que les souris *Cbx3*^{-/-} présentent une spermatogénèse déficiente, se traduisant au niveau histologique par la présence de tubes séminifères « Sertoli-only » et un défaut de spermiation ; ce résultat montre qu'HP1 γ est essentielle à la spermatogénèse.

De façon étonnante, la méiose ne semble pas affectée chez les mâles *Cbx3*^{-/-}, puisque chez les mâles âgés de 7 mois les tubes séminifères qui contiennent des cellules germinales présentent une spermatogénèse allant jusqu'au stade de la spermiation ; cette observation indique qu'HP1 γ n'est pas nécessaire à la méiose. Ce résultat est inattendu étant donné les implications de Swi6 dans la ségrégation chromosomique chez *S. pombe* (Bernard et al., 2001) ; de plus, chez des souris déficientes pour les histone méthyltransférases Suv39h, la perte de la marque H3K9me3 entraîne une délocalisation des protéines HP1 hors des régions d'hétérochromatine péricentromériques et est associée à une augmentation de l'instabilité des chromosomes qui conduit à de graves perturbations de la méiose (Peters et al., 2001 ; Maison et al., 2002), suggérant que les protéines HP1 jouent un rôle important au cours de ce processus. Nos résultats laissent penser soit qu'HP1 γ n'est pas requise pour le bon déroulement de la méiose, et que ce sont les autres protéines de la famille HP1 qui interviennent au cours de cette étape de la spermatogénèse, soit que le rôle d'HP1 γ au cours de ce processus peut être facilement compensé par HP1 α et HP1 β . L'étude de souris chez lesquelles les gènes codant pour les membres de la famille HP1 ont été inactivés séparément ou deux à deux devrait permettre de trancher entre ces deux possibilités ; en particulier, les souris déficientes en HP1 α ne présentant comme nous l'avons vu aucun trouble de la spermatogénèse, l'étude de mâles *Cbx5*^{-/-}*Cbx3*^{-/-} devrait être très informative du point de vue de la redondance fonctionnelle.

De façon inattendue, nous avons constaté que les souris *Cbx3*^{L2/L2}, supposées avoir une spermatogénèse similaire à celle des souris sauvages, présentent plusieurs caractères phénotypiques également relevés chez les souris *Cbx3*^{-/-}. Ces observations suggèrent que le ciblage des allèles de *Cbx3* pourrait avoir introduit un évènement influençant les phénotypes observés chez les souris *Cbx3*^{-/-}, rendant difficile l'interprétation de nos résultats. L'équipe de Prim Singh a récemment publié une étude sur des souris portant une mutation hypomorphe de *Cbx3*, résultant en des niveaux d'expression très faibles d'HP1 γ (Brown et al., 2010). Certains des phénotypes que nous avons observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} ont également été décrits chez les souris *Cbx3*^{hypo/hypo} de cette étude, comme un hypogonadisme sévère et des défauts de

spermatogenèse de sévérité variable d'un tube à l'autre, allant de la présence de tubes « Sertoli-only » à des tubes montrant une spermatogenèse complète mais une rareté de spermatides matures : il est donc probable que ces défauts sont effectivement causés par l'absence d'HP1 γ . Cependant, certains des phénotypes que nous avons observé chez les souris *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{L2/L2}, notamment le défaut de spermiation et la présence de cellules de Sertoli montrant des blocs d'hétérochromatine fragmentés, ne sont pas décrits par cette étude. Comme l'origine du phénotype présent chez les souris *Cbx3*^{L2/L2} reste à déterminer, il est délicat pour l'instant de déterminer dans quelle mesure ces défauts spécifiques sont dûs à l'inactivation de *Cbx3*.

Nous avons mis en évidence l'existence, chez les souris *Cbx3*^{-/-}, d'un variant d'épissage de *Cbx3* contenant uniquement la séquence codant pour le chromoshadowdomaine en phase avec le codon initiateur ; ce variant pourrait donc potentiellement coder pour une protéine HP1 γ tronquée agissant comme un dominant négatif et, s'il est également exprimé chez les souris *Cbx3*^{L2/L2}, permettre de mimer le phénotype observé chez les souris *Cbx3*^{-/-}. L'analyse de l'expression de ce variant au niveau ARNm chez les souris *Cbx3*^{L2/L2} n'est pas reproductible, mais on pourrait supposer que ce variant soit tout de même traduit, le niveau d'expression d'un ARNm ne reflétant pas forcément son expression au niveau protéique. De plus, l'anticorps anti-HP1 γ que nous utilisons est dirigé contre le chromodomaine d'HP1 γ ; comme le variant que nous avons décrit code potentiellement pour une protéine correspondant au CSD d'HP1 γ , il est possible que cette protéine soit exprimée mais ne puisse pas être détectée. Pour tester cette hypothèse, une analyse par western-blot d'extraits protéiques sertoliens de souris WT, *Cbx3*^{-/-} et *Cbx3*^{L2/L2} avec un anticorps spécifique du CSD d'HP1 γ pourra être réalisée.

2. Implication possible d'HP1 γ au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Il est également possible que les défauts de spermatogenèse observés chez les mâles *Cbx3*^{-/-} aient une cause centrale plutôt que périphérique, c'est-à-dire en relation avec les sécrétions hormonales au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Comme nous l'avons vu, l'hypophyse antérieure sécrète l'hormone FSH stimulant les cellules de Sertoli ; ainsi, un défaut de sécrétion de FSH pourrait conduire à un dysfonctionnement sertolien perturbant gravement la spermatogenèse (pour revue, O'Shaughnessy et al., 2009). Afin de tester cette hypothèse, des dosages hormonaux chez les mâles *Cbx3*^{-/-} pourront être envisagés, ainsi qu'une quantification de l'expression de gènes activés par la voie de signalisation de la FSH. Des expériences d'immunohistochimie pourront également être réalisées au niveau de

l'hypophyse de souris WT et *Cbx3*^{-/-}, permettant de comparer la proportion de cellules sécrétrices de FSH entre les souris de ces deux génotypes.

3. Implication d'HP1 γ dans l'organisation sub-nucléaire des cellules de Sertoli

De façon intéressante, nous avons observé une délocalisation hors de l'hétérochromatine d'HP1 β et TIF1 β , mais non d'HP1 α , dans les cellules de Sertoli des mâles *Cbx3*^{-/-}; ces observations suggèrent qu'HP1 γ est nécessaire pour le recrutement et/ou le maintien d'HP1 β et TIF1 β au niveau de l'hétérochromatine sertolienne. De plus, les cellules montrant une délocalisation d'HP1 β sont situées presque exclusivement autour des tubes séminifères « Sertoli-only », et ces cellules présentent le plus souvent une fragmentation des blocs d'hétérochromatine; ces résultats laissent ainsi supposer que la délocalisation d'HP1 β , la topologie sub-nucléaire anormale des cellules de Sertoli et l'absence des cellules germinales pourraient être liées.

La délocalisation d'HP1 β et TIF1 β n'a pas été décrite dans l'étude de l'équipe de Prim Singh, mais il faut souligner que le système de révélation des immunomarquages utilisé dans cette étude est chromogène et non pas fluorescent, ce qui permet peut-être de moins bien distinguer tant la topologie sub-nucléaire des cellules que des anomalies de localisation sub-nucléaire spécifiques. Par ailleurs, on pourrait envisager que si la protéine codée par le variant décrit plus haut est réellement exprimée, sa présence puisse être dans une certaine mesure responsable de la délocalisation de TIF1 β et HP1 β , le CSD étant le domaine d'hétérodimérisation des HP1 et de leur interaction avec TIF1 β . Cependant, il serait difficile dans ce cas de comprendre pourquoi HP1 β est délocalisée uniquement dans les cellules de Sertoli présentes autour des tubes vides; ce résultat pourrait suggérer que la protéine tronquée, pour une raison inconnue, est exprimée uniquement dans les cellules de Sertoli présentes autour des tubes « Sertoli-only », mais cette hypothèse est peu probable du fait que TIF1 β montre une délocalisation de l'hétérochromatine dans toutes les cellules de Sertoli. Cette observation, ainsi que le fait que nous n'observons pas de délocalisation d'HP1 β dans les autres types cellulaires du testicule, suggère que la délocalisation sertolienne d'HP1 β est probablement un effet réel de l'inactivation de *Cbx3*, et pas seulement la conséquence de la présence d'une protéine tronquée ayant un potentiel de dominant négatif.

Les cellules montrant une délocalisation d'HP1 β sont principalement situées autour des tubes séminifères « Sertoli-only », et ces mêmes cellules présentent également une fragmentation de leurs blocs d'hétérochromatine. Ces observations suggèrent que la délocalisation d'HP1 β et la désorganisation de l'hétérochromatine pourraient être liées; cette

désorganisation sub-nucléaire pourrait avoir des conséquences délétères sur la fonction des cellules de Sertoli et conduire à la dégénérescence des cellules germinales. En effet, il a été montré que le noyau des cellules en général est organisé en régions fonctionnelles distinctes et spécialisées dans différents processus nucléaires (Misteli, 2007). Ainsi, la fragmentation des spots d'hétérochromatine pourrait avoir perturbé cette organisation, entraînant des conséquences fonctionnelles sur la transcription des gènes sertoliens. Pour tester cette hypothèse, une analyse de puces à ADN ou de RNA-seq est envisageable.

De façon intéressante, nous n'avons pas observé de délocalisation marquée d'HP1 α dans les cellules de Sertoli, suggérant qu'HP1 γ n'est pas nécessaire au recrutement hétérochromatinien d'HP1 α . De plus, nous n'avons pas non plus observé de délocalisation d'HP1 β et TIF1 β dans les cellules de Sertoli déficientes en HP1 α ; ce résultat est surprenant étant donné le rôle d'HP1 α dans la compaction de l'hétérochromatine. Par ailleurs, la localisation sub-nucléaire d'HP1 γ a été décrite comme étant plutôt euchromatinienne dans de nombreux types cellulaires ; cependant, sa localisation est clairement hétérochromatinienne dans les cellules de Sertoli, suggérant un rôle de cette protéine dans l'organisation de l'hétérochromatine. L'ensemble de ces résultats laisse envisager un modèle hiérarchique de l'implication des HP1 au niveau de la formation des superstructures hétérochromatiniennes, dans les cellules de Sertoli : HP1 α pourrait intervenir dans la compaction de l'hétérochromatine au niveau le plus basal, et HP1 γ servirait de plateforme, peut-être *via* son interaction avec HP1 α , pour le recrutement d'HP1 β ; cette protéine pourrait *in fine* permettre le pontage des différents sous-blocs d'hétérochromatine entre eux pour former de plus gros blocs. Cette organisation sub-nucléaire très hiérarchisée pourrait être requise pour l'accomplissement correct des fonctions des cellules de Sertoli.

Enfin, le fait que la délocalisation de TIF1 β soit observée à la fois dans les cellules de Sertoli « normales » et montrant une topologie sub-nucléaire anormale suggère que cette localisation n'a pas forcément de lien avec la topologie anormale des cellules de Sertoli ; ainsi, la localisation à l'hétérochromatine de TIF1 β pourrait ne pas être indispensable à l'organisation superstructurale de l'hétérochromatine sertolienne et/ou à la fonction des cellules de Sertoli.

4. Variabilité phénotypique des souris *Cbx3*^{-/-}

De façon frappante, toutes les expériences réalisées sur les souris *Cbx3*^{-/-} ont révélé une très grande hétérogénéité dans les phénotypes analysés, qui n'est pas sans rappeler le phénomène de PEV ; par exemple, nous avons observé que la proportion de tubes « Sertoli-

only » chez les mâles *Cbx3*^{-/-} peut varier de 20 à 80% selon les animaux, et que chez un même animal, les degrés de sévérité du phénotype de spermatogenèse varient du tube « Sertoli-only » au tube présentant une spermatogenèse complète mais montrant un défaut de libération des spermatides matures dans la lumière du tube. Cette hétérogénéité peut s'expliquer si l'on considère HP1 γ comme une protéine de « sécurité » plutôt qu'une protéine de « nécessité » ; en comparant par exemple l'organisation fonctionnelle d'une cellule à une porte munie d'une clé, on peut imaginer qu'HP1 γ joue plutôt le rôle de la clé, permettant de sécuriser la fermeture de la porte, que celui du pêne, sans lequel la porte ne pourrait pas être fermée. Ainsi, le rôle d'HP1 γ au niveau cellulaire pourrait être d'apporter un niveau de sécurité et de contrôle supplémentaire à différents processus cellulaires. Une cellule privée d'HP1 γ pourra donc éventuellement s'en passer, se différencier et assurer ses fonctions normalement, cependant cette cellule aura un niveau de contrôle en moins et sera davantage sensible aux éléments pouvant perturber son homéostasie ; un évènement perturbateur sans importance en temps normal pourra ainsi entraîner en l'absence d'HP1 γ de graves conséquences fonctionnelles, affectant la différenciation et/ou les fonctions cellulaires.

Pour expliquer l'hétérogénéité phénotypique des souris *Cbx3*^{-/-}, il faut également considérer la possibilité d'une redondance fonctionnelle entre les protéines de la famille HP1. Les fonctions d'HP1 γ pourraient ainsi être plus ou moins bien compensées par HP1 α et HP1 β ; HP1 γ étant, comme nous l'avons vu, le membre de la famille HP1 présentant le plus de divergences avec les autres membres, une compensation efficace de son absence par les autres protéines HP1 n'est peut-être pas toujours réalisable. L'étude de souris chez lesquelles les gènes codant pour HP1 α , HP1 β et HP1 γ ont été inactivés deux à deux apportera certainement de précieuses informations sur l'étendue de cette redondance fonctionnelle.

5. Perspectives pour l'identification de l'évènement induit par le ciblage de *Cbx3*

Nous avons vu que le phénotype visible chez les souris *Cbx3*^{L2/L2} ne peut pas s'expliquer par une dérégulation de l'expression d'HP1 γ , ni par une dérégulation de l'expression des gènes situés dans le voisinage du locus, mais d'autres explications sont envisageables pour expliquer le phénotype testiculaire observé chez les souris *Cbx3*^{L2/L2}. Par exemple, il a été montré que des régions génomiques peuvent s'influencer grâce à des interactions en *trans*. De nombreuses interactions de chromatine entre différents loci génomiques, en *cis* ou en *trans*, ont été décrites ; elles sont souvent spécifiques d'un type cellulaire et indiquent un rôle fonctionnel de l'organisation génomique dans la régulation de l'expression génique (pour revue, Cope et al., 2010). Ainsi, l'une de ces interactions les mieux

caractérisée est l'interaction entre le gène de la β -globine spécifique des érythroïdes et son « enhancer », le LCR (Locus Control Region), situé environ 50 kb en 5' du gène. Le LCR régule la transcription du gène durant le développement érythroïde en interagissant spécifiquement avec le gène au moyen d'une boucle d'ADN. D'autres interactions permettant de réguler l'activité des gènes ont été mises en évidence en *trans* : par exemple, la région de contrôle de l'empreinte parentale *H19*, située sur le chromosome 7 chez la souris, entraîne l'extinction transcriptionnelle de l'allèle maternel du gène *Igf2r*, et a été montrée interagir en *trans* avec plus de quatre chromosomes différents dans les tissus embryonnaires. Ainsi, il est envisageable que l'insertion des sites *LoxP* au niveau du locus de *Cbx3* ait perturbé une région régulatrice d'un gène important pour la spermatogenèse et situé soit très loin sur le même chromosome, soit sur un chromosome différent ; la présence des sites *LoxP* pourrait empêcher des interactions chromatiniennes nécessaires à la régulation de ce gène. Cette hypothèse pourrait être testée en réalisant des expériences de capture de conformation chromosomique impliquant le locus de *Cbx3*, chez des souris WT et *Cbx3*^{L2/L2}.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les fonctions moléculaires des protéines de la famille HP1 ont été relativement bien caractérisées. De nombreuses études ont mis en évidence leurs rôles au niveau de la chromatine, à travers des processus aussi variés que la régulation de la transcription, la compaction de l'hétérochromatine, la fonction des centromères et des télomères ainsi que la réplication et la réparation de l'ADN ; cependant les fonctions physiologiques des protéines HP1 sont encore mal connues chez les mammifères. Afin d'élucider les fonctions *in vivo* d'HP1 γ , la protéine ayant les fonctions moléculaires les plus divergentes de la famille HP1, j'ai étudié au cours de mon travail de thèse les conséquences physiologiques de l'inactivation chez la souris du gène *Cbx3* codant pour cette protéine ; étant donné le rôle au niveau chromatinien des protéines HP1, je me suis particulièrement intéressée aux processus physiologiques faisant intervenir des mécanismes de recombinaison génomique, comme l'hématopoïèse et la spermatogenèse.

Bien que certaines observations restent à confirmer en raison de l'existence d'un évènement lié au ciblage du gène *Cbx3* et influençant certains des phénotypes décrits, les résultats de mon travail suggèrent qu'HP1 γ joue un rôle important dans plusieurs mécanismes intervenant dans la défense immunitaire, incluant la migration des lymphocytes Th au niveau de la rate, la maturation des lymphocytes B et la commutation vers l'isotype IgG1 lors de la recombinaison de classe ; de plus, HP1 γ est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse et semble impliquée dans l'organisation sub-nucléaire des cellules de Sertoli. En effet, les résultats de mon travail suggèrent qu'HP1 γ intervient dans le recrutement au niveau de l'hétérochromatine sertolienne d'HP1 β et TIF1 β , mais non d'HP1 α ; de façon étonnante, HP1 α , malgré ses fonctions dans la compaction de l'hétérochromatine, ne semble pas être impliquée dans le recrutement hétérochromatinien d'HP1 β et TIF1 β . Ainsi, mes résultats suggèrent qu'HP1 γ joue le rôle d'une plateforme permettant de coordonner différentes protéines impliquées dans la compaction de l'hétérochromatine, en vue de l'établissement et/ou de la maintenance d'une organisation sub-nucléaire spécifique pouvant avoir des répercussions sur les fonctions sertoliennes au cours de la spermatogenèse.

Comme nous l'avons vu, les deux principaux systèmes physiologiques affectés par l'inactivation de *Cbx3*, c'est-à-dire les processus de défense immunitaire et la spermatogenèse, nécessitent effectivement des mécanismes de recombinaison de l'ADN.

HP1 γ ne semble pas intervenir directement au niveau de la recombinaison de l'ADN, mais de façon intéressante, mon travail suggère que son rôle dans ces processus pourrait se situer très en amont des mécanismes en eux-mêmes : en effet, il est envisageable qu'HP1 γ contribue à l'établissement et/ou à la maintenance d'une structure chromatinienne spécifique à des stades précoces du développement des cellules, qui permettrait de préparer la mise en place des mécanismes de recombinaison de l'ADN et/ou autoriserait leur bon déroulement.

Les résultats de mon travail, mis en perspective avec ceux d'autres équipes, indiquent également que les protéines HP1 ont des fonctions physiologiques non redondantes, HP1 γ intervenant dans la défense immunitaire ainsi que dans la spermatogenèse, et HP1 β étant indispensable au développement des jonctions neuromusculaires et du cortex cérébral (Aucott et al., 2008). Une telle spécificité de fonction pour chacune de ces protéines pourrait constituer une offre à une demande créée par la diversification des fonctions physiologiques chez les eucaryotes supérieurs au cours de l'évolution, imposant la nécessité de mécanismes de plus en plus spécialisés pour des processus biologiques de plus en plus complexes.

Cependant, certains résultats suggèrent que les fonctions des protéines HP1 peuvent également être redondantes dans une certaine mesure : par exemple, le fait que chez les souris *Cbx3*^{-/-} certains tubes séminifères seulement montrent une spermatogenèse complète, ainsi que l'observation que des souris déficientes en HP1 α ne présentent pas de problème de viabilité, ni aucun défaut développemental ou fonctionnel apparent (F. Cammas, communication personnelle) malgré les fonctions de cette protéine dans la compaction de l'hétérochromatine, pourraient indiquer une compensation de certains défauts par les autres protéines de la famille HP1. Afin de démontrer rigoureusement cette redondance fonctionnelle, il sera nécessaire de réaliser une étude approfondie de souris générées au laboratoire, chez lesquelles les gènes codant pour les protéines HP1 sont inactivés deux à deux. De façon intéressante, les résultats de l'analyse préliminaire de telles souris montrent que l'absence d'HP1 α et HP1 γ chez les souris *Cbx5*^{-/-}*Cbx3*^{-/-}, et d'HP1 β et HP1 γ chez les souris *Cbx1*^{-/-}*Cbx3*^{-/-}, sont associées à une létalité embryonnaire autour des stades E7,5 et E13,5, respectivement ; ces observations indiquent que les fonctions des protéines HP1 α et HP1 γ d'une part, HP1 β et HP1 γ d'autre part, sont redondantes au cours du développement (résultats non montrés et F. Cammas et G. Auclair, communication personnelle). Une caractérisation plus poussée de ces défauts est en cours afin de mieux comprendre les fonctions respectives de chacune des protéines HP1 au cours du développement.

A moyen et long terme, la génération d'une nouvelle lignée de souris portant l'inactivation de *Cbx3* sera probablement nécessaire afin d'établir définitivement dans quelle mesure l'absence d'HP1 γ est responsable des phénotypes que nous avons décrits ; mais ce modèle murin, ainsi que les modèles cellulaires pouvant en être dérivés, comme des cellules ES et des fibroblastes embryonnaires, constitueront de fantastiques outils de travail permettant mieux appréhender *in vivo*, chez les mammifères, les différents mécanismes moléculaires dans lesquels est impliquée HP1 γ . En particulier, une caractérisation moléculaire des défauts présents chez les souris *Cbx3*^{-/-} sera également entreprise pour mieux comprendre le rôle précis d'HP1 γ au niveau de chacun des processus physiologiques dans lesquels cette protéine semble impliquée. Ainsi, l'étude de la structure chromatinienne au cours du développement des lymphocytes B sera certainement très informative sur le rôle que peut jouer HP1 γ en amont des mécanismes de CSR. D'autre part, la caractérisation chez les souris *Cbx3*^{-/-} de l'état transcriptionnel des cellules de Sertoli, ainsi qu'une analyse plus approfondie de leur structure chromatinienne, devrait permettre de mieux comprendre les relations entre structure de l'hétérochromatine et fonction des cellules de Sertoli au cours de la spermatogenèse.

Annexes

Annexes

Annexe I : Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR quantitative

Marqueurs de maturation des cellules de Sertoli :

- Cldn11* : (sens) 5'- GGGTGCTCCTTATTCTGCTG - 3'
(antisens) 5'- AGCGAGTAGCCAAAGCTCAC - 3'
- Col9a3* : (sens) 5'- GGACAAGGGAGCAACAGGTG - 3'
(antisens) 5'- GCACCATCTCGACCATCTTTG - 3'
- Gdnf* : (sens) 5'- CCGGTAAGAGGCTTCTCG - 3'
(antisens) 5'- CGTCATCAAACCTGGTCAGGA - 3'
- Trsfm* : (sens) 5'- ACCTGTGTATTGGCCCACTC - 3'
(antisens) 5'- AGGGTTCTTTCCTTCGGTG - 3'
- HPRT* : (sens) 5'- TGACACTGGCAAACAATG - 3'
(antisens) 5'- GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT - 3'

Elements répétés :

- LINE 1* : (sens) 5'-AGTGCAGAGTTCTATCAGACCTTC - 3'
(antisens) 5'-AACCTACTTGGTCAGGATGGATG - 3'
- SINE B2* : (sens) 5'-GAGCACCTGACTGCTCTTCC - 3'
(antisens) 5'-ACACACCAGAAGAGGGCATC - 3'
- IAP* : (sens) 5'- CGAGGGTGGTTCTCTACTCCAT - 3'
(antisens) 5'- GACGTGTCCTCCCTGATTGG - 3'
- U3-II* : (sens) 5'- GAACTCTTCCTCACCCCAGA - 3'
(antisens) 5'- GAGGAGGAGTTCAGGAATGC - 3'
- U3-III* : (sens) 5'- CTTTTCACCCCAAACCTCCTC - 3'
(antisens) 5'- CATCACTAGGGAGTTCTGCCA - 3'

Gènes du locus de *Cbx3* :

- Hnrnpa2b1* : (sens) 5'- TTGGTTTTGGGGATTCTCGT - 3'
(antisens) 5'- AATCCACGTCCACTTCCGTA - 3'
- Nfe2l3* : (sens) 5'- ACCGAGGCTAGGAACGAGAG - 3'
(antisens) 5'- CACTGCTCAGAAAAGGTGGA - 3'
- Skap2* : (sens) 5'- GATATGGCTGGTGGGTAGGA - 3'
(antisens) 5'- ACTCAGGCATTCCATGTTCC - 3'
- Snx10* : (sens) 5'- AAGAAAGACGCCGACGTAGA - 3'
(antisens) 5'- AGAGCTGGGCTCGTTTTACA - 3'

Annexe II : Combinaisons d'anticorps utilisées pour les différents marquages de cellules hématopoïétiques, en vue de l'analyse par cytométrie en flux

Le trait entre deux anticorps indique une étape de lavage.

Thymus - Lymphocytes T, cellules NK et cellules NKT

H57-biotine : 0,5 µl
Avidine-Cy5 : 0,5 µl
CD4-PE : 1 µl
CD8-PerCP-Cy5.5 : 0,5 µl
CD69-FITC : 2,5 µl

CD24-biotine : 0,5 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
CD4-PE : 1 µl
CD8-FITC : 0,5 µl
CD3-Cy5 : 0,5 µl

CD4 (GK1.5) : 50 µl
CD8 (YT5) : 50 µl
CD3 (KT3) : 25 µl
Anti-rat-FITC : 1 µl
Sérum de rat 5% : 20 µl
CD44-biotine : 0,5 µl
Avidine-Cy5 : 0,5 µl
CD25-PE : 0,25 µl

CD4-biotine : 1 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
CD8-FITC : 0,5 µl
CD3-Cy5 : 0,5 µl
CD25-PE : 0,25 µl

CD24 (M1/69) : 25 µl
Anti-rat-Cy5 : 0,5 µl
Sérum de rat 5% : 20 µl
GL3-biotine : 0,5 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
CD4-PE : 1 µl
CD8-FITC : 0,5 µl

CD3-Cy5 : 0,5 µl
NK1.1-PE : 0,5 µl

Rate et ganglions lymphatiques - Lymphocytes T, cellules NK et cellules NKT

Blocage Fc : 0,5 µl
H57-biotine : 0,5 µl
Avidine-Cy5 : 0,5 µl
CD44-FITC : 1 µl
CD4-PE : 1 µl
CD8-PerCP-Cy5.5 : 0,5 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
DX5-biotine : 0,5 µl
Avidine-FITC : 0,5 µl
CD3-Cy5 : 0,5 µl
NK1.1-PE : 0,5 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
CD44-biotine : 0,5 µl
Avidine-Cy5 : 0,5 µl
CD62L-FITC : 0,5 µl
CD4-PE : 1 µl
CD8-PerCP-Cy5.5 : 0,5 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
CD4-biotine : 0,5 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
CD8-FITC : 0,5 µl
CD3-Cy5 : 0,5 µl
CD25-PE : 0,25 µl

Rate - Lymphocytes B

Blocage Fc : 0,5 µl
IgD-FITC : 0,5 µl
IgM-PE : 0,2 µl
CD19-PerCP-Cy5.5 : 0,5 µl
B220-Cy5 : 0,5 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
CD23-biotine : 0,2 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
CD21-FITC : 0,5 µl
B220-Cy5 : 0,5 µl

CD86 purifié : 0,5 µl
Anti-rat-Cy5 : 0,5 µl
Sérum de rat 5% : 20 µl
Blocage Fc : 0,5 µl
CD138-biotine : 0,5 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
GL7-FITC : 0,5 µl
B220-PE : 0,5 µl

Moelle osseuse et foie - Lymphocytes B

30F1 purifié : 1 µl
Anti-rat-Cy5 : 0,5 µl
Sérum de rat 5% : 20 µl
Blocage Fc : 0,5 µl
B220-biotine : 0,5 µl
Avidine-PerCP : 0,5 µl
BP1-FITC : 1 µl
CD43-PE : 1 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
CD25-biotine : 1 µl
Avidine-PE-Cy7 : 0,08 µl
IgM-Cy5 : 0,25 µl
B220-FITC : 0,5 µl
CD43-PE : 0,5 µl

Blocage Fc : 0,5 µl
IgD-FITC : 0,5 µl
IgM-PE : 0,2 µl
CD19-PerCP-Cy5.5 : 0,5 µl
B220-Cy5 : 0,5 µl

Moelle osseuse et rate - Cellules dendritiques

Blocage Fc : 0,5 µl
CD11c-APC : 0,5 µl
120G8-A488 : 0,5 µl
CD11b-PE : 0,5 µl

Moelle osseuse et rate - Macrophages, neutrophiles

Blocage Fc : 0,5 µl
CD115-biotine : 0,5 µl
Avidine-PE : 0,5 µl
CD11b-APC : 0,5 µl
GR1-FITC : 0,5 µl

Moelle osseuse, rate et foie - Erythrocytes

Blocage Fc : 0,5 µl
CD71-biotine : 0,5 µl
Avidine-Cy5 : 0,5 µl
Ter-119 PE : 0,5 µl

Bibliographie

Bibliographie

A

Agarwal N., Hardt T., Brero A., Nowak D., Rothbauer U., Becker A., Leonhardt H., Cardoso M. C. (2007). MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* **35**, 5402-5408.

Ahmad K., Henikoff S. (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16477-16484.

Aitken R. J., Findlay J. K., Hutt K. J., Kerr J. B. (2011). Apoptosis in the germ line. *Reproduction* **141**, 139-150.

Akhmanova A., Miedema K., Hennig W. (1996). Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett* **388**, 219-222.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). "Molecular biology of the cell". *Garland Science*.

Aucott R., Bullwinkel J., Yu Y., Shi W., Billur M., Brown J. P., Menzel U., Kioussis D., Wang G., Reisert I., et al. (2008). HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *J Cell Biol* **183**, 597-606.

Ausió J. (2006). Histone variants--the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**, 228-243.

Ayoub N., Jeyasekharan A. D., Bernal J. A., Venkitaraman A. R. (2008). HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**, 682-686.

Ayoub N., Jeyasekharan A. D., Venkitaraman A. R. (2009). Mobilization and recruitment of HP1: a bimodal response to DNA breakage. *Cell Cycle* **8**, 2945-2950.

B

Bachman K. E., Rountree M. R., Baylin S. B. (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* **276**, 32282-32287.

Bajénoff M., Egen J., Koo L. Y., Laugier J. P., Brau F., Glaichenhaus N., Germain R. N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **25**, 989-1001.

Bajénoff M., Glaichenhaus N., Germain R. N. (2008). Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol* **181**, 3947-3954.

Baldeyron C., Soria G., Roche D., Cook A. J. L., Almouzni G. (2011). HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol* **193**, 81-95.

Ball A. R., Yokomori K. (2009). Revisiting the role of heterochromatin protein 1 in DNA repair. *J Cell Biol* **185**, 573-575.

- Ball L. J., Murzina N. V., Broadhurst R. W., Raine A. R. C., Archer S. J., Stott F. J., Murzin A. G., Singh P. B., Domaille P. J., Laue E. D.** (1997). Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J* **16**, 2473-2481.
- Banaszynski L. A., Allis C. D., Lewis P. W.** (2010). Histone variants in metazoan development. *Dev Cell* **19**, 662-674.
- Bao Y., Konesky K., Park Y.-J., Rosu S., Dyer P. N., Rangasamy D., Tremethick D. J., Laybourn P. J., Luger K.** (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J* **23**, 3314-3324.
- Barnes P. J.** (2006). Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest* **129**, 151-155.
- Bártová E., Kozubek S., Jirsová P., Kozubek M., Lukášová E., Skalníková M., Cafourková A., Koutná I., Paseková R.** (2001). Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma* **110**, 360-370.
- Bártová E., Krejčí J., Harnicarová A., Kozubek S.** (2008). Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci. *Differentiation* **76**, 24-32.
- Beisel C., Paro R.** (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* **12**, 123-135.
- Bellvé A. R.** (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* **225**.
- Bellvé A. R., Cavicchia J. C., Millette C. F., O'Brien D. A., Bhatnagar Y. M., Dym M.** (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* **74**, 68-85.
- Berger S. L.** (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Bernard P., Maure J.-F., Partridge J. F., Genier S., Javerzat J.-P., Allshire R. C.** (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**, 2539-2542.
- Bernstein B. E., Kamal M., Lindblad-Toh K., Bekiranov S., Bailey D. K., Huebert D. J., McMahon S., Karlsson E. K., III E. J. K., Gingeras T. R., et al.** (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169-181.
- Bernstein E., Duncan E. M., Masui O., Gil J., Heard E., Allis C. D.** (2006). Mouse Polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* **26**, 2560-2569.
- Bernstein E., Hake S. B.** (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol* **84**, 505-517.
- Blower M. D., Karpen G. H.** (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* **3**, 730-739.
- Bogdanović O., Veenstra G. J. C.** (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* **118**, 549-565.

Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. R., Cremer T. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* **3**, e157.

Boulard M., Gautier T., Mbele G. O., Gerson V., Hamiche A., Angelov D., Bouvet P., Dimitrov S. (2006). The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol* **26**, 1518-1526.

Bourc'his D., Bestor T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**, 96-99.

Bourc'his D., Xu G.-L., Lin C.-S., Bollman B., Bestor T. H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**, 2536-2539.

Boussouar F., Benahmed M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 345-350.

Bouzinba-Segard H., Guais A., Francastel C. (2006). Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 8709-8714.

Boyle S., Gilchrist S., Bridger J. M., Mahy N. L., Ellis J. A., Bickmore W. A. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* **10**, 211-219.

Bradley S. P., Kaminski D. A., Peters A. H. F. M., Jenuwein T., Stavnezer J. (2006). The histone methyltransferase Suv39h1 increases class switch recombination specifically to IgA. *J Immunol* **177**, 1179-1188.

Bremner W. J., Millar M. R., Sharpe R. M., Saunders P. T. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* **135**, 1227-1234.

Brendolan A., Rosado M. M., Carsetti R., Selleri L., Dear T. N. (2007). Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* **29**, 166-177.

Brickner J. H., Walter P. (2004). Gene recruitment of the activated *INO1* locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol* **2**, e342.

Brown C. R., Kennedy C. J., Delmar V. A., Forbes D. J., Silver P. A. (2008). Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev* **22**, 627-639.

Brown J. P., Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Billur M., Schneider P., Winking H., Singh P. B. (2010). HP1gamma function is required for male germ cell survival and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin* **3**, 9.

C

Cabal G. G., Genovesio A., Rodriguez-Navarro S., Zimmer C., Gadal O., Lesne A., Buc H., Feuerbach-Fournier F., Olivo-Marin J.-C., Hurt E. C., Nehrbass U. (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**, 770-773.

- Cairns B. R.** (2005). Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 185-190.
- Caldas C., Kim M.-H., MacGregor A., Cain D., Aparicio S., Wiedemann L. M.** (1998). Isolation and characterization of a pufferfish *MLL* (mixed lineage leukemia)-like gene (*fMll*) reveals evolutionary conservation in vertebrate genes related to *Drosophila trithorax*. *Oncogene* **16**, 3233-3241.
- Cammas F., Herzog M., Lerouge T., Chambon P., Losson R.** (2004). Association of the transcriptional corepressor TIF1 β with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* **18**, 2147-2160.
- Campos E. I., Reinberg D.** (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* **43**, 559-599.
- Canzio D., Chang E. Y., Shankar S., Kuchenbecker K. M., Simon M. D., Madhani H. D., Narlikar G. J., Al-Sady B.** (2011). Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol Cell* **41**, 67-81.
- Cariappa A., Chase C., Liu H., Russell P., Pillai S.** (2007). Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* **109**, 2339-2345.
- Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M. J., Pilch D. R., Staudt D. W., Lee A., Bonner R. F., Bonner W. M., Nussenzweig A.** (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**, 675-679.
- Cesta M. F.** (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* **34**, 455-465.
- Chadwick B. P., Willard H. F.** (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**, 375-384.
- Chambeyron S., Bickmore W. A.** (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the *HoxB* locus upon induction of transcription. *Genes Dev* **18**, 1119-1130.
- Chambeyron S., Silva N. R. D., Lawson K. A., Bickmore W. A.** (2005). Nuclear re-organisation of the *Hoxb* complex during mouse embryonic development. *Development* **132**, 2215-2223.
- Chandley A. C., Speed R. M.** (1995). A reassessment of Y chromosomal behaviour in germ cells and Sertoli cells of the mouse as revealed by in situ hybridisation. *Chromosoma* **104**, 282-286.
- Charoensawan V., Wilson D., Teichmann S. A.** (2010). Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res* **38**, 7364-7377.
- Chen X., Gazzar M. E., Yoza B. K., McCall C. E.** (2009). The NF-kappaB factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **284**, 27857-27865.
- Cheng A. M., Rowley B., Pao W., Hayday A., Bolen J. B., Pawson T.** (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* **378**, 303-306.
- Cheng C. Y., Mruk D. D.** (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* **82**, 825-874.
- Cheutin T., McNairn A. J., Jenuwein T., Gilbert D. M., Singh P. B., Misteli T.** (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721-725.

- Chowdhury M., Forouhi O., Dayal S., McCloskey N., Gould H. J., Felsenfeld G., Fear D. J.** (2008). Analysis of intergenic transcription and histone modification across the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 15872-15877.
- Chung S., Wang S. P., Pan L., Mitchell G., Trasler J., Hermo L.** (2001). Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* **142**, 4272-4281.
- Churikov D., Siino J., Svetlova M., Zhang K., Gineitis A., Bradbury E. M., Zalensky A.** (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* **84**, 745-756.
- Clapier C. R., Cairns B. R.** (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**, 273-304.
- Cléard F., Delattre M., Spierer P.** (1997). SU(VAR)3-7, a Drosophila heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. *EMBO J* **16**, 5280-5288.
- Clermont Y., Perey B.** (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* **100**, 241-267.
- Cook P. R.** (1995). A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J Cell Sci* **108**, 2927-2935.
- Cope N. F., Fraser P., Eskiw C. H.** (2010). The yin and yang of chromatin spatial organization. *Genome Biol* **11**, 204.
- Costanzi C., Pehrson J. R.** (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599-601.
- Couteau F., Guerry F., Muller F., Palladino F.** (2002). A heterochromatin protein 1 homologue in *Caenorhabditis elegans* acts in germline and vulval development. *EMBO Rep* **3**, 235-241.
- Couture J.-F., Hauk G., Thompson M. J., Blackburn G. M., Trievel R. C.** (2006). Catalytic roles for carbon-oxygen hydrogen bonding in SET domain lysine methyltransferases. *J Biol Chem* **281**, 19280-19287.
- Cowieson N. P., Partridge J. F., Allshire R. C., McLaughlin P. J.** (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* **10**, 517-525.
- Cremer M., Küpper K., Wagler B., Wizelman L., Hase J. v., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M. R., Cremer T.** (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* **162**, 809-820.
- Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Müller S., Solovei I., Fakan S.** (2006). Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 307-316.
- Cryderman D. E., Grade S. K., Li Y., Fanti L., Pimpinelli S., Wallrath L. L.** (2005). Role of Drosophila HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn* **232**, 767-774.
- Cumano A., Godin I.** (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* **25**, 745-785.

D

- Dadoue J. P., Démolin A.** (1991). Structure et fonction du testicule. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme". pp. 221-250. Ellipses.
- Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., Richmond T. J.** (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **319**, 1097–1113.
- Davidson E. H., Levine M. S.** (2008). Properties of developmental gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 20063–20066.
- Deaton A. M., Bird A.** (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**, 1010-1022.
- De Gendt K., Swinnen J. V., Saunders P. T. K., Schoonjans L., Dewerchin M., Devos A., Tan K., Atanassova N., Claessens F., Lécureuil C., et al.** (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 1327-1332.
- Deininger P. L., Moran J. V., Batzer M. A., Kazazian H. H. J.** (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* **13**.
- De Lucia F., Ni J.-Q., Vaillant C., Sun F.-L.** (2005). HP1 modulates the transcription of cell-cycle regulators in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **33**, 2852–2858.
- Deng J., Szyf M.** (1998). Multiple isoforms of DNA methyltransferase are encoded by the vertebrate cytosine DNA methyltransferase gene. *J Biol Chem* **273**, 22869-22872.
- De Rooij D. G.** (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**, 347-354.
- Dhalluin C., Carlson J. E., Zeng L., He C., Aggarwal A. K., Zhou M.-M.** (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496.
- Dialynas G. K., Vitalini M. W., Wallrath L. L.** (2008). Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutat Res* **647**, 13-20.
- Dimitri P., Caizzi R., Giordano E., Accardo M. C., Lattanzi G., Biamonti G.** (2009). Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* **118**, 419–435.
- Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F.** (2005). The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* **27**, 29-41.
- Dohle G. R., Smit M., Weber R. F. A.** (2003). Androgens and male fertility. *World J Urol* **21**, 341-345.
- Dorman E. R., Bushey A. M., Corces V. G.** (2007). The role of insulator elements in large-scale chromatin structure in interphase. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 682-690.
- Dougherty M. K., Morrison D. K.** (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**, 1875-1884.
- Driel R. v., Fransz P.** (2004). Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? . *Exp Cell Res* **296**, 86-90.
- Dym M.** (1976). The mammalian rete testis--a morphological examination. *Anat Rec* **186**, 493-523.

Dym M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 11287-11289.

Dym M., Fawcett D. W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* **4**, 195-215.

E

Eckhardt F., Lewin J., Cortese R., Rakyan V. K., Attwood J., Burger M., Burton J., Cox T. V., Davies R., Down T. A., et al. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* **38**, 1378-1385.

Eissenberg J. C., Hartnett T. (1993). A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **240**, 333-338.

Eissenberg J. C., James T. C., Foster-Hartnett D. M., Hartnett T., Ngan V., Elgin S. C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 9923-9927.

Erickson-Lawrence M., Zabudoff S. D., Wright W. W. (1991). Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol Endocrinol* **5**, 1789-1798.

Espada J., Esteller M. (2010). DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 238-246.

F

Fan J. Y., Rangasamy D., Luger K., Tremethick D. J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* **16**, 655-661.

Fanti L., Giovinazzo G., Berloco M., Pimpinelli S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* **2**, 527-538.

Fazzari M. J., Greally J. M. (2004). Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* **5**, 446-455.

Fedorova E., Zink D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 2174-2184.

Feng S., Jacobsen S. E., Reik W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* **330**, 622-627.

Festenstein R., Pagakis S. N., Hiragami K., Lyon D., Verreault A., Sekkali B., Kioussis D. (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* **299**, 719-721.

Festenstein R., Sharghi-Namini S., Fox M., Roderick K., Tolaini M., Norton T., Saveliev A., Kioussis D., Singh P. (1999). Heterochromatin protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependent manner. *Nat Genet* **23**, 457-461.

- Filion G. J. P., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defosse P.-A.** (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* **26**, 169-181.
- Finlan L. E., Sproul D., Thomson I., Boyle S., Kerr E., Perry P., Ylstra B., Chubb J. R., Bickmore W. A.** (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* **4**, e1000039.
- Fischle W., Tseng B. S., Dormann H. L., Ueberheide B. M., Garcia B. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Funabiki H., Allis C. D.** (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-1122.
- Fischle W., Wang Y., Jacobs S. A., Kim Y., Allis C. D., Khorasanizadeh S.** (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**, 1870-1881.
- Fiserova J., Goldberg M. W.** (2010). Relationships at the nuclear envelope: lamins and nuclear pore complexes in animals and plants. *Biochem Soc Trans* **38**, 829-831.
- Fitzpatrick K. A., Sinclair D. A., Schulze S. R., Syrzycka M., Honda B. M.** (2005). A genetic and molecular profile of third chromosome centric heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Genome* **48**, 571-584.
- Flaus A., Martin D. M. A., Barton G. J., Owen-Hughes T.** (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* **34**, 2887-2905.
- Folco H. D., Pidoux A. L., Urano T., Allshire R. C.** (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* **319**, 94-97.
- Font-Burgada J., Rossell D., Auer H., Azorín F.** (2008). *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* **22**, 3007-3023.
- Förster R., Mattis A. E., Kremmer E., Wolf E., Brem G., Lipp M.** (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* **87**, 1037-1047.
- Förster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Müller I., Wolf E., Lipp M.** (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33.
- Francastel C., Magis W., Groudine M.** (2001). Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 12120-12125.
- Francastel C., Schübeler D., K.Martin D. I., Groudine M.** (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 137-143.
- Franke W. W., Grund C., Schmid E.** (1979). Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur J Cell Biol* **19**, 269-275.
- Freyer C., Park C. B., Ekstrand M. I., Shi Y., Khvorostova J., Wibom R., Falkenberg M., Gustafsson C. M., Larsson N.-G.** (2010). Maintenance of respiratory chain function in mouse hearts with severely impaired mtDNA transcription. *Nucleic Acids Res* **38**, 6577-6588.

Frydrychova R. C., Biessmann H., Mason J. M. (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res* **122**, 356-364.

Fu G., Ghadam P., Sirotkin A., Khochbin S., Skoultchi A. I., Clarke H. J. (2003). Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes. *Biol Reprod* **68**, 1569-1576.

G

Gaillard P.-H. L., Martini E. M.-D., Kaufman P. D., Stillman B., Moustacchi E., Almouzni G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **86**, 887-896.

García-Cao M., O'Sullivan R., Peters A. H. F. M., Jenuwein T., Blasco M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* **36**, 94-99.

Gary J. D., Clarke S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**, 65-131.

Gaszner M., Felsenfeld G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**, 703-713.

Gaucher J., Reynoird N., Montellier E., Boussouar F., Rousseaux S., Khochbin S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* **277**, 599-604.

Gilbert N., Thomson I., Boyle S., Allan J., Ramsahoye B., Bickmore W. A. (2007). DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. *J Cell Biol* **177**, 401-411.

Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Bradbury E. M., Zalensky A. O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* **151**, 1591-1598.

Glynn M., Kaczmarczyk A., Prendergast L., Quinn N., Sullivan K. F. (2010). Centromeres: assembling and propagating epigenetic function. *Subcell Biochem* **50**.

Godde J. S., Ura K. (2009). Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int J Dev Biol* **53**, 215-229.

Gosden R., Trasler J., Lucifero D., Faddy M. (2003). Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* **361**, 1975-1977.

Govin J., Caron C., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**, 3459-3469.

Greaves I. K., Rangasamy D., Devoy M., Graves J. A. M., Tremethick D. J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing facultative heterochromatin following meiosis. *Mol Cell Biol* **26**, 5394-5405.

Grewal S. I. S. (2010). RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 134-141.

Grewal S. I. S., Jia S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35-46.

Grewal S. S., Elgin S. C. R. (2007). Transcription and RNAi in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**, 399–406.

Griswold M. D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* **52**, 211-216.

Griswold M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 411-416.

Grüne T., Brzeski J., Eberharter A., Clapier C. R., Corona D. F. V., Becker P. B., Müller C. W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* **12**, 449-460.

Guttenbach M., Martínez-Expósito M. J., Engel W., Schmid M. (1996). Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. *Biol Reprod* **54**, 980-986.

H

Haberland M., Montgomery R. L., Olson E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32-42.

Hajkova P., Erhardt S., Lane N., Haaf T., El-Maarri O., Reik W., Walter J., Surani M. A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* **117**, 15-23.

Hake S. B., Garcia B. A., Duncan E. M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D. P., Allis C. D., Hunt D. F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* **281**, 559-568.

Haldar S., Saini A., Nanda J. S., Saini S., Singh J. (2011). Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem* **286**, 9308-9320.

Hampsey M., Reinberg D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**, 429–432.

Handel M. A. (2004). The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res* **296**, 57-63.

Happel N., Doenecke D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1-12.

Hardy R. R., Hayakawa K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* **19**, 595-621.

Hashimoto H., Horton J. R., Zhang X., Cheng X. (2009). UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. *Epigenetics* **4**, 8-14.

Hata K., Okano M., Lei H., Li E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-1993.

Hayakawa T., Haraguchi T., Masumoto H., Hiraoka Y. (2003). Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci* **116**, 3327-3338.

- Hayashi K., Yoshida K., Matsui Y.** (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**, 374-378.
- Hayashi M. T., Takahashi T. S., Nakagawa T., Nakayama J.-i., Masukata H.** (2009). The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat Cell Biol* **11**, 357-362.
- Heard E.** (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 482-489.
- Heard E., Disteche C. M.** (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev* **20**, 1848-1867.
- Heard E., Bickmore W.** (2007). The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 311-316.
- Hendrich B., Tweedie S.** (2003). The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* **19**, 269-277.
- Hermann A., Schmitt S., Jeltsch A.** (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* **278**, 31717-31721.
- Herzog M., Wendling O., Guillou F., Chambon P., Mark M., Losson R., Cammas F.** (2011). TIF1 β association with HP1 is essential for post-gastrulation development, but not for Sertoli cell functions during spermatogenesis. *Dev Biol* **350**, 548-558.
- Hess R. A., de Franca L. R.** (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* **636**, 1-15.
- Hiragami K., Festenstein R.** (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2711-2726.
- Hiragami-Hamada K., Shinmyozu K., Hamada D., Tatsu Y., Uegaki K., Fujiwara S., Nakayama J.** (2011). N-terminal phosphorylation of HP1 {alpha} promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol* **31**, 1186-1200.
- Holaska J. M., Wilson K. L.** (2007). An emerin "proteome": purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry* **46**, 8897-8908.
- Hong L., Schroth G. P., Matthew H. R., Yaus P., Bradbury E. M.** (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* **268**, 305-314.
- Howell C. Y., Bestor T. H., Ding F., Latham K. E., Mertineit C., Trasler J. M., Chaillet J. R.** (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* **104**, 829-838.
- Huang Y., Fang J., Bedford M. T., Zhang Y., Xu R.-M.** (2006). Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**, 748-751.
- Huyen Y., Zgheib O., Jr R. A. D., Gorgoulis V. G., Zacharatos P., Petty T. J., Sheston E. A., Mellert H. S., Stavridi E. S., Halazonetis T. D.** (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-411.

I

Iguchi N., Tanaka H., Yamada S., Nishimura H., Nishimune Y. (2004). Control of mouse *hils1* gene expression during spermatogenesis: identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol Reprod* **70**, 1239-1245.

Ishii K., Arib G., Lin C., Houwe G. V., Laemmli U. K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* **109**, 551-562.

J

Jacobs S. A., Khorasanizadeh S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**, 2080-2083.

James T. C., Elgin S. C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3862-3872.

Jean P., Hartung M., Mirre C., Stahl A. (1983). Association of centromeric heterochromatin with the nucleolus in mouse Sertoli cells. *Anat Rec* **205**, 375-380.

Jedrzejczak P., Kempisty B., Bryja A., Mostowska M., Depa-Martynow M., Pawelczyk L., Jagodzinski P. P. (2007). Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch Androl* **53**, 199-205.

Jeevan-Raj B. P., Robert I., Heyer V., Page A., Wang J. H., Cammas F., Alt F. W., Losson R., Reina-San-Martin B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **208**, 1649-1660.

Jégou B., Pineau C., Dupaix A. (1995). La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *Médecine/sciences* **11**, 519-527.

Jenuwein T., Allis C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

Jin J., Cai Y., Li B., Conaway R. C., Workman J. L., Conaway J. W., Kusch T. (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Bioch Sci* **30**.

Joffe B., Leonhardt H., Solovei I. (2010). Differentiation and large scale spatial organization of the genome. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 562-569

Joseph D. R., Hall S. H., French F. S. (1987). Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc Natl Acad Sci* **84**, 339-343.

Josso N., di Clemente N., Gouédard L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* **179**, 25-32.

Joulie M., Miotto B., Defossez P.-A. (2010). Mammalian methyl-binding proteins: what might they do? *Bioessays* **32**, 1025-1032.

Juven-Gershon T., Kadonaga J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* **339**, 225-229.

K

- Kacem S., Feil R.** (2009). Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome* **20**, 544-556.
- Kaneda M., Okano M., Hata K., Sado T., Tsujimoto N., Li E., Sasaki H.** (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**, 900-903.
- Kanellopoulou C., Muljo S. A., Kung A. L., Ganesan S., Drapkin R., Jenuwein T., Livingston D. M., Rajewsky K.** (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* **19**, 489-501.
- Karanjawala Z. E., Adachi N., Irvine R. A., Oh E. K., Shibata D., Schwarz K., Hsieh C. L., Lieber M. R.** (2002). The embryonic lethality in DNA ligase IV-deficient mice is rescued by deletion of Ku: implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. *DNA Repair (Amst)* **1**, 1017-1026.
- Karl J., Capel B.** (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* **203**, 323-333.
- Kato Y., Kaneda M., Hata K., Kumaki K., Hisano M., Kohara Y., Okano M., Li E., Nozaki M., Sasaki H.** (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* **16**, 2272-2280.
- Khalil A. M., Wahlestedt C.** (2008). Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis. *Epigenetics* **3**, 21-28.
- Khosla S., Dean W., Reik W., Feil R.** (2001). Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* **7**, 419-427.
- Kim J., Daniel J., Espejo A., Lake A., Krishna M., Xia L., Zhang Y., Bedford M. T.** (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep* **7**, 397-403.
- Kirschmann D. A., Lininger R. A., Gardner L. M. G., Seftor E. A., Odero V. A., Ainsztein A. M., Earnshaw W. C., Wallrath L. L., Hendrix M. J. C.** (2000). Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res* **60**, 3359-3363.
- Klenova E. M., Morse H. C., Ohlsson R., Lobanenkov V. V.** (2002). The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* **12**, 399-414.
- Kornberg R. D., Lorch Y.** (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Kosak S. T., Skok J. A., Medina K. L., Riblet R., Beau M. M. L., Fisher A. G., Singh H.** (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* **296**, 158-162.
- Kouzarides T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krzanowska H., Bilinska B.** (2000). Number of chromocentres in the nuclei of mouse Sertoli cells in relation to the strain and age of males from puberty to senescence. *J Reprod Fertil* **118**, 343-350.

Ktistaki E., Garefalaki A., Williams A., Andrews S. R., Bell D. M., Foster K. E., Spilianakis C. G., Flavell R. A., Kosyakova N., Trifonov V., et al. (2010). *CD8* locus nuclear dynamics during thymocyte development. *J Immunol* **184**, 5686-5695.

Kuang F. L., Luo Z., Scharff M. D. (2009). H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 5288-5293.

Kurdistani S. K., Tavazoie S., Grunstein M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* **117**, 721-733.

Kurukuti S., Tiwari V. K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenkov V., Reik W., Ohlsson R. (2006). CTCF binding at the *H19* imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *Igf2*. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 10684–10689.

Kwon S. H., Workman J. L. (2008). The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* **30**, 217-227.

L

Laget S., Joulie M., Masson F. L., Sasai N., Christians E., Pradhan S., Roberts R. J., Defossez P.-A. (2010). The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One* **5**, e11982.

Lanctôt C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* **8**, 104-115.

Latham J. A., Dent S. Y. R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1017-1024.

Lavigne M., Eskeland R., Azebi S., Saint-André V., Jang S. M., Batsché E., Fan H.-Y., Kingston R. E., Imhof A., Muchardt C. (2009). Interaction of HP1 and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HP1-mediated repression. *PLoS Genet* **5**, e1000769.

LeBien T. W., Tedder T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580.

Lécureuil C., Fontaine I., Crepieux P., Guillou F. (2002). Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* **33**, 114-118.

Lee H.-Y., Johnson K. D., Boyer M. E., Bresnick E. H. (2011). Relocalizing genetic loci into specific subnuclear neighborhoods. *J Biol Chem* **286**, 18834–18844.

Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto T., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T. (2008). Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* **80**, 518-527.

Lee J.-S., Shilatifard A. (2007). A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat Res* **618**, 130-134.

Lee J.-S., Smith E., Shilatifard A. (2010). The language of histone crosstalk. *Cell* **142**, 682-685.

- Lehnertz B., Ueda Y., Derijck A. A. H. A., Braunschweig U., Perez-Burgos L., Kubicek S., Chen T., Li E., Jenuwein T., Peters A. H. F. M.** (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**, 1192-1200.
- Leonhardt H., Page A. W., Weier H. U., Bestor T. H.** (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**, 865-873.
- LeRoy G., Weston J. T., Zee B. M., Young N. L., Plazas-Mayorca M. D., Garcia B. A.** (2009). Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2432-2442.
- Li B., Carey M., Workman J. L.** (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Li E.** (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-673.
- Li E., Bestor T. H., Jaenisch R.** (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926.
- Li G., Reinberg D.** (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 175-186.
- Li J., Hoyle G. W.** (2001). Overexpression of PDGF-A in the lung epithelium of transgenic mice produces a lethal phenotype associated with hyperplasia of mesenchymal cells. *Dev Biol* **239**, 338-349.
- Li M. W. M., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng C. Y.** (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 329-338.
- Liang G., Chan M. F., Tomigahara Y., Tsai Y. C., Gonzales F. A., Li E., Laird P. W., Jones P. A.** (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* **22**, 480-491.
- Liu L.-P., Ni J.-Q., Shi Y.-D., Oakeley E. J., Sun F.-L.** (2005). Sex-specific role of *Drosophila melanogaster* HP1 in regulating chromatin structure and gene transcription. *Nat Genet* **37**, 1361-1366.
- Lo W.-S., Trievel R. C., Rojas J. R., Duggan L., Hsu J.-Y., Allis C. D., Marmorstein R., Berger S. L.** (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**, 917-926.
- Lomberk G., Wallrath L. L., Urrutia R.** (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol* **7**, 228.
- Loyola A., Tagami H., Bonaldi T., Roche D., Quivy J.-P., Imhof A., Nakatani Y., Dent S. Y. R., Almouzni G.** (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* **10**, 769-775.
- Lu B. Y., Emtage P. C. R., Duyf B. J., Hilliker A. J., Eissenberg J. C.** (2000). Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* **155**, 699-708.
- Lu J., Gilbert D. M.** (2007). Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* **179**, 411-421.

Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.

Luijsterburg M. S., Dinant C., Lans H., Stap J., Wiernasz E., Lagerwerf S., Warmerdam D. O., Lindh M., Brink M. C., Dobrucki J. W., et al. (2009). Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol* **185**, 577-586.

M

Macdonald N., Welburn J. P. I., Noble M. E. M., Nguyen A., Yaffe M. B., Clynes D., Moggs J. G., Orphanides G., Thomson S., Edmunds J. W., et al. (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone H3 by 14-3-3. *Mol Cell* **20**, 199-211.

Mackawa M., Kamimura K., Nagano T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* **59**, 1-13.

Maher E. R., Reik W. (2000). Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* **105**, 247-252.

Maison C., Almouzni G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 296-304.

Maison C., Bailly D., Peters A. H. F. M., Quivy J.-P., Roche D., Taddei A., Lachner M., Jenuwein T., Almouzni G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* **30**, 329-334.

Maison C., Bailly D., Roche D., Oca R. M. d., Probst A. V., Vassias I., Dingli F., Lombard B., Loew D., Quivy J.-P., Almouzni G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1α to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* **43**, 220-227.

Malik H. S., Henikoff S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**, 882-891.

Malik S., Roeder R. G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* **11**, 761-772.

Marfella C. G. A., Imbalzano A. N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* **618**, 30-40.

Marques C. J., Costa P., Vaz B., Carvalho F., Fernandes S., Barros A., Sousa M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* **14**, 67-74.

Marsden M., Laemmli U. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* **17**, 849-858.

Martens J. A., Winston F. (2002). Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* **16**, 2231-2236.

Mårtensson I.-L., Almqvist N., Grimsholm O., Bernardi A. I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett* **584**, 2572-2579.

- Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Davidson I.** (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 2808-2813.
- Martin C., Zhang Y.** (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 838-849.
- Mateescu B., Bourachot B., Rachez C., Ogryzko V., ChristianMucharadt** (2008). Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch. *EMBO Rep* **9**, 267-272.
- Mazaud-Guittot S., Meugnier E., Pesenti S., Wu X., Vidal H., Gow A., Magueresse-Battistoni B. L.** (2010). Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol Reprod* **82**, 202-213.
- McBride A. E., Silver P. A.** (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**, 5-8.
- McClive P. J., Sinclair A. H.** (2003). Type II and type IX collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biol Reprod* **68**, 1742-1747.
- McLaren A.** (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* **163**, 3-9.
- Meaburn K. J., Misteli T.** (2007). Chromosome territories. *Nature* **445**, 379-381.
- Mebius R. E., Kraal G.** (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606-616.
- Meehan R. R., Kao C.-F., Pennings S.** (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* **22**, 3164-3174.
- Meissner A.** (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* **28**, 1079-1088.
- Meneghini M. D., Wu M., Madhani H. D.** (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**, 725-736.
- Merkenschlager M., Amoils S., Roldan E., Rahemtulla A., O'Connor E., Fisher A. G., Brown K. E.** (2004). Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *J Exp Med* **200**, 1437-1444.
- Mertineit C., Yoder J. A., Taketo T., Laird D. W., Trasler J. M., Bestor T. H.** (1998). Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **125**, 889-897.
- Mestecky J., Russell M. W.** (1998). Passive and active protection against disorders of the gut. *Vet Q* **20**, S83-S87.
- Misteli T.** (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* **128**, 787-800.
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.-H., Sen S., Wu C.** (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.
- Mohammad F., Pandey R. R., Nagano T., Chakalova L., Mondal T., Fraser P., Kanduri C.** (2008). *Kcnq1ot1/Lit1* noncoding RNA mediates transcriptional silencing by targeting to the perinucleolar region. *Mol Cell Biol* **28**, 3713-3728.

Morey C., Silva N. R. D., Perry P., Bickmore W. A. (2007). Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to *Hox* gene activation. *Development* **134**, 909-919.

Morrison A. J., Shen X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 373-384.

Mosammamarast N., Shi Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* **79**, 155-179.

Mruk D. D., Cheng C. Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* **25**, 747-806.

Muchardt C., Guillemé M., Seeler J.-S., Trouche D., Dejean A., Yaniv M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep* **3**, 975-981.

Müller K. P., Erdel F., Caudron-Herger M., Marth C., Fodor B. D., Richter M., Scaranaro M., Beaudouin J., Wachsmuth M., Rippe K. (2009). Multiscale analysis of dynamics and interactions of heterochromatin protein 1 by fluorescence fluctuation microscopy. *Biophys J* **97**, 2876-2885.

Mullis P. E. (2005). Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol* **152**, 11-31.

Munshi A., Shafi G., Aliya N., Jyothy A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* **36**, 75-88.

Murzina N., Verreault A., Laue E., Stillman B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* **4**, 529-540.

N

Nagano R., Tabata S., Nakanishi Y., Ohsako S., Kurohmaru M., Hayashi Y. (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* **258**, 210-220.

Nel-Themaat L., Gonzalez G., Akiyama H., Behringer R. R. (2010). Illuminating testis morphogenesis in the mouse. *J Androl* **31**, 5-10.

Nielsen A. L., Ortiz J. A., You J., Oulad-Abdelghani M., Khechumian R., Gansmuller A., Chambon P., Losson R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* **18**, 6385-6395.

Nielsen A. L., Oulad-Abdelghani M., Ortiz J. A., Remboutsika E., Chambon P., Losson R. (2001a). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* **7**, 729-739.

Nielsen S. J., Schneider R., Bauer U. M., Bannister A. J., Morrison A., O'Carroll D., Firestein R., Cleary M., Jenuwein T., Herrera R. E., Kouzarides T. (2001b). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-565.

Nishioka K., Rice J. C., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Werner J., Wang Y., Chuikov S., Valenzuela P., Tempst P., Steward R., et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* **9**, 1201-1213.

Nistal M., Jimenez F., Paniagua R. (1990). Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology. *Histopathology* **16**, 173-180.

Nistal M., Paniagua R., Abaurrea M. A., Santamaría L. (1982). Hyperplasia and the immature appearance of Sertoli cells in primary testicular disorders. *Hum Pathol* **13**, 3-12.

Nolte M. A., Hamann A., Kraal G., Mebius R. E. (2002). The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology* **106**, 299-307.

Nussey S., Whitehead S. (2001). "Endocrinology: an integrated approach". *Oxford: BIOS Scientific Publishers*.

O

O'Shaughnessy P. J., Morris I. D., Huhtaniemi I., Baker P. J., Abel M. H. (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol* **306**, 2-8.

Oakes C. C., Salle S. L., Smiraglia D. J., Robaire B., Trasler J. M. (2007a). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* **307**, 368-379.

Oakes C. C., Salle S. L., Smiraglia D. J., Robaire B., Trasler J. M. (2007b). A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci* **104**, 228-233.

Ogawa H., Ishiguro K., Gaubatz S., Livingston D. M., Nakatani Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136.

Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.

Orth J. M., Gunsalus G. L., Lamperti A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787-794.

Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300.

P

Pal S., Sif S. (2007). Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol* **213**, 306-315.

Parada L. A., McQueen P. G., Misteli T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* **5**, R44.

Perissi V., Jepsen K., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* **11**, 109-123.

Peserico A., Simone C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 371832.

Peters A. H. F. M., O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schöfer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., et al. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323-337.

Piacentini L., Fanti L., Negri R., Vescovo V. D., Fatica A., Altieri F., Pimpinelli S. (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila*. *PLoS Genet* **5**, e1000670.

Pickersgill H., Kalverda B., Wit E. d., Talhout W., Fornerod M., Steensel B. v. (2006). Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet* **38**, 1005-1014.

Plohl M., Luchetti A., Meštrović N., Mantovani B. (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* **409**, 72-82.

Pokholok D. K., Harbison C. T., Levine S., Cole M., Hannett N. M., Lee T. I., Bell G. W., Walker K., Rolfe P. A., Herbolsheimer E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**, 517-527.

Pomeroy S. L., Tamayo P., Gaasenbeek M., Sturla L. M., Angelo M., McLaughlin M. E., Kim J. Y. H., Goumnerova L. C., Black P. M., Lau C., et al. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* **415**, 436-442.

Pray-Grant M. G., Daniel J. A., Schieltz D., Yates J. R., Grant P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**, 434-438.

Pritchard C. A., Bolin L., Slattery R., Murray R., McMahon M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* **6**, 614-617.

Probst A. V., Almouzni G. (2008). Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation* **76**, 15-23.

Prokhorchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhorchouk E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* **15**, 1613-1618.

Q

Quivy J.-P., Gérard A., Cook A. J., Roche D., Almouzni G. (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 972-979.

Quivy J.-P., Roche D., Kirschner D., Tagami H., Nakatani Y., Almouzni G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J* **23**, 3516-3526.

R

Raab J. R., Kamakaka R. T. (2010). Insulators and promoters: closer than we think. *Nat Rev Genet* **11**, 439-446.

Racki L. R., Narlikar G. J. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 137-144.

Rangasamy D., Greaves I., Tremethick D. J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 650-655.

Rato L., Socorro S., Cavaco J. E. B., Oliveira P. F. (2010). Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *J Membr Biol* **236**, 215-224.

Rayasam G. V., Wendling O., Angrand P.-O., Mark M., Niederreither K., Song L., Lerouge T., L.Hager G., Chambon P., Losson R. (2003). NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO J* **22**, 3153-3163.

Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B. D., Sun Z.-W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C. P., Allis C. D., Jenuwein T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.

Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 162-169.

Reik W., Dean W., Walter J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.

Rickert R. C., Roes J., Rajewsky K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1317-1318.

Riclet R., Chendeb M., Vonesch J.-L., Koczan D., Thiesen H.-J., Losson R., Cammas F. (2009). Disruption of the interaction between transcriptional intermediary factor 1 β and heterochromatin protein 1 leads to a switch from DNA hyper- to hypomethylation and H3K9 to H3K27 trimethylation on the MEST promoter correlating with gene reactivation. *Mol Biol Cell* **20**, 296-305.

Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassalli P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* **16**, 2262-2270.

Roeder R. G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* **579**, 909-915.

Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868.

Roth S. Y., Allis C. D. (1992). Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci* **17**, 93-98.

Roth S. Y., Denu J. M., Allis C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120.

Rothenberg E. V., Taghon T. (2005). Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 601-649.

Russell L. D., Ettlin R. A., Hikim A. P. S., Clegg E. D. (1990). "Histological and histopathological evaluation of the testis". *Cache River Press*.

Russell L. D., Griswold M. D. (1993). "The Sertoli cell". *Cache River Press*.

S

Saint-André V., Batsché E., Rachez C., Muchardt C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 337-344.

Santenard A., Ziegler-Birling C., Koch M., Tora L., Bannister A. J., Torres-Padilla M.-E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* **12**, 853-862.

Santos A. P., Abranches R., Stoger E., Beven A., Viegas W., Shaw P. J. (2002). The architecture of interphase chromosomes and gene positioning are altered by changes in DNA methylation and histone acetylation. *J Cell Sci* **115**, 4597-4605.

Sasai N., Defossez P. A. (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol* **53**, 323-334.

Savitsky M., Kravchuk O., Melnikova L., Georgiev P. (2002). Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **22**, 3204-3218.

Schmiedeberg L., Weissart K., Diekmann S., Hoerste G. M. z., Hemmerich P. (2004). High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* **15**, 2819-2833.

Schoor M., Schuster-Gossler K., Roopenian D., Gossler A. (1999). Skeletal dysplasias, growth retardation, reduced postnatal survival, and impaired fertility in mice lacking the SNF2/SWI2 family member ETL1. *Mech Dev* **85**, 73-83.

Schott S., Coustham V., Simonet T., Bedet C., Palladino F. (2006). Unique and redundant functions of *C. elegans* HP1 proteins in post-embryonic development. *Dev Biol* **298**, 176-187.

Schott S., Ramos F., Coustham V., Palladino F. (2009). HPL-2/HP1 prevents inappropriate vulval induction in *Caenorhabditis elegans* by acting in both HYP7 and vulval precursor cells. *Genetics* **181**, 797-801.

Schotta G., Ebert A., Krauss V., Fischer A., Hoffmann J., Rea S., Jenuwein T., Dorn R., Reuter G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* **21**, 1121-1131.

Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D., Jenuwein T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**, 1251-1262.

Schübeler D., MacAlpine D. M., Scalzo D., Wirbelauer C., Kooperberg C., Leeuwen F. v., Gottschling D. E., O'Neill L. P., Turner B. M., Delrow J., et al. (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* **18**, 1263-1271.

- Schultz D. C., Ayyanathan K., Negorev D., Maul G. G., III F. J. R.** (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **16**, 919-932.
- Schwaiger M., Kohler H., Oakeley E. J., Stadler M. B., Schübeler D.** (2010). Heterochromatin protein 1 (HP1) modulates replication timing of the Drosophila genome. *Genome Res* **20**, 771-780.
- Seet B. T., Dikic I., Zhou M.-M., Pawson T.** (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 473-483.
- Segal E., Widom J.** (2009). What controls nucleosome positions? *Trends Genet* **25**, 335-343.
- Shaklai S., Amariglio N., Rechavi G., Simon A. J.** (2007). Gene silencing at the nuclear periphery. *FEBS J* **274**, 1383-1392.
- Shapiro E., Huang H., Ruoff R., Lee P., Tanese N., Logan S. K.** (2008). The heterochromatin protein 1 family is regulated in prostate development and cancer. *J Urol* **179**, 2435-2439.
- Sharpe R. M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J. S.** (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-784.
- Sikorski T. W., Buratowski S.** (2009). The Basal Initiation Machinery: Beyond the General Transcription Factors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 344-351.
- Sims J. K., Houston S. I., Magazinnik T., Rice J. C.** (2006). A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* **281**, 12760-12766.
- Singh J., O'Neill C., Handelsman D. J.** (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* **136**, 5311-5321.
- Singh P. B., Georgatos S. D.** (2002). HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* **140**, 10-16.
- Skinner M. K., Griswold M. D.** (1980). Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J Biol Chem* **255**, 9523-9525.
- Smith B. C., Denu J. M.** (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 45-57.
- Soler C., Yeung C. H., Cooper T. G.** (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl* **17**, 271-278.
- Sonnack V., Failing K., Bergmann M., Steger K.** (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34**, 384-390.
- Spector D. L.** (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* **72**, 573-608.
- Splinter E., Heath H., Kooren J., Palstra R.-J., Klous P., Grosveld F., Galjart N., Laat W. d.** (2006). CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* **20**, 2349-2354.

Sproul D., Gilbert N., Bickmore W. A. (2005). The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat Rev Genet* **6**, 775-781.

Sripathy S. P., Stevens J., Schultz D. C. (2006). The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **26**, 8623-8638.

Steger K., Rey R., Louis F., Kliesch S., Behre H. M., Nieschlag E., Hoepffner W., Bailey D., Marks A., Bergmann M. (1999). Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* **14**, 136-143.

Stokes D. G., Tartof K. D., Perry R. P. (1996). CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of Drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 7137-7142.

Stosiek P., Kasper M., Karsten U. (1990). Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation* **43**, 66-70.

Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H., Tajima S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* **279**, 27816-27823.

Sun T., Xin Z., Jin Z., Wu Y., Gong Y. (2008). Effect of TGF-beta/Smad signaling on sertoli cell and possible mechanism related to complete sertoli cell-only syndrome. *Mol Cell Biochem* **319**, 1-7.

Surani M. A., Hayashi K., Hajkova P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* **128**, 747-762.

Surjit M., Ganti K. P., Mukherji A., Ye T., Hua G., Metzger D., Li M., Chambon P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* **145**, 224-241.

Szerlong H. J., Hansen J. C. (2011). Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochem Cell Biol* **89**, 24-34.

T

Talbert P. B., Henikoff S. (2010). Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 264-275.

Tamaru H. (2010). Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev* **24**, 1465-1478.

Tanaka H., Baba T. (2005). Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **62**, 344-354.

Tang L., Nogales E., Ciferri C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol* **102**, 122-128.

Taverna S. D., Ilin S., Rogers R. S., Tanny J. C., Lavender H., Li H., Baker L., Boyle J., Blair L. P., Chait B. T., et al. (2006). Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell* **24**, 785-796.

- Taverna S. D., Li H., Ruthenburg A. J., Allis C. D., Patel D. J.** (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1025-1040.
- Teperino R., Schoonjans K., Auwerx J.** (2010). Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab* **12**, 321-327.
- Thiru A., Nietlispach D., Mott H. R., Okuwaki M., Lyon D., Nielsen P. R., Hirshberg M., Verreault A., Murzina N. V., Laue E. D.** (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J* **23**, 489-499.
- Thomas G., Lange H. W., Hempel K.** (1972). Relative stability of lysine-bound methyl groups in arginine-rich histones and their subfractions in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* **353**, 1423-1428.
- Thomsen R., Christensen D. B., Rosborg S., Linnet T. E., Blechingberg J., Nielsen A. L.** (2011). Analysis of HP1 α regulation in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* DOI 10.1002/mc.20755.
- Togni M., Swanson K. D., Reimann S., Kliche S., Pearce A. C., Simeoni L., Reinhold D., Wienands J., Neel B. G., Schraven B., Gerber A.** (2005). Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. *Mol Cell Biol* **25**, 8052-8063.
- Toyama Y., Maekawa M., Yuasa S.** (2003). Ectoplasmic specializations in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. *Anat Sci Int* **78**, 1-16.
- Trasler J. M.** (2009). Epigenetics in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **306**, 33-36.
- Trojer P., Reinberg D.** (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**, 1-13.
- Tsuchiya Y.** (2008). Till disassembly do us part: a happy marriage of nuclear envelope and chromatin. *J Biochem* **143**, 155-161.
- Tsukiyama T.** (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 422-429.
- Tsuruta J. K., O'Brien D. A., Griswold M. D.** (1993). Sertoli cell and germ cell cystatin C: stage-dependent expression of two distinct messenger ribonucleic acid transcripts in rat testes. *Biol Reprod* **49**, 1045-1054.
- Turek-Plewa J., Jagodzinski P. P.** (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**, 631-647.
- Turner B. M.** (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 110-112.
- Turner J. M.** (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**, 1823-1831.
- Turner M., Mee P. J., Costello P. S., Williams O., Price A. A., Duddy L. P., Furlong M. T., Geahlen R. L., Tybulewicz V. L.** (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298-302.
- Turusov V. S., Nikonova T. V., Parfenov Y. D.** (1990). Increased multiplicity of lung adenomas in five generations of mice treated with benz(a)pyrene when pregnant. *Cancer Lett* **55**, 227-231.

U

Uhlířová R., Horáková A. H., Galiová G., Legartová S., Matula P., Fojtová M., Varecha M., Amrichová J., Vondráček J., Kozubek S., Bártová E. (2010). SUV39h- and A-type lamin-dependent telomere nuclear rearrangement. *J Cell Biochem* **109**, 915-926.

Upadhyay A. K., Cheng X. (2011). Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers. *Prog Drug Res* **67**, 107-124.

V

Vakoc C. R., Mandat S. A., Olenchock B. A., Blobel G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**, 381-391.

Van de Perre P. (2003). Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* **21**, 3374-3376.

van der Heijden G. W., Derijck A. A. H. A., Pósfai E., Giele M., Pelczar P., Ramos L., Wansink D. G., Vlag J. v. d., Peters A. H. F. M., Boer P. d. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* **39**, 251-258.

Velasco G., Hubé F., Rollin J., Neuillet D., Philippe C., Bouzinba-Segard H., Galvani A., Viegas-Péquignot E., Francastel C. (2010). Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 9281-9286.

Vergouwen R. P. F. A., Huiskamp R., Bas R. J., Roepers-Gajadien H. L., Davids J. A. G., Rooij D. G. d. (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil* **99**, 479-485.

Vergouwen R. P. F. A., Jacobs S. G. P. M., Huiskamp R., Davids J. A. G., Rooij D. G. d. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* **93**, 233-243.

Vermaak D., Henikoff S., Malik H. S. (2005). Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* **1**, 96-108.

Vermaak D., Malik H. S. (2009). Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **43**, 467-492.

Vicdan A., Vicdan K., Günalp S., Kence A., Akarsu C., Isik A. Z., Sözen E. (2004). Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **117**, 49-54.

Vicente R., Swainson L., Marty-Grès S., Barros S. C. D., Kinet S., Zimmermann V. S., Taylor N. (2010). Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* **22**, 270-275.

Villasante A., Méndez-Lago M., Abad J. P., Garcíni E. M. d. (2007). The birth of the centromere. *Cell Cycle* **6**, 2872-2876.

Vissel B., Choo K. H. (1989). Mouse major (γ) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* **5**, 407-414.

Vlcek S., Dechat T., Foisner R. (2001). Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1758-1765.

Völkel P., Angrand P.-O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1-20.

von Andrian U. H., Mackay C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* **343**, 1020-1034.

W

Wade P. A., Geggion A., Jones P. L., Ballestar E., Aubry F., Wolffe A. P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**, 62-66.

Wade P. A., Pruss D., Wolffe A. P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* **22**, 128-132.

Wakimoto B. T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* **93**, 321-324.

Walker W. H. (2009). Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* **74**, 602-607.

Walker W. H., Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* **130**, 15-28.

Wallrath L. L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 147-153.

Wang R.-A., Nakane P. K., Koji T. (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* **58**, 1250-1256.

Ward S. G. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* **27**, 80-87.

Watt F., Molloy P. L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**, 1136-1143.

Weake V. M., Workman J. L. (2010). Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet* **11**, 426-437.

Weber J. E., Russell L. D., Wong V., Peterson R. N. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am J Anat* **167**, 163-179.

Weber P., Cammas F., Gerard C., Metzger D., Chambon P., Losson R., Mark M. (2002). Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1b is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* **129**, 2329-2337.

Witt O., Albig W., Doenecke D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* **229**, 301-306.

Witt O., Deubzer H. E., Milde T., Oehme I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* **277**, 8-21.

Wolffe A. P., Pruss D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**, 817-819.

Wong C.-H., Cheng C. Y. (2005). The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* **71**, 263-296.

Woodcock C. L., Dimitrov S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 130-135.

Woodcock C. L., Ghosh R. P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000596.

Wu S., Shi Y., Mulligan P., Gay F., Landry J., Liu H., Lu J., Qi H. H., Wang W., Nickoloff J. A., et al. (2007). A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1165-1172.

Wu Z., Templeman J. L., Smith R. A., Mackay S. (2005). Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on isolated developing mouse Sertoli cells *in vitro*. *J Anat* **206**, 175-184.

X

Xiong W., Chen Y., Wang H., Wang H., Wu H., Lu Q., Han D. (2008). Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction* **135**, 77-87.

Xiong W., Wang H., Wu H., Chen Y., Han D. (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* **137**, 469-479.

Xu F., Mao C., Ding Y., Rui C., Wu L., Shi A., Zhang H., Zhang L., Xu Z. (2010). Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem* **17**, 4052-4071.

Xue Y., Wong J., Moreno G. T., Young M. K., Côté J., Wang W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* **2**, 851-861.

Y

Yamagishi Y., Sakuno T., Shimura M., Watanabe Y. (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* **455**, 251-255.

Yan W., Ma L., Burns K. H., Matzuk M. M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 10546-10551.

Yao P.-L., Lin Y.-C., Richburg J. H. (2010). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod* **82**, 516-527.

Yap K. L., Zhou M.-M. (2010). Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 488-505.

Yap K. L., Zhou M.-M. (2011). Structure and mechanisms of lysine methylation recognition by the chromodomain in gene transcription. *Biochemistry* **50**, 1966-1980.

Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites *Trends Genet* **13**, 335-340.

Yoon Y. S., Jeong S., Rong Q., Park K.-Y., Chung J. H., Pfeifer K. (2007). Analysis of the *H19ICR* insulator. *Mol Cell Biol* **27**, 3499-3510.

Young N. L., DiMaggio P. A., Garcia B. A. (2010). The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3983-4000.

Yu S., Crawford D., Tsuchihashi T., Behrens T. W., Srivastava D. (2011). The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn* **240**, 384-393.

Z

Zalensky A. O., Siino J. S., Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Tomilin N. V., Yau P., Bradbury E. M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* **277**, 43474-43480.

Zambrano E., Martínez-Samayoa P. M., Bautista C. J., Deás M., Guillén L., Rodríguez-González G. L., Guzmán C., Larrea F., Nathanielsz P. W. (2005). Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* **566**, 225-236.

Zamudio N. M., Chong S., O'Bryan M. K. (2008). Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction* **136**, 131-146.

Zarebski M., Wiernasz E., Dobrucki J. W. (2009). Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry A* **75**, 619-625.

Zemach A., Zilberman D. (2010). Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr Biol* **20**, R780-785.

Zeng L., Zhou M.-M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**, 124-128.

Zhang D., Wang D., Sun F. (2011). *Drosophila melanogaster* heterochromatin protein HP1b plays important roles in transcriptional activation and development. *Chromosoma* **120**, 97-108.

Zhang L.-F., Huynh K. D., Lee J. T. (2007). Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell* **129**, 693-706.

Zhang X., Tamaru H., Khan S. I., Horton J. R., Keefe L. J., Selker E. U., Xiaodong C. (2002). Structure of the Neurospora SET Domain Protein DIM-5, a Histone H3 Lysine Methyltransferase. *Cell* **111**, 117-127.

Zhang Y., Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360.

Zippo A., Serafini R., Rocchigiani M., Pennacchini S., Krepelova A., Oliviero S. (2009). Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* **138**, 1122-1136.

Zlatanova J., Bishop T. C., Victor J.-M., Jackson V., Holde K. v. (2009). The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* **17**, 160-171.