HAL
open science

Implication de RAD50 dans l'infertilité

Chloé Depuydt

To cite this version:

Chloé Depuydt. Implication de RAD50 dans l'infertilité. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03436680

HAL Id: dumas-03436680

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03436680

Submitted on 19 Nov 2021

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

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

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2022 Thèse n°6

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par DEPUYDT Chloé

Née le 22 septembre 1994 à Lyon 3ème

Le 22 octobre 2021

IMPLICATION DE RAD50 DANS L'INFERTILITE

Sous la direction de : Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX

Membres du jury :

Mr SEVENET Nicolas	Président
Mme CHANSEL-DEBORDEAUX Lucie	Examinateur
Mme BEDEL Aurélie	Examinateur
Mr JIMENEZ Clément	Examinateur
Mme PAPAXANTHOS Aline	Examinateur

Remerciements

Aux membres du jury,

A ma directrice de thèse, le Docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX,
Je te remercie pour ta grande disponibilité et ton aide précieuse au cours de ce travail de thèse. Merci également pour ton soutien, qui m'a réellement portée lors de mon oral à Paris.
Je te serai toujours reconnaissante de m'avoir donné goût à la biologie de la reproduction – une évidence aujourd'hui, ainsi qu'à la recherche. Merci d'avoir été à l'initiative de ce sujet passionnant qui sera également, je l'espère, à l'origine de mes travaux de thèse d'Université.

A mon président du jury, le Professeur Nicolas SEVENET,
Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie. Je n'ai pas encore eu la chance de vous rencontrer au cours de mon internat mais votre expertise sur l'oncogénétique me sera infiniment précieuse pour l'appréciation de ce travail. Je vous prie de croire en l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Aurélie BEDEL,
Je tiens à te remercier pour ton encadrement d'une grande pédagogie. Grâce à toi, mon stage d'année recherche a été extrêmement enrichissant et je te remercie de m'avoir tant appris. Nos nombreux échanges m'ont énormément stimulée. J'espère pouvoir continuer à travailler avec toi le plus longtemps possible. Merci d'être quelqu'un de si inspirant.

Au Professeur Clément JIMENEZ,
Je vous remercie pour votre bienveillance et vos enseignements au cours de mes stages au laboratoire de biologie de la reproduction. Je garde précieusement en tête nos intenses – mais toujours instructifs – débats autour de divers sujets. Veuillez croire à l'expression de mon plus grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Aline PAPAXANTHOS,
Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour l'excellente qualité de la formation dont j'ai bénéficié dans le service de biologie de la reproduction de Bordeaux. Je ressors grandie des rigoureuses et passionnantes consultations auxquelles j'ai eu la chance d'assister à vos côtés. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Soyez assurée de ma profonde estime.

A toute l'équipe de l'unité 1035,

Je tiens à vous remercier pour votre accueil si chaleureux.
Je remercie le Professeur François Moreau-Gaudry pour son encadrement bienveillant et inspirant au cours de mon stage de master 2 : veuillez croire en ma sincère reconnaissance.
Merci à Isabelle Lamrissi-Garcia, pour ton expertise et ta patience face à tous nos échecs de mot de passe !
Merci également à Alice Bibeyran, Corinne Bourdié, Isabelle Moranvillier, Samuel et Julian pour votre aide précieuse au cours des expérimentations – et pour votre constante bonne humeur.
Merci aux étudiants qui ont partagé mon bureau, à Jade, à Laura et à Juliette, je garde de très bons souvenirs de cette année avec vous. Notre soutien mutuel nous a tirées vers le haut et notamment quand les PCR ne marchaient plus !
Et enfin, merci à Florence pour ta gentillesse lors de mes débuts, c'est toi qui m'a appris toutes les bases techniques nécessaires pour ce travail.

Au service de Biologie de la reproduction du CHU de Bordeaux,

Je mesure ma chance d'avoir rejoint ce service. Au milieu de toutes ces personnes hautes en couleurs, j'ai pu évoluer en toute confiance et me rapprocher chaque jour un peu plus de la future professionnelle que je souhaite devenir. J'ai hâte de vous retrouver en mai prochain et j'espère que nous aurons encore une longue route à faire ensemble.

Un grand merci aux techniciens du laboratoire, qui ont su me former avec intelligence au cours de mon internat. Ils m'ont inculqué la rigueur indispensable à ce travail.
Merci notamment à Carole, pour ta patience à mes débuts dans ce milieu : grâce à toi, je garde un souvenir ému de la spermiologie. Tu es restée encourageante et chaleureuse au cours de mes stages. Je n'oublierai jamais tes mots bienveillants avant mon départ pour mon année recherche.
Merci également à Jean-François, Sylvie, Marie-Caroline, Hervé et Maïté : j'ai découvert avec vous tout le plaisir de la technique de la biologie de la reproduction. Merci pour votre patience et votre enseignement d'une qualité sans faille.

Merci au Docteur Volcy SOULA, pour tout ce que j'ai appris au CECOS.
Merci à Edouard et Juliette, mes chers assistants éclairés et toujours enthousiastes.
Merci aux secrétaires, Marie-Caroline et Pascale, pour votre bonne humeur et votre aide si précieuse.

Merci également à mes co-internes pour notre travail en équipe.
Merci à Julie, pour tous nos moments d'entraide.

Merci enfin à mes amies gynécologues, avec qui j'ai passé deux semestres inoubliables – au laboratoire comme au baby-foot ! Emmanuelle, je retiens tous nos moments de complicité et de partage ; merci de m'avoir fait profiter de ton expérience alors que j'étais encore nouvelle dans le milieu. Elisabeth, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse. Tu es quelqu'un de profondément généreux et je me souviendrai toujours de ce semestre « covidé » … particulièrement délicat mais rythmé par d'innombrables rires.
J'ai hâte de vous retrouver toutes les deux en mai prochain !

A mes amis,

A mes meilleures amies,
A Malika et Christelle, mes amies, mes grandes sœurs depuis maintenant 15 ans. Merci de m'avoir fait vivre les meilleurs moments de ma vie. Je n'aurais voulu avoir autant de poisse avec personne d'autre ! Avec vous, c'est juste une évidence. Merci pour votre soutien sans faille. Je vous aime de tout mon coeur, mais ça, vous le savez déjà.
A mon petit Raphou, tata Coé a presque fini ses études !

A mes amis d'enfance,
A Pénélope, merci d'être quelqu'un d'aussi pur et rayonnant ! Je me souviens encore de tous nos jeux d'enfance.
A Laura, on a grandi ensemble et tu es aujourd'hui maman. Je suis tellement fière de toi !
A Clémence, toujours là pour me pousser à me challenger et à tout remettre en perspective. Merci de m'avoir reboostée dans les moments difficiles. Je n'oublierai pas nos folles aventures.
A Alex, on se comprend tellement bien. Ton soutien, nos discussions et ton humour m'ont été si précieux durant toutes ces années.
A Lisa, à l'Angleterre et aux arbres ! Merci de toujours autant me faire rire, 15 ans après !
A Sixtine, à Juliette, à Justina et à Maud, merci pour tous ces bons moments.

A mes amies d'aventure,
Merci mon Héloïse, pour tous nos fous rires et nos conversations sans fin. Je me souviendrai toujours de nos voyages extraordinaires et notamment de nos arguments pour se faire emmener lors de notre course de stop. Merci de ne pas avoir froid.
A Aude, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Mon épaule pour l'année de préparation de l'internat que l'on a affrontée ensemble. Merci pour nos moments de révisions dans des endroits toujours plus farfelus et pour nos aventures aux quatre coins du monde.

A mes amis de Bordeaux,
A Elisa, avec qui mon aventure sur Bordeaux a commencé. Merci d'être tout simplement toi, quelqu'un de tellement vrai.
A Chloé, mon pico humain avec un cœur immense ! Merci d'avoir autant été un pilier dans ma vie. Ta folie et ton humour, ta présence et ta bienveillance m'ont émerveillée au quotidien. Merci de ton soutien sans faille. Et n'oublie pas que c'est à base de Do Brasil.
A Emma, pour tous nos moments passés dans le patio avec nos jeux de mots insupportables. Merci d'être le petit soleil que tu es.
A Mickaël et Jordan, et non pas Michael Jordan, mes anciens colocs avec qui j'ai tellement partagé. Merci pour tous ces super souvenirs et notamment quand on a gâté le coin. Jordan, nos duos de guitare endiablés avec la chicarade me manquent énormément.
A Clémence et à Pierre, de très belles rencontres ! A vos anecdotes qui me font tellement rire.
A Alex, tu es vraiment une belle personne.

A mes amis du volley,
A Maxime, merci pour tous ces moments de complicité au volley et pendant le confinement, même si tu m'as bien cassée les oreilles avec ta guitare. Merci de m'avoir troqué des moutons contre du foin, j'ai gagné au Catan grâce à toi, je sais que tu en gardes un bon souvenir.
A Diane, Lucie et Annaëlle qui seront ravies d'être dans cette catégorie d'amis, puisqu'on se présente comme ça désormais. Je ne vous connais que depuis peu et pourtant, je vous vois déjà comme de grandes amies. A nos expériences sur les fourmis ! Merci pour toutes nos aventures en Grèce et celles à venir. Vive Jane, Loïc et Chanel. Bonsoir.

Merci à toutes les personnes qui ont croisé ma route et qui ont participé à façonner la personne que je suis.

A ma famille,

C'est avec beaucoup d'émotion que je termine par vous, mes parents et ma sœur. Les piliers de ma vie sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien inestimable durant toute ma vie.

Merci Papa de ne pas avoir douté de moi en CP, quand la maîtresse disait à Maman que j'allais être en échec scolaire puisque j'étais très dissipée. Merci de m'avoir ouvert sur le monde de la biologie médicale, lorsque tu t'es décarcassé pour me trouver un stage en troisième. Merci de m'avoir accompagnée à toutes les grandes étapes de ma vie, qui m'ont toujours réussi grâce à ton soutien et tes jeux de mots qui me détendent. Tu étais là au concours de PACES et même à Rungis pour le concours de l'internat, alors que tout se jouait pour moi. Et merci de m'avoir transmis cet humour que j'affectionne tant, déjà lorsque tu écrivais des jeux de mots sur mes fiches de PACES et cet amour pour les schémas, sans lesquels on serait tous perdu.
Merci ma petite Maman, pour tout le temps que tu as pris pour moi, pour m'aider à réviser et à faire des fiches, pour me faire réciter. Merci pour tous les endroits où tu m'as emmenée pour réviser, hiver comme été pour que je puisse retrouver de la motivation dans mon travail. Merci pour tous nos fous rires et ta mauvaise foi sur le gagnant du ni yes ni no. Merci d'être cette femme inspirante et bienveillante.
Merci à tous les deux d'avoir toujours cru en moi, même quand je perdais confiance. Vous êtes mes héros.

A ton tour, ma Jul, ma grande sœur, essentielle à ma vie et à mon équilibre, pour la fierté que tu as toujours montrée à mon égard. Merci pour ta présence au quotidien, ton soutien et ta bienveillance. Même si cette dernière a quelques failles, comme quand tu m'as appris à jouer aux raquettes sur la plage ! Merci pour toutes ces belles attentions qui arrivent toujours au bon moment pour me redonner du courage. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout l'amour que tu me portes et pour tout ce que tu m'apprends, tu sais éveiller ma curiosité et m'ouvrir sur plein de sujets. Je t'aime du plus profond de mon cœur.

Avant-propos

L'objectif de cette thèse consiste en l'étude du rôle de *RAD50* dans l'infertilité. Il s'agit d'un gène impliqué dans la prise en charge des cassures double brin, en conditions mitotiques et méiotiques.
Une revue de la littérature sur les infertilités d'origine génétique, un rappel sur la gamétogenèse et la méiose permettront de bien situer le rôle de RAD50 au sein du complexe MRN.
Mon travail porte sur l'étude de la fertilité de souris mâles mutées pour *Rad50* et sur des expériences de modulations de l'expression de *RAD50* dans des cellules humaines *in vitro* pour évaluer sa capacité à prendre en charge des cassures doubles brins.

Table des matières

Remerciements 2

Avant propos 5

Table des matières 6

Liste des figures 9

Liste des abréviations 12

I. Introduction 13
- **L'infertilité** 13
  - **Généralités** 13
  - **Les infertilités génétiques** 13
    - **Infertilités génétiques masculines** 13
      - **Les causes centrales** 14
      - **Les causes périphériques** 15
        - **Non obstructives** 15
        - **Obstructives** 16
      - **Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes** 16
    - **Infertilités génétiques féminines** 18
      - **Les causes centrales** 18
      - **Les causes périphériques** 19
- **La gamétogenèse** 20
  - **Généralités** 20
  - **Chez la femme** 21
  - **Chez l'homme** 23
- **La méiose** 25
  - **Définitions** 25
  - **Anomalies génétiques de la méiose et infertilité** 28
- **Défaut de réparation d'une cassure double brin – Cancers et infertilité** 29
  - **Généralités** 29
  - **Le gène *FANCM*** 29
  - **Les gènes *BRCA*** 30
  - **Autres gènes** 31
- **Complexe MRN - RAD50** 32
  - **Le complexe MRN** 32
    - **Structure et fonction** 32
    - **Implication dans le cancer** 34
    - **Implication dans la fertilité et modèles animaux** 34
  - **Focus sur RAD50** 35
    - **Structure et fonction** 35
    - **Implication dans le cancer** 36
    - **Implication dans la fertilité** 36
      - **Modèles animaux** 36
      - **Chez l'Homme** 37
    - **Patients avec mutations bialléliques de *RAD50*** 37

II. Matériels et méthodes 40
Etude *in vivo* du rôle de Rad50 dans l'infertilité murine 40
Les modèles murins 40
Mise en reproduction 40
Dissection de l'épididyme et étude histologique 40
Etude *in vitro* de l'impact de la modulation de *RAD50* dans des cellules humaines 41
Culture cellulaire de fibroblastes humains (hFF) 41
Modulation de l'expression de *RAD50* 41
Surexpression de *RAD50* 41
Diminution de l'expression de *RAD50* 43
Par approche lentivirale par shRNA 43
Par CRISPR-Cas9 au locus *RAD50* 44
Induction d'un *knock-out* 44
Induction d'un *knock-in* 46
Mesure de l'impact de la modulation de *RAD50* 46
Mesure de la prolifération cellulaire 46
Etude de la mort cellulaire 46
Etude du cycle cellulaire 47
Induction d'une CDB par CRISPR-Cas9 47

III. Résultats 48
Etude de la fertilité dans un modèle murin *Rad50* muté 48
Mise en reproduction 48
Analyse macroscopique des testicules 48
Analyse microscopique de dissection de l'épididyme et de l'histologie épididymaire et des tubes séminifères 49
Etude de l'impact de la modulation de l'expression de *RAD50* dans des cellules humaines *in vitro* 53
Validation des méthodes de modulation de l'expression de *RAD50* 53
shRNA dirigé contre *RAD50* 53
KO et KI de *RAD50* par CRISPR-Cas9 53
Surexpression de *RAD50* 55
Impact fonctionnel de la modulation de l'expression de *RAD50* 56
Prolifération cellulaire 56
Lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$ 56
Cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* 57
Cycle cellulaire 58
Mort cellulaire 59
Lignée RAD50$^{KO/del}$ 59
Cellules avec shRNA anti-*RAD50* 61
Impact du niveau d'expression de *RAD50* sur la prise en charge des cassures double brin 63
Contrôle d'efficacité des CDB 63
Prolifération cellulaire 64
Lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$ 64
Cellules avec shRNA anti-*RAD50* 65
Cycle cellulaire 66
Mort cellulaire 67
Lignée RAD50$^{KO/del}$ 67
Cellules avec shRNA anti-*RAD50* 69

IV. Conclusion et discussion **72**

Références bibliographiques **78**

Annexes 81

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les différents troubles quantitatifs du sperme et la fréquence des anomalies génétiques associées d'après Krausz *et al.* (4). **14**

Figure 2 : Schéma du chromosome Y et des trois zones *AZFa,b et c* pouvant comporter une délétion et entraîner une azoospermie (4). **16**

Figure 3 : Photos prises au microscope électronique à balayage au grossissement x9000 représentant un spermatozoïde normal (A) et un spermatozoïde macrocéphale d'un patient présentant une mutation dans le gène AURKC (B) (13). **16**

Figure 4 : photos issues d'un spermocytogramme d'un patient présentant une globozoospermie avec un spermatozoïde normal (flèche noire) et un spermatozoïde dépourvu d'acrosome (flèche rose) (14). **17**

Figure 5 : schéma résumant les causes d'infertilités génétiques masculines. **17**

Figure 6 : tableau représentant les différentes catégories OMS des troubles de l'ovulation (1,16). **18**

Figure 7 : Gènes situés sur le chromosome X (A) et gènes autosomiques (B) associés à une IOP (20). **19**

Figure 8 : schéma comparant les différentes étapes de formation, de migration et de différenciation des CGP, chez l'homme et chez la souris, d'après Li *et al.* (25). **20**

Figure 9 : Schéma représentant les différentes étapes de la différenciation ovocytaire, passant des CGP à l'ovocyte I et de la maturation ovocytaire au sein du follicule primordial jusqu'au follicule ovulatoire, d'après Larose *et al.* (24). **21**

Figure 10 : Schéma représentant le développement des ovaires chez la souris avec la formation de deux classes de follicules : les primordiaux et les primaires, adapté de Smith *et al.*(26). **21**

Figure 11 : Schéma représentant les trois phases de la spermatogenèse chez l'homme d'après le cours "La physiologie testiculaire" du Pr Rouiller-Fabre au master 2 "Reprodev". **23**

Figure 12 : Schéma représentant les différentes étapes de la méiose d'après le cours "Meiotic recombination : Breaking the genome to survive" de Madame Valérie Borde au master 2 "Reprodev". **25**

Figure 13 : Schéma représentant les étapes de la prophase I adapté de Baudat *et al.* (29). **26**

Figure 14 : Schéma représentant les étapes de la prophase de méiose I et les différents acteurs impliqués ; le panel de droite représente (A) des ovogonies, (B) le stade leptotène, (C) le stade zygotène, (D) le stade pachytène et (E) le stade diplotène, adapté de Huhtaniemi *et al.* (23). **27**

Figure 15 : schéma représentant les étapes de métaphase et d'anaphase II permettant de séparer les deux chromatides sœurs (30). **27**

Figure 16 : schéma représentant le complexe MRN, composé d'un dimère de RAD50, MRE11 et NBS1 et sa fixation à l'ADN, adapté de Lavin *et al.* (40). **32**

Figure 17 : Schéma représentant les différentes étapes induites par la formation d'une CDB d'après Williams *et al.* (42). **33**

Figure 18 : schéma représentant le complexe MRN et la disposition de ses sous-unités MRE11, NBS1 et RAD50, sa dimérisation et sa fixation à l'ADN, adapté de Lavin *et al.* (40). **35**

Figure 19 : A : photo des testicules d'une souris WT (à gauche) et d'une souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite), B : photos prises au microscope électronique d'une coloration à l'hématoxyline-éosine de tubes séminifères d'une souris WT (à gauche) et d'une souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite) et C :

nombre de follicules par section de coupe histologique entre des souris WT (à gauche) et des souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite) (50). **36**

Figure 20 : schéma représentant les domaines de *RAD50* et les deux mutations du patient P1 (48). **38**

Figure 21 : Tableau présentant une revue de la littérature sur les différentes façons de moduler l'expression de *RAD50* et leur impact fonctionnel. **39**

Figure 22 : Carte simplifiée du vecteur de surexpression de *RAD50*. **42**

Figure 23 : Carte simplifiée du vecteur d'expression du shRNA dirigé contre *RAD50*. **43**

Figure 24 : Schéma d'après Jiang *et al*. (54) présentant le mécanisme d'action de CRISPR-Cas9. **45**

Figure 25 : photos et tailles des testicules de souris de génotype WT/WT, KO/WT, KI/WT et KI/KI et KI/KO prélevées à deux âges différents (souris 1 pour les premiers sacrifices et souris 2 pour les deuxièmes). **49**

Figure 26 : photo de dissection de l'épididyme d'une souris WT/WT présentant de nombreux spermatozoïdes (à gauche) et d'une souris KI/WT pour *Rad50* ne contenant pas de spermatozoïdes (à droite). **49**

Figure 27 : photos d'observations au microscope aux grossissements x5, x10, x20 (A) et x40 (B) des testicules et épididymes de souris de génotypes WT/WT, KO/WT, KI/WT, KI/KI et KI/KO sacrifiées à environ 2 mois et demi. **51**

Figure 28 : Tableau et schéma récapitulatifs des paramètres étudiés chez les souris de différents génotypes concernant la viabilité et la fertilité. **52**

Figure 29 : Résultat de l'analyse ICE des séquences de l'exon 20 de *RAD50* des cellules transfectées comparées au contrôle. **53**

Figure 30: Répartition du nombre de clones au sein des différents génotypes pour *RAD50*. **54**

Figure 31 : Analyse ICE des séquences du clone RAD50$^{KO/WT}$. **54**

Figure 32 : Analyse ICE des séquences du clone RAD50$^{KO/del}$. **55**

Figure 33 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de cinq expérimentations indépendantes, par lecture en cellule de Malassez. Ces résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$. **56**

Figure 34 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de six expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez. Ces résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées transduites par le sh scramble, et par le shRNA anti-*RAD50*. **57**

Figure 35 : A : Représentation de la répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, obtenue à partir des résultats de cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium des cellules WT (B), et des fibroblastes transduits par le shRNA anti-*RAD50*. **58**

Figure 36 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et RAD50$^{KO/del}$. **59**

Figure 37 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT (B) et RAD50$^{KO/del}$ (C). **60**

Figure 38 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de

propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par le sh scramble ou par le shRNA anti-*RAD50*. **61**

Figure 39 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT (B) et transduites par les sh*RAD50* (C). **62**

Figure 40: représentation des pourcentages d'indels au locus FAM après transfection par CRISPR-Cas9 dans les cellules WT, dans les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$ et dans les fibroblastes transduits par les sh*RAD50* ou par le sh scramble. **63**

Figure 41 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez, exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après le dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$, après induction ou non d'une CDB. **64**

Figure 42 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez, exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après le dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées transduites par le sh scramble et par le shRNA anti-*RAD50* après induction ou non d'une CDB. **65**

Figure 43 : Représentation de la répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire obtenue à partir des résultats de cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium des cellules WT et des fibroblastes transduits par les sh*RAD50* avant ou 7h après l'induction d'une CDB. **66**

Figure 44 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et des cellules RAD50$^{KO/del}$, seules ou 24h après induction d'une CDB. **67**

Figure 45 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et de la lignée RAD50$^{KO/del}$(B), avant ou 24h après induction d'une CDB (C : RAD50$^{KO/del}$+ CDB). **68**

Figure 46 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par le sh scramble ou par le shRNA anti-*RAD50*, avant ou 48h après induction d'une CDB. **69**

Figure 47 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par les sh*RAD50* (B), avant ou 48h après induction d'une CDB (C : sh*RAD50* + CDB). **70**

Figure 48 : tableau récapitulatif des résultats de prolifération cellulaire, de cycle cellulaire et de mort cellulaire obtenus sur les différentes lignées seules ou après induction d'une CDB. **71**

Figure 49 : Modèle mettant en relation le niveau d'expression de *RAD50* et son impact phénotypique. **75**

Liste des abréviations

- *ABM : Agence de la Biomédecine*
- *ADN : Acide désoxyribonucléique*
- *AMH : Hormone Anti-Müllérienne*
- *ARN : Acide ribonucléique*
- *ARNm : ARN messager*
- *ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated*
- *AURKC : Aurora Kinase C*
- *BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4*
- *BPES : Blepharophimosis Syndrome*
- *Cas9 : CRISPR associated protein 9*
- *CDB : Cassure double brin*
- *CFA : Compte des follicules antraux*
- *CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*
- *CGP : cellules germinales primordiales*
- *cPPT : central polypurine tract-central termination sequence*
- *CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- *cr-ARN : CRISPR-ARN*
- *CS : Complexe synaptonémal*
- *DDR : DNA damage response*
- *dNTP : Désoxyribonucléotides*
- *DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
- *Exo 1 : Exonucléase 1*
- *FISH : Fluorescence In Situ Hybridization*
- *FIV : Fécondation in vitro*
- *FSH : Folliculo-Stimulating Hormone*
- *GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
- *GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone*
- *GnRH-R : récepteur à la GnRH*
- *HEK : Human Embryonic Kidney*
- *hFF : human Foreskin Fibroblast (fibroblastes humains)*
- *ICE : Inference of CRISPR Editing*
- *ICSI : Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde*
- *Indels : insertions/délétions*
- *IOP : Insuffisance ovarienne prématurée*
- *IP : Iodure de propidium*
- *IRES : Internal ribosome entry site*
- *jpc : jours post-conception*
- *KI : Knock-In*
- *KO : Knock-Out*
- *LTR : Long terminal repeats*
- *LH : Luteinizing Hormone*
- *$MgCl_2$: Chlorure de magnésium*
- *MOI : Multiplicity of infection*
- *MRE11 : Meiotic Recombination 11 homolog 1A*
- *MRN : Mre11-Rad50-Nbs1*
- *PCR : Polymérase chain reaction*
- *PFA : Paraformaldéhyde*
- *puroR : gène de résistance à la puromycine*
- *NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome protein 1*
- *NHEJ : Non-homologous end-joining*
- *OMS : Organisation Mondiale de la Santé*
- *pb : paire de bases*
- *RNP : Ribonucléoprotéine*
- *RPA : Protéine de réplication A*
- *RRE : Elément de réponse à Rev*
- *RRH : Réparation par recherche d'homologie*
- *RT-qPCR : PCR quantitative après rétrotranscription*
- *SCOS : Sertoli Cells Only Syndrome*
- *sgRNA : guide ARN*
- *TBP : TATA box binding protein*
- *Tracr-ARN : Transactivating ARN*
- *TS : Tubes séminifères*
- *WB : Western Blot*
- *WPRE : Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*
- *WT : Wild-type*

I. Introduction

A. L'infertilité

1. Généralités

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estime que l'infertilité, définie par l'inaptitude biologique à concevoir, touche entre 7 et 15% des couples en âge de procréer (1). Selon l'Agence de la Biomédecine (ABM), 33% de ces infertilités ont une cause féminine, 20% une cause masculine, 39% une cause mixte et 8% sont inexpliquées (2).

Chez la femme, l'âge est le facteur majoritaire impactant la fertilité, avec un taux de conception par cycle de 25% à 25 ans contre 12% à 35 ans et 6% à 40 ans (3). Parmi les causes d'infertilité féminine, on retrouve les troubles de l'ovulation, plus ou moins associés à des anomalies de la réserve ovarienne, les pathologies tubo-péritonéales, cervicales et utérines.

Quant à l'homme, son infertilité peut être due à une anomalie qualitative des spermatozoïdes, comme un défaut de mobilité ou de vitalité, ou encore à une anomalie quantitative. Dans ce cas, l'anomalie s'étend sur un spectre allant de l'oligozoospermie à l'azoospermie (absence totale de spermatozoïde dans l'éjaculat), en passant par la cryptozoospermie (rares spermatozoïdes présents dans l'éjaculat retrouvés après centrifugation) (4). Les anomalies quantitatives spermatiques peuvent avoir une origine sécrétoire dite « non obstructive » quand la spermatogenèse n'est pas fonctionnelle ou excrétoire et dite « obstructive » lorsqu'une obstruction empêche les spermatozoïdes de rejoindre l'éjaculat. En cas d'anomalie sévère, il est parfois possible de retrouver dans une biopsie testiculaire des spermatozoïdes qui seront utilisés pour des techniques de fécondation *in vitro* (FIV) (4).

Un certain nombre de ces infertilités a une origine génétique.

2. Les infertilités génétiques

Il existe de nombreuses causes génétiques responsables d'infertilité. Parmi les causes idiopathiques, beaucoup pourraient s'expliquer par des facteurs environnementaux, comme les polluants de l'environnement (5), ou par une anomalie génétique encore inconnue.

Ainsi, les analyses génomiques à grand débit et les modèles animaux ont récemment permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité d'anomalies génétiques responsables d'infertilité.

i. Infertilités génétiques masculines

L'infertilité touche environ 7% de la population masculine (4).

De nombreuses causes génétiques, représentant environ 15% des cas, ont déjà été identifiées. Les patients présentant une azoospermie sont les plus à risque de porter une anomalie génétique (25%) et plus la qualité du sperme augmente, moins le patient a de risque que son infertilité soit d'origine génétique (figure 1).

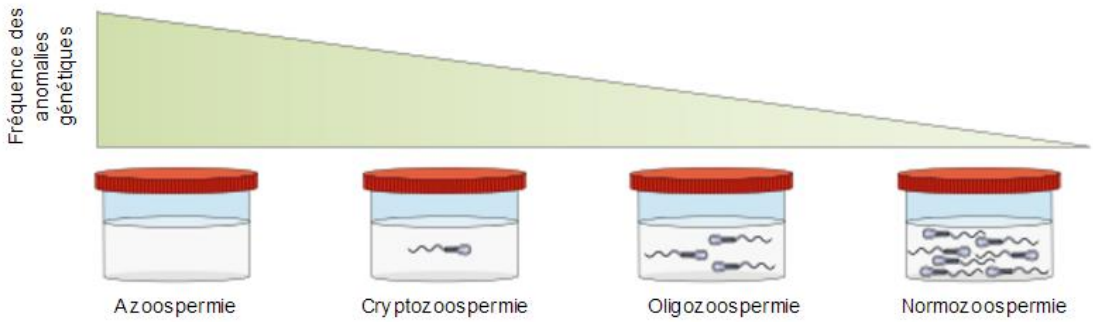


Figure 1 : Schéma représentant les différents troubles quantitatifs du sperme et la fréquence des anomalies génétiques associées d'après Krausz et al. (4) : *il existe une corrélation inverse entre le nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat et la prévalence des anomalies génétiques.*

Lorsqu'un bilan génétique de l'infertilité est indiqué, il comporte quatre objectifs : poser un diagnostic étiologique, prédire les chances de trouver des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire en cas d'azoospermie, apporter un conseil génétique adapté s'il existe un risque de transmission à la descendance et proposer une prise en charge personnalisée (4).

Cependant, avant de procéder au bilan génétique, il est nécessaire d'explorer la fertilité masculine - à commencer par la réalisation d'un spermogramme permettant d'objectiver le volume de sperme et son pH, la présence ou non de spermatozoïdes et leur concentration, leur vitalité, leur mobilité et leur morphologie (6).

Si la concentration en spermatozoïde est diminuée, donc inférieure à 16 millions par millilitres (6) - ce qu'on appelle une oligozoospermie, voire une cryptozoospermie, ou en cas d'azoospermie - l'étiologie peut être centrale ou périphérique (7).

1. Les causes centrales

Dans le cas d'une cause centrale de l'infertilité, que l'on appelle hypogonadisme hypogonadotrope, l'axe gonadotrope n'est pas suffisamment activé (8). Le taux de FSH (*folliculo stimulating hormone*) est alors diminué.

Parmi les étiologies génétiques responsables de ce trouble, on retrouve les causes congénitales isolées. Cette catégorie regroupe les pathologies avec anosmie – comme le syndrome de Kallman dû notamment à des mutations des gènes *KAL1* ou *2*, entraînant un défaut de migration des neurones à GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone)* – et les troubles sans anosmie avec des mutations du *récepteur à la GnRH* (*GnRH-R)* et de *GPR54* (8).

Par ailleurs, il existe les hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux syndromiques avec la maladie de Bardet Biedl, associée à des mutations de douze gènes (de *BBS1* à *BBS12*) et la maladie de Prader Willi, initiée par un défaut d'empreinte parentale au niveau du bras long du chromosome 15 (8).
Dans ces pathologies, la spermatogenèse est altérée et peut être rétablie chez 80% des patients après 9 à 18 mois de traitement par gonadotrophines (4).

Les étiologies centrales étant plutôt rares, on retrouve la majorité des infertilités génétiques parmi les causes périphériques (4).

2. Les causes périphériques

a. Non obstructives

En cas d'hypogonadisme hypergonadotrope, le taux de FSH est augmenté. Il s'agit d'un trouble périphérique non obstructif. Dans ce cas, il faut rechercher des anomalies cytogénétiques de nombre ou de structure des chromosomes, pouvant le plus vraisemblablement poser des problèmes au moment de l'appariement des chromosomes lors de la méiose (4).

Le diagnostic étiologique repose alors notamment sur le caryotype, qui est indiqué selon les recommandations de l'Association Européenne d'Urologie en cas d'oligozoospermie inférieure à 10 millions par millilitres (7). Cet examen met en évidence les translocations, inversions et aneuploïdies (4).

Certains patients sont touchés par des anomalies structurelles des autosomes, plus fréquentes parmi les oligozoospermies, dont les plus représentées sont les translocations robertsoniennes, les inversions et les translocations réciproques (4). Ces anomalies augmentent le risque d'aneuploïdie chez le fœtus.

Un autre trouble touchant les gonosomes est le syndrome de Klinefelter : il concerne 1 personne sur 600 ; il est la cause la plus fréquente d'anomalie chromosomique dans les azoospermies non obstructives (1 personne sur 7) (4). Cliniquement, ces patients présentent des signes d'hypogonadisme hypergonadotrope avec des testicules de petites tailles et une gynécomastie.
Le caryotype 47XXY, identifié dans la grande majorité des cas, est associé à une azoospermie chez plus de 90% des patients (4). On retrouve des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire dans environ 50% des cas et plus rarement dans l'éjaculat.

Cependant, des analyses FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) ont montré que 5 à 7% des spermatozoïdes retrouvés sont aneuploïdes – contre 1% chez les hommes fertiles et 4% chez les hommes infertiles – entraînant un risque pour la descendance (9). Une revue de la littérature sur la fertilité des patients présentant ce syndrome invite à remettre en perspective cette éventualité : plusieurs études ont montré que les enfants à naître étaient en bonne santé et ne présentaient pas d'aneuploïdie (9).
La littérature n'est d'ailleurs pas définitive sur l'origine des spermatozoïdes aneuploïdes (9). L'analyse FISH de deux patients a révélé la présence uniquement de spermatocytes I et de spermatogonies 47 XXY avec des spermatocytes II, des spermatides et des spermatozoïdes 23X, 23Y, 220, 24XY et 24XX (10). Cette étude va dans le sens d'une aptitude des spermatogonies XXY à traverser toutes les étapes de la méiose. D'autres études proposent plutôt que les patients présentent un mosaïcisme testiculaire, avec des spermatogonies de différents génotypes au sein d'un même tube séminifère (10).

Une autre anomalie génétique périphérique non obstructive est la microdélétion du chromosome Y (11). Une délétion d'une ou plusieurs des trois zones (*AZFa, b* ou *c)* partielles ou complètes est corrélée avec des troubles importants de la spermatogenèse (figure 2). En effet, ces trois loci contiennent de nombreux gènes impliqués dans la spermatogenèse, d'où les conséquences d'une délétion (4). Une délétion dans *AZFa* entraîne notamment le *Sertoli cells only syndrome* (SCOS) avec une absence totale de cellules germinales à l'histologie testiculaire. Lorsque c'est la zone *AZFb* qui est touchée, la spermatogenèse est arrêtée en début de méiose (11).
On retrouve parfois des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire, si la délétion se trouve dans la zone *c*, qui pourront être utilisés en FIV avec injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). La délétion sera alors forcément transmise à un embryon de sexe masculin (4).
La recherche d'une microdélétion du chromosome Y par PCR (*polymérase chain reaction)* est indiquée en cas de concentration en spermatozoïdes au spermogramme inférieure à 1 million par millilitre selon l'Association Française d'Urologie (7).

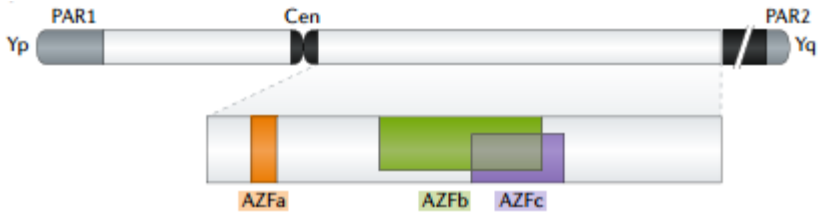


Figure 2 : Schéma du chromosome Y et des trois zones AZFa,b et c pouvant comporter une délétion et entraîner une azoospermie (4).

Les causes périphériques non obstructives regroupent les anomalies impactant la spermatogenèse et les troubles excrétoires s'intéressent aux obstructions empêchant les spermatozoïdes de rejoindre l'éjaculat.

b. Obstructives

En cas d'anomalie excrétoire ou obstructive pouvant parfois être objectivée à l'échographie endorectale, le bilan hormonal du patient est normalement dans les valeurs de référence. La seule forme congénitale de trouble obstructif de cause génétique identifiée est l'agénésie des canaux déférents avec anatomie rénale conservée (4). Le gène impliqué est le *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), dont les mutations récessives représentent environ 80% des cas (12). L'agénésie des deux canaux déférents est la plus fréquente ; elle est caractérisée au spermogramme par une hypospermie avec un volume inférieur à 1,4 millilitres, un pH inférieur à 7 et une azoospermie. Certaines mutations du *CFTR*, dont la plus fréquente est la *ΔF508* sont associées à la mucoviscidose (12).

Le trouble étant obstructif, l'histologie testiculaire n'est pas perturbée et la spermatogenèse a lieu correctement. On peut donc réaliser une biopsie testiculaire pour récupérer des spermatozoïdes à utiliser en FIV ICSI, qui seront porteurs de la mutation. Le risque de transmission à la descendance repose donc sur le statut génétique de la conjointe, dont le screening génétique sera nécessaire (12).

Il existe enfin les anomalies morphologiques des spermatozoïdes.

3. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont les plus rares parmi les causes d'infertilités génétiques masculines (4).

La macrocéphalie, par exemple, est due à une mutation dans le gène *Aurora Kinase C (AURKC)* à l'origine de spermatozoïdes tétraploïdes entraînant une augmentation du volume de leur tête (13) (figure 3).

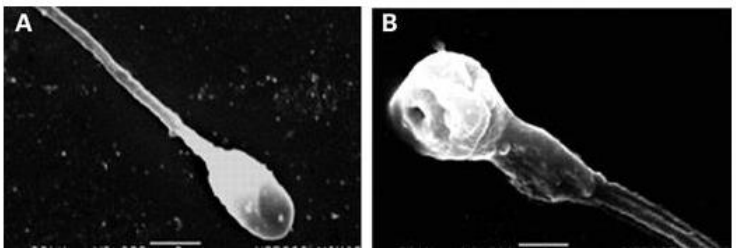


Figure 3 : Photos prises au microscope électronique à balayage au grossissement x9000 représentant un spermatozoïde normal (A) et un spermatozoïde macrocéphale d'un patient présentant une mutation dans le gène AURKC (B) (13).

La globozoospermie est quant à elle mise en évidence par l'observation de spermatozoïdes dépourvus d'acrosome avec une tête ronde et de volume réduit au spermocytogramme (14) (figure 4). Devant l'incapacité à réaliser une réaction acrosomique, les spermatozoïdes ne peuvent féconder un ovocyte de façon naturelle. Quatre gènes impliqués dans ce trouble ont été identifiés chez l'homme : *ZPBP, PICK1, SPATA16* et *DPY19L2* ; ce dernier est impliqué dans la formation de l'acrosome. Les patients peuvent avoir recours à la FIV ICSI, ce qui permet de féconder l'ovocyte de façon artificielle. Les chances de succès sont faibles, avec un fort risque d'aneuploïdie, de dommages de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et d'aberrations épigénétiques (4).

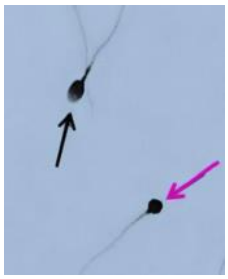


Figure 4 : photos issues d'un spermocytogramme d'un patient présentant une globozoospermie avec un spermatozoïde normal (flèche noire) et un spermatozoïde dépourvu d'acrosome (flèche rose) (14).

Au total, il existe donc de multiples causes génétiques d'infertilités masculine (figure 5).

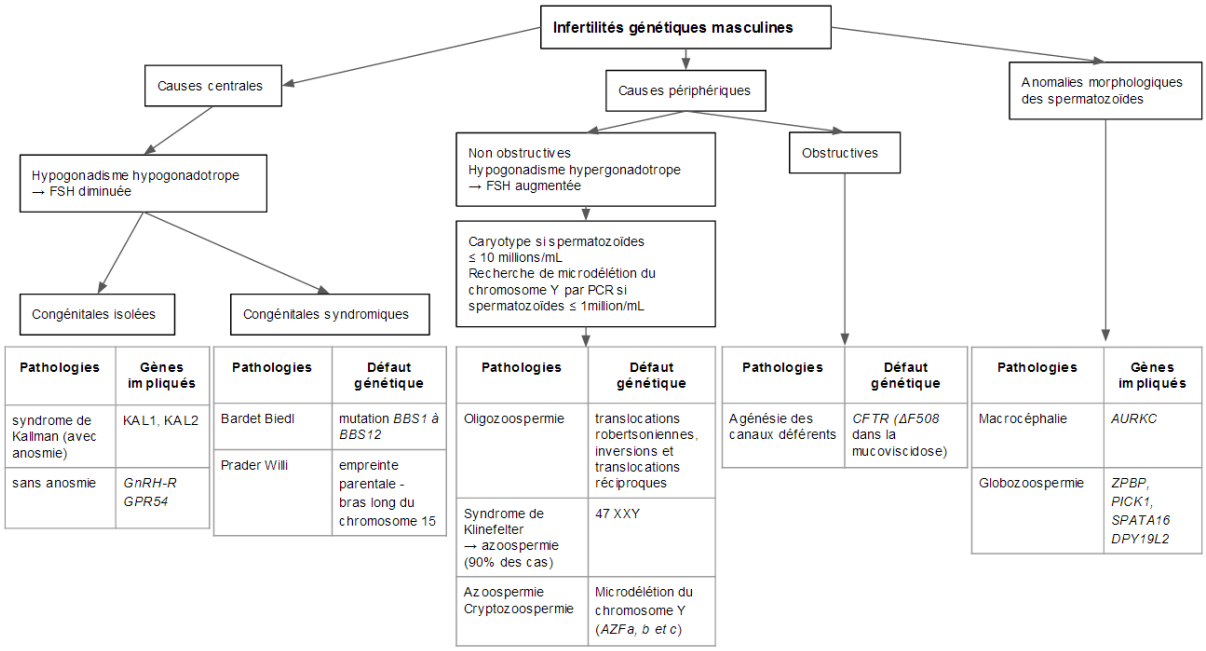


Figure 5 : schéma résumant les causes d'infertilités génétiques masculines.

Enfin, environ 40% des infertilités masculines sont idiopathiques et pourraient s'expliquer par des anomalies génétiques. C'est pourquoi, il est nécessaire de continuer à rechercher des gènes candidats notamment par les techniques prometteuses de screening du génome ou de l'exome (4).

De nombreuses causes génétiques ont également été identifiées parmi les infertilités féminines.

ii. Infertilités génétiques féminines

Les infertilités féminines d'origine génétique sont principalement regroupées dans les troubles de l'ovulation (15), eux-mêmes divisés en plusieurs catégories OMS (figure 6).

Type OMS	**I : hypogonadisme hypogonadotrope**	**IIa : dysmaturation folliculaire**	**IIb : syndrôme des ovaires polykystiques**	**III : Insuffisance ovarienne**
Clinique	Aménorrhée	Spanioménorrhée	Spanioménorrhée, hirsutisme	Cycles courts et/ou spanioménorrhée
FSH	N ou ↘	N	N	↗
LH	N ou ↘	N	N ou ↗	↗
Estradiol	↘	N	N ou ↗	↘ ou ↗
Androgènes	N ou ↘	N	N ou ↗	↘
AMH	N ou ↘	N	↗	↘
Echographie ovarienne	variable	N	ovaires polyfolliculaires	Petits ovaires pauvres
Etiologies	Hyperprolactinémie, Syndrôme de Kallman Adénome hypophysaire Fonctionnelle (anorexie mentale, sportive)	?	Génétique ? Environnement ?	Génétique : - Syndrôme de Turner - *FMR1* Chimiothérapie Radiothérapie Idiopathiques ++

Figure 6 : tableau représentant les différentes catégories OMS des troubles de l'ovulation (1,16).

D'après le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) (17), le dosage de la progestérone entre le vingtième et le vingt-deuxième jour du cycle permet d'objectiver une ovulation de bonne qualité si elle est supérieure à 10 ng/mL. Il est inférieur à 3ng/mL en cas d'anovulation (18).

Le bilan hormonal avec le dosage de la FSH, la LH (*luteinizing hormone*) et l'oestradiol au deuxième ou troisième jour du cycle permet d'orienter vers une cause centrale ou périphérique de l'anovulation (8). Le dosage de l'AMH (hormone anti-müllérienne) vient compléter le bilan hormonal pour estimer la réserve ovarienne, de même que l'échographie ovarienne, par voie endovaginale, grâce au compte des follicules antraux (CFA) (19).

1. Les causes centrales

Lors du bilan hormonal, si les taux de FSH, LH et d'oestradiol sont abaissés, la patiente est en hypogonadisme hypogonadotrope (19). L'anovulation est alors d'origine centrale, par défaut de sécrétion pulsatile de GnRH (15), de type OMS I (figure 6).

Parmi les étiologies génétiques responsables de ce trouble, on retrouve les mêmes que chez l'homme avec les causes congénitales isolées (syndrôme de Kallman par exemple) et les congénitales syndromiques (maladies de Bardet Biedl et de Prader Willi) (15).

Il existe également des causes périphériques génétiques d'infertilité chez la femme.

2. Les causes périphériques

En cas de bilan hormonal à J2-J3 retrouvant une FSH et une LH augmentées avec un estradiol diminué dans la plupart des cas, la patiente est en hypogonadisme hypergonadotrope. Le trouble de l'ovulation est d'origine périphérique, de type OMS III (15) (figure 6). Il s'agit d'une insuffisance ovarienne.

L'insuffisance ovarienne est dite prématurée (IOP), lorsqu'il s'agit d'une aménorrhée primaire ou secondaire de plus de quatre mois, survenant avant l'âge de 40 ans (20). Les cycles sont courts avec ou sans spanioménorrhée. L'AMH et le CFA sont effondrés devant l'altération de la réserve ovarienne. Elle touche 1% des femmes de moins de 40 ans et 0,1% des moins de 30 ans. Les causes génétiques sont estimées à 20-25% des cas d'IOP (20).

Parmi elles, on retrouve les aneuploïdies comme le syndrome de Turner dans 13% des cas, de caryotype 45 X0, responsable de dysgénésie gonadique (20). Cliniquement, la patiente présente une dysmorphie variable, une petite stature et des malformations cardiaques et rénales. 2 à 5% des patientes pourront avoir une grossesse spontanée et la majorité de ces femmes sera porteuse de mosaïcisme, dont le phénotype est moins sévère.
Les grossesses sont cependant peu recommandées face aux risques cardiaques, de fausses couches, de malformations et d'anomalies chromosomiques (21).

Par ailleurs, le chromosome X peut être anormal et donner lieu à une IOP : le Xq isochromosome (20).

On retrouve ensuite des mutations du chromosomes X. *FRM1* est le gène le plus fréquemment associé à une IOP (4-10%) au sein du syndrome de l'X fragile donnant des retards mentaux chez les fils (20). Une prémutation de ce gène correspond à une répétition de triplets de bases CGG entre 60 et 200 fois et une mutation à plus de 200 fois – quand un nombre normal est inférieur à 60 (22).

Parmi les mutations des autosomes donnant des IOP syndromiques, il existe notamment la mutation de *FOXL2* responsable du BPES (*blepharophimosis syndrome*), et de *ATM (ataxia telangiectasia mutated)* - ou non syndromique avec des mutations des gènes *GDF9, NOBOX, FIGLA* et *SF1* par exemple (23) (figure 7).

A

Gene	Locus
CHM [21]	Xq21.1-q21.3
DIAPH2 [21]	Xq21.33
DACH2 [21]	Xq21.3
POF1B [21]	Xq21.2
XPNPEP2 [21]	Xq25
NXF5 [22]	Xq22.1
FMR1 [26]	Xq27.3
FMR2 [35]	Xq28
XIST [10]	Xq13.2
CENP1 [20]	Xq22.1
PGRMC1 [36]	Xq22-q24
AR [37]	Xq12
FOXO4 [38]	Xq13.1
AGTR2 [19]	Xq22-23
BHLHB9 [3]	Xq22.1
BMP15 [39]	Xp11.2
ZFX [10]	Xp22.1-21.3
SHOX [40]	Xp22.33

B

Gene	Locus
FSHR [41, 10]	2p21-p16
LHR [43]	2p21
FSHβ [4]	11p13
LHβ [4]	19q13.32
GNAS [21]	20q13.3
FOXL2 [44]	3q22-q23
GALT [46]	9p13
AIRE [47]	21q22.3
StAR [48]	8p11.2
CYP17A1 [49]	10q24.3
CYP19A1 [71], [50]	15q21.1
EIF2B2 [51]	14q24.3
EIF2B4 [51]	2p23.3
EIF2B5 [51]	3q27
NOG [52]	17q22
ATM [21]	10q22.3
POLG [53]	15q25
PMM1 [54]	22q13.2
BMPR1B [55]	4q22-q24
GJA1 [56]	1p34.3
INHA [57]	2q33-q36
GDF9 [10]	5q23.2
TGFBR3 [58]	1p33-p32,1
NOBOX [59]	7q35
NANOS3 [10]	19p13.13
FIGLα [60]	2p13.3
FOXO1 [61]	13q14.1
FOXO3 [61]	6p21
ESR1 [62, 63]	6p35
WT1 [64]	11p13
PTEN [65]	10q23.31
CDKN1B [66]	12p13.1
CITED2 [67]	6q24.1
SF1 [68]	11q13.1
WNT4 [69]	1p36.12
DMC1 [70]	22q13.1
MSH5 [70]	6p21.3
DAZL [3]	3p24.3
EIF5B [3]	2q11.2
YBX2 [3]	17p13.1
BAX [3]	19q13.33
SOHLH1 [3]	9q34.3

Figure 7 : Gènes situés sur le chromosome X (A) et gènes autosomiques (B) associés à une IOP (20).

Devant la prévalence du syndrome de Turner et de l'X fragile parmi les causes d'IOP, le caryotype et la recherche de la mutation de *FMR1* sont indiqués en première intention. En cas de résultat normal, les mutations plus rares seront dépistées par puces à ADN (22).

Les mutations les plus fréquentes aboutissant à une IOP touchent les gènes impliqués dans la gamétogenèse (23).

B. La gamétogenèse

1. Généralités

La gamétogenèse est un processus permettant de former des cellules germinales matures : le spermatozoïde et l'ovocyte, qui, après fécondation, forment un zygote totipotent (24). Toutes les cellules de l'individu néoformé donneront, à leur tour, l'ensemble des tissus et lignées somatiques ainsi qu'une nouvelle génération de gamètes.

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont les précurseurs des gamètes mâles et femelles ; elles dérivent chez les mammifères de l'épiblaste sous l'action notamment du BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*). Elles se différencient à 6,25 jours post conception (jpc) chez la souris et à la deuxième semaine de développement embryonnaire chez l'homme (figure 8). Les CGP prolifèrent puis migrent entre 8 et 10,5 jpc chez la souris et entre 29 et 35 jpc chez l'homme, d'abord passivement, grâce au repli du corps de l'embryon, au sein de l'épithélium intestinal qu'elles quittent ensuite activement grâce à l'expression de pseudopodes (figure 8). Elles rejoignent alors la gonade bipotentielle, dérivée de la crête génitale pour devenir des gonocytes. La différenciation en ovogonie ou en gonocyte dépendra du devenir sexuel de la gonade.

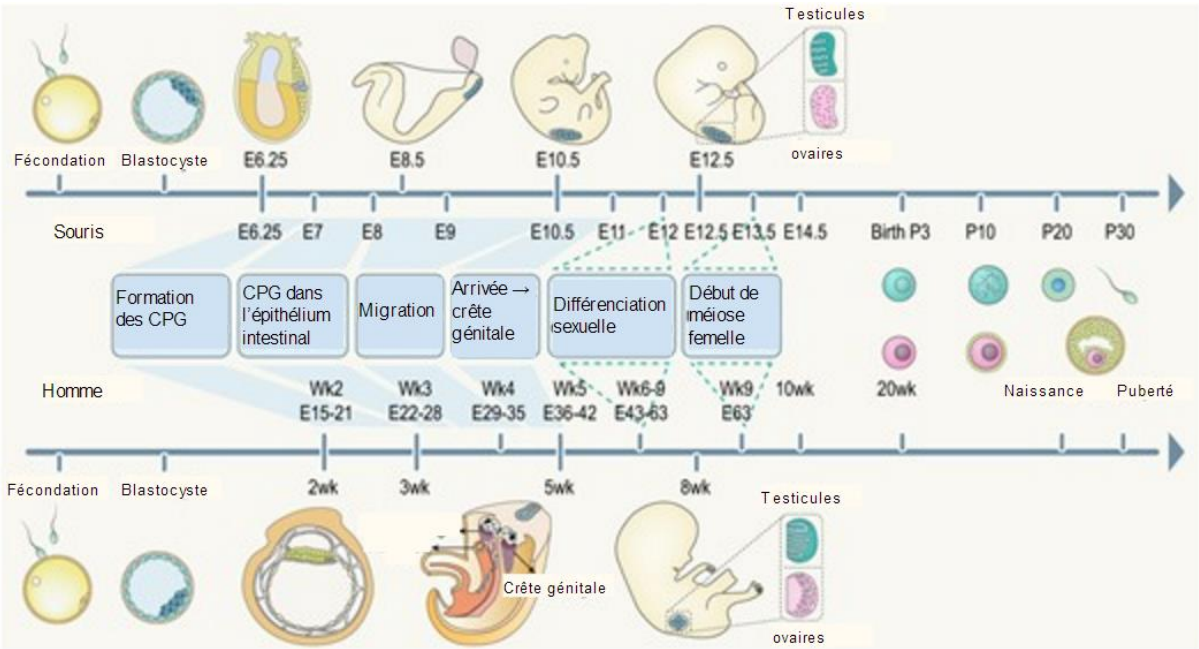


Figure 8 : schéma comparant les différentes étapes de formation, de migration et de différenciation des CGP, chez l'homme et chez la souris, d'après Li et al. (25).

La gamétogenèse chez la femme débutera donc dans l'ovaire fœtal.

2. Chez la femme

Chez la femme, les follicules primordiaux formés durant la vie fœtale constituent la seule source de production ovocytaire (24).

L'ovogenèse se divise en deux étapes : la différenciation en ovocyte *in utero* et son développement au sein du follicule qui débute à la puberté (figure 9).

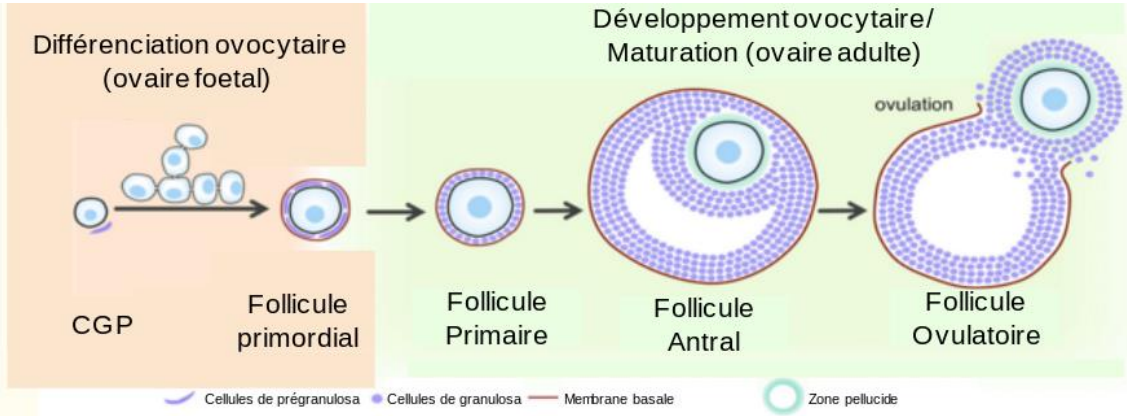


Figure 9 : Schéma représentant les différentes étapes de la différenciation ovocytaire, passant des CGP à l'ovocyte I et de maturation ovocytaire au sein du follicule primordial jusqu'au follicule ovulatoire, d'après Larose et al. (24).

La fragmentation des cordons ovigères durant la vie fœtale consiste à entourer les ovogonies d'une simple couche de cellules de pré-granulosa, donnant lieu aux follicules primordiaux (24). Ces derniers restent en quiescence jusqu'à la puberté. A ce moment-là, les follicules primordiaux sont recrutés pour donner des follicules primaires : l'ovocyte est entouré de cellules différenciées en granulosa. Chez la souris, une première vague de follicules entrent en croissance sans passer par le statut de follicule primordial (figure 10). Ils se situent alors dans la zone plus centrale et plus vascularisée de l'ovaire, et sont déjà riches en cellules de granulosa. Leur croissance est rapide et ces follicules subissent une atrésie massive. L'étude de cette première vague est à approfondir et notamment chez l'Homme. Ces follicules produiraient de l'estradiol en grande quantité, et le rôle de cette sécrétion reste à explorer (26).

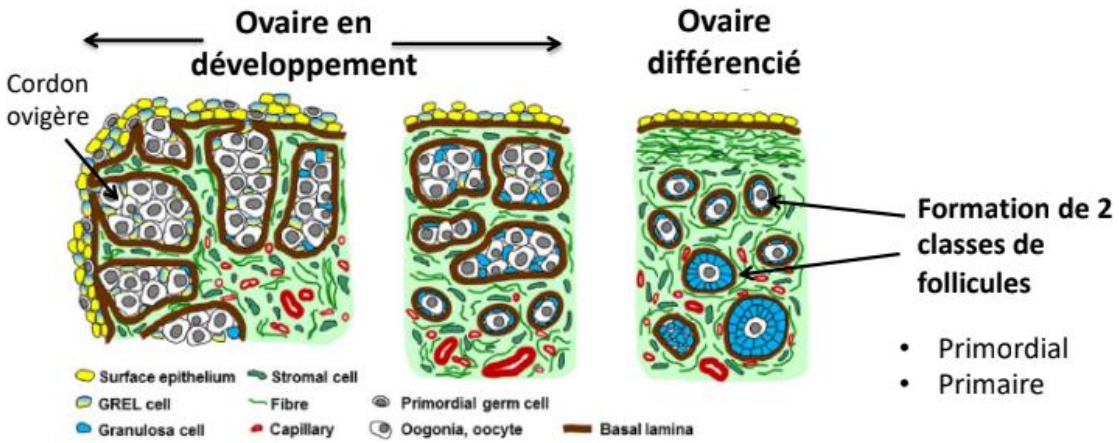


Figure 10 : Schéma représentant le développement des ovaires chez la souris avec la formation de deux classes de follicules : les primordiaux et les primaires, adapté de Smith et al.(26).

Débute alors le développement folliculaire basal jusqu'au follicule préantral, dépendant de facteurs de croissance. L'ovocyte est transcriptionnellement actif et sa taille augmente (24). Les cellules de la granulosa deviennent cuboïdes et prolifèrent. Au stade préantral, l'ovocyte est d'abord entouré de la zone pellucide puis de couches de cellules squameuses constituant la thèque.

Par la suite, le follicule est dit « antral » et sa croissance devient dépendante de la FSH (24). Apparaissent alors l'antrum, une cavité remplie de liquide et le *cumulus oophorus*, correspondant à la couche de granulosa qui entoure l'ovocyte. Le reste des cellules constituent la granulosa murale. Parmi les follicules antraux les plus sensibles à la FSH, sécrétée de façon cyclique à partir de la puberté, un seul sera sélectionné pour l'ovulation sous l'action d'un pic de LH (24). Cet ovocyte est mature et prêt à accueillir un spermatozoïde. Les autres follicules entrent en atrésie.

Un phénomène unique aux ovocytes de mammifère consiste en leur atrésie massive. Chez la femme, à 6 mois de grossesse, le pool ovocytaire est autour de 5 à 7 millions. Il chute à 2 millions à la naissance puis à 300 000 à la puberté et chez l'adulte, seulement 300 à 400 ovulations vont survenir (27).

Chez l'homme, le processus de production de spermatozoïde est continu ; c'est la spermatogenèse.

3. Chez l'homme

La spermatogenèse se divise en trois étapes (figure 11) (24):

- La prolifération mitotique qui permet le renouvellement continu de l'épithélium séminifère et qui donne naissance aux cellules entrant en méiose : les spermatogonies B. Cette étape dure 27 jours chez l'homme.
- La méiose, durant 24 jours chez l'homme et donnant quatre cellules germinales haploïdes en partant d'une cellule diploïde.
- La spermiogenèse, dont la durée est de 23 jours chez l'homme, constitue l'étape de différenciation terminale en spermatozoïde mature.

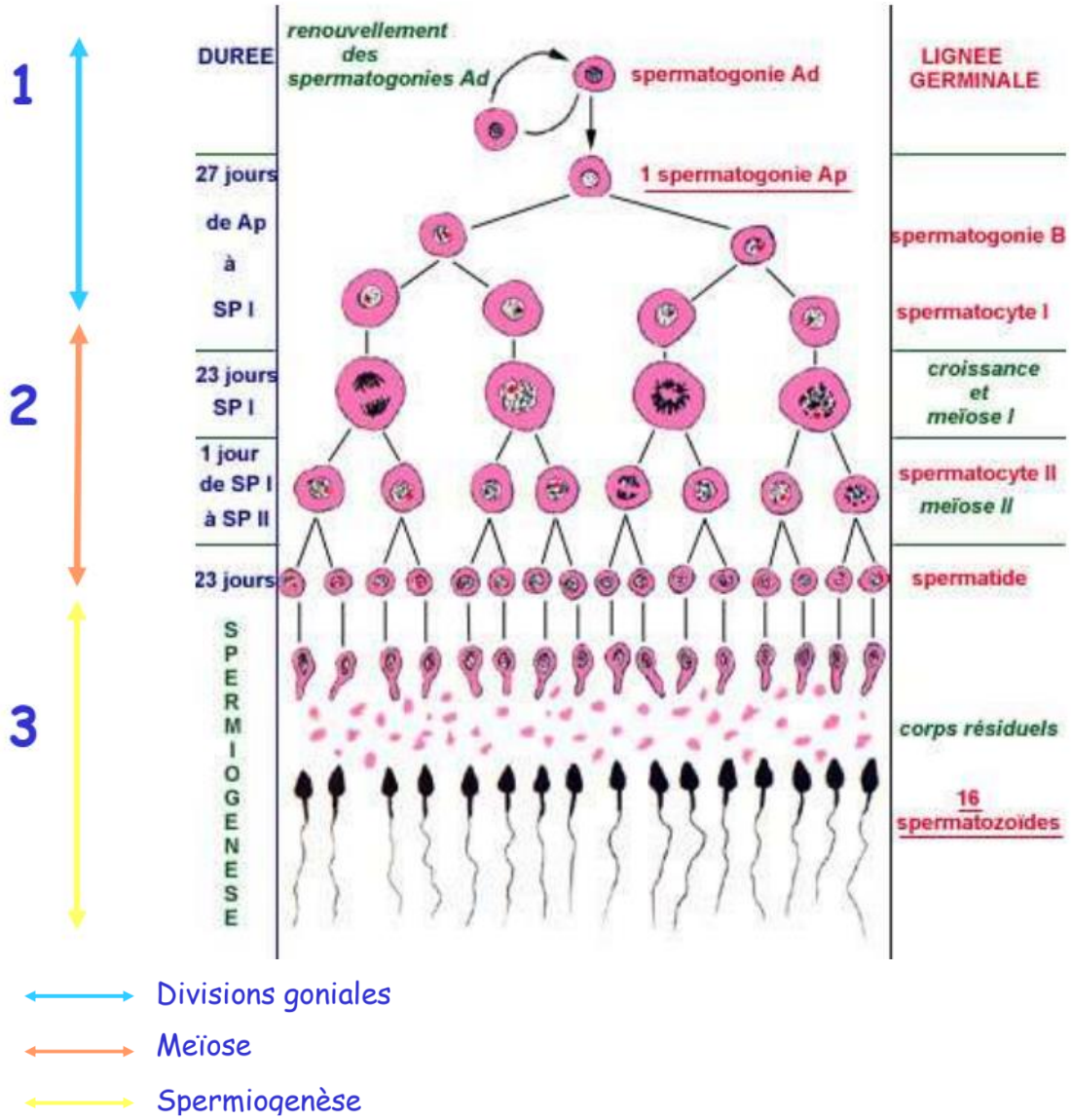


Figure 11 : Schéma représentant les trois phases de la spermatogenèse chez l'homme d'après le cours "La physiologie testiculaire" du Pr Rouiller-Fabre au master 2 "Reprodev" : *Prolifération mitotique des spermatogonies souches Ad, qui se différencient en spermatogonies Ap, puis de type B. Entrée en méiose pour donner les spermatocytes I puis II puis les spermatides rondes qui génèrent les spermatides allongées et les spermatozoïdes lors de la spermiogenèse.*

A partir de la puberté, ce processus est continu durant toute la vie de l'homme, grâce à la propriété de renouvellement permanent des cellules souches spermatogoniales dans les tubes séminifères (TS) des testicules (24). Des vagues asynchrones débutent régulièrement et durent 35 jours environ chez la souris et 74 chez l'homme.

Chez l'homme, les cellules souches spermatogoniales (As) ont été classifiées histologiquement selon leur marquage à l'hématoxyline, donnant les spermatogonies Ap (*pale*) et Ad (*dark*) (figure 11). Les As s'auto-renouvellent par mitose et se différencient en Ap puis Ad, elles-mêmes donnant les spermatogonies B.

Chez la souris, les cellules souches spermatogoniales deviennent des spermatogonies indifférenciées de type A qui s'auto-renouvellent pour maintenir un pool constant (24). Elles se composent de trois catégories : les As (souches), Apr (A *paired*) et les Aal (A alignées). Elles évoluent ensuite en spermatogonies de type A différenciées puis en intermédiaire et enfin en différenciées de type B.

Une réplication de l'ADN avant l'entrée en méiose permet d'obtenir des cellules à 4n lots d'ADN (deux chromosomes à deux chromatides) : les spermatocytes I (28). La méiose I génère les spermatocytes II à 2 n lots d'ADN (un chromosome à deux chromatides) puis la méiose II aux spermatides rondes à n lot d'ADN (un chromosome à une chromatide).

Enfin, la spermiogenèse est un processus de différenciation terminale, partant des spermatides rondes jusqu'à la formation de spermatozoïdes, en passant par l'étape de spermatides allongées (24).
Se forment l'acrosome et le flagelle, deux nouvelles structures essentielles aux spermatozoïdes et la chromatine se compacte grâce au remplacement des histones par des protamines.
La spermiation finale permet le détachement du spermatozoïde de la lumière du tube séminifère, avant d'initier sa longue route jusqu'à l'ovocyte, au cours de laquelle il subira de nombreux processus de maturation.

Une étape clé de la gamétogenèse, commune aux deux sexes, est donc la méiose.

C. La méiose

1. Définitions

La méiose est un processus de division cellulaire spécialisé permettant de passer d'une cellule diploïde à 4 cellules haploïdes chez les organismes à reproduction sexuée (figure 12). C'est l'étape de la gamétogenèse suivant la phase de prolifération mitotique des cellules germinales.

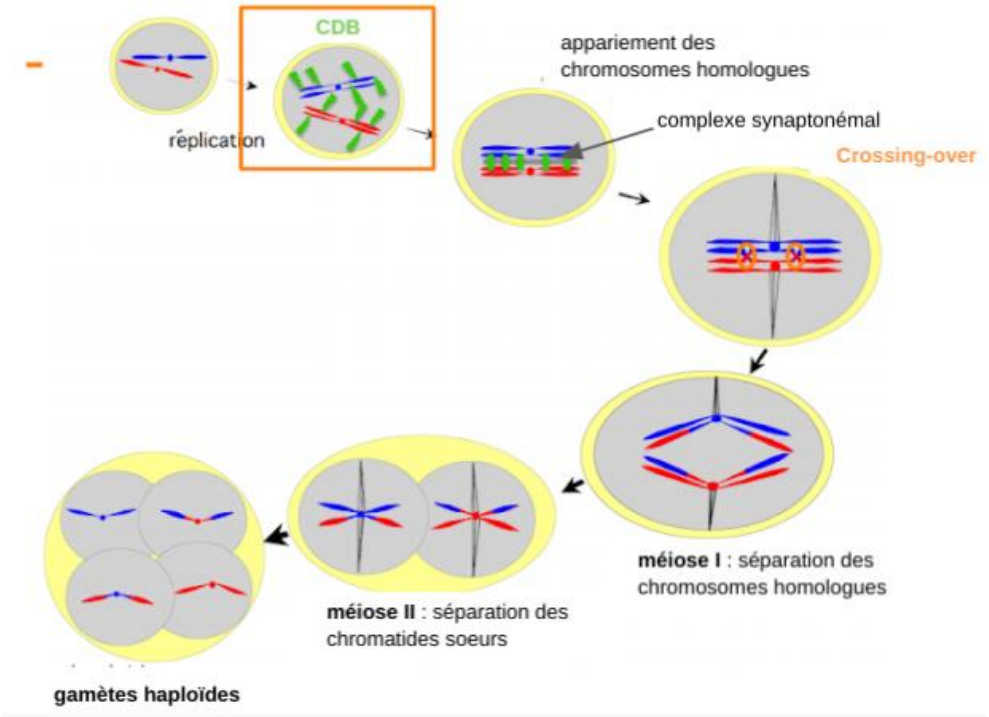


Figure 12 : Schéma représentant les différentes étapes de la méiose d'après le cours "Meiotic recombination : Breaking the genome to survive" de Madame Valérie Borde au master 2 "Reprodev" : *phase de réplication puis induction des cassures doubles brins (CDB), appariement des chromosomes homologues via le complexe synaptonémal, crossing-over, séparation des chromosomes homologues lors de la métaphase de méiose 1 et des chromatides sœurs lors de la métaphase de méiose 2 pour obtenir 4 gamètes haploïdes.*

La méiose est précédée d'une phase de réplication afin que chaque chromosome possède deux chromatides ; par ailleurs la mise en place des cohésines permet aux chromatides sœurs de s'apparier (28).

La première étape de la méiose ou méiose I se décompose en plusieurs phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (28). Il s'agit d'une méiose réductionnelle puisqu'elle intervient dans des cellules à deux lots de chromosomes pour donner des cellules à un lot de chromosomes à deux chromatides.

Au cours de la prophase, la formation de cassures doubles brins (CDB) et leur prise en charge sont deux événements essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues et au brassage de l'information génétique – un défaut de répartition des chromosomes donnant des gamètes aneuploïdes (28).

Pour ce faire, cinq étapes permettent d'aboutir à une métaphase adéquate (figures 13 et 14) :

- Le leptotène : formation des CDB par SPO11 à des locus bien définis permettant la recherche d'homologie dans le chromosome homologue pour un appariement correct. Différents acteurs interviennent comme RAD51 qui vient s'enrouler autour de l'extrémité simple brin générée précédemment notamment par MRE11 (*meiotic recombination 11 homolog 1A)* pour que celle-ci s'intercale dans le chromosome homologue.

- Le zygotène : synthèse du complexe synaptonémal (CS), une synapse qui vient stabiliser l'appariement des chromosomes homologues et qui est notamment constituée de cohésines spécifiques de la méiose comme REC8, RAD21L et STAG3. Le CS comporte également des éléments axiaux (SYCE1, SYCP1…) et latéraux (SYCP3, SYCP2).

- Le pachytène : recombinaison homologue et recombinaison réciproque (*crossing-over*) entre les chromosomes homologues, grâce à MLH1, MLH3 et EXO1 (Exonucléase 1), permettant l'échange de matériel génétique et assurant le brassage de l'information génétique au cours des générations.

- Le diplotène : retrait du CS.

- La diacinèse : les chromosomes homologues commencent à se séparer et restent unis par les chiasmas, où ont eu lieu les *crossing-over*, ce qui assure leur bonne position sur la plaque métaphasique et leur disjonction adéquate lors de la métaphase I.

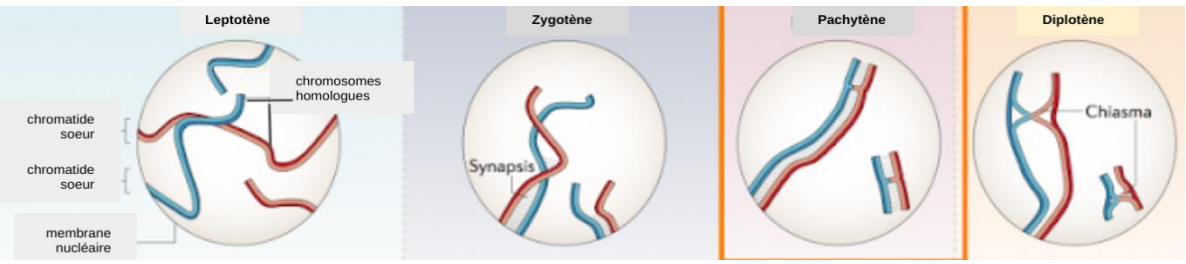


Figure 13 : Schéma représentant les étapes de la prophase I adapté de Baudat et al. (29) *: leptotène et formation des CDB permettant la recherche d'homologie, zygotène et formation du CS (synapsis), pachytène et crossing-over, diplotène et retrait du CS, les chromosomes homologues restant maintenus par les chiasmas.*

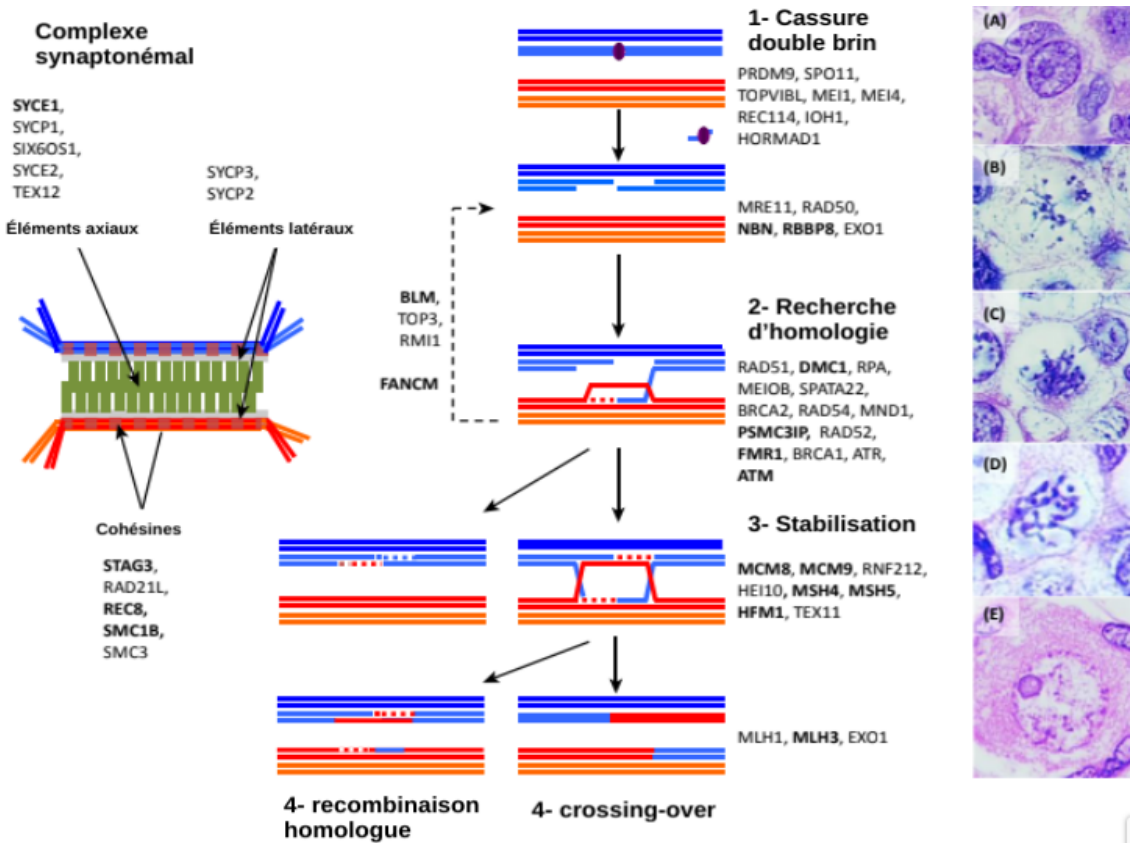


Figure 14 : Schéma représentant les étapes de la prophase de méiose I et les différents acteurs impliqués ; le panel de droite représente (A) des ovogonies, (B) le stade leptotène, (C) le stade zygotène, (D) le stade pachytène et (E) le stade diplotène, adapté de Huhtaniemi et al. (23).

A l'issue de la prophase I, les chromosomes homologues s'alignent sur la plaque métaphasique et se séparent lors de l'anaphase. Chaque lot de chromosome se retrouve à un pôle de la cellule pendant la télophase et rejoint une cellule fille au cours de la cytokinèse (28).

La deuxième étape de la méiose, ou méiose II, est équationnelle puisque l'on maintient le nombre de chromosomes : on réduit uniquement le nombre de chromatides (28). Elle n'est pas précédée d'une phase de réplication. Elle se décompose également en plusieurs étapes : la prophase II, la métaphase II, l'anaphase II, la télophase et la cytokinèse qui permet la division cellulaire finale aboutissant à 4 cellules à n chromosome à une chromatide (figure 15). La méiose II correspond à une mitose. La prophase II est donc plus courte que la I puisqu'elle ne comporte pas de processus de formation de CDB ni tous les événements qui s'ensuivent (30).

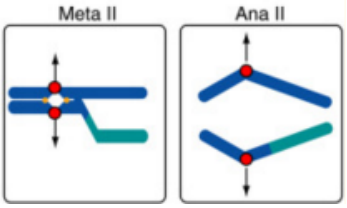


Figure 15 : schéma représentant les étapes de métaphase et d'anaphase II permettant de séparer les deux chromatides sœurs (30).

Chez l'homme, la méiose débute à la puberté et sera suivie de la spermiogenèse, phase de différenciation finale des spermatides en spermatozoïdes (28).

Chez la femme, elle démarre lors de la vie intra-utérine à 2 mois de gestation mais l'ovocyte est rapidement bloqué au stade diplotène de prophase I (28).
Puis la méiose reprend au moment de la puberté lors de l'ovulation. L'ovocyte sera à nouveau stoppé, cette fois en métaphase II. Un globule polaire émis emporte avec lui un lot de chromosomes. C'est la fécondation par le spermatozoïde qui permet d'initier la fin de la méiose II par émission d'un deuxième globule polaire, contenant la deuxième chromatide de chaque chromosome pour donner un ovocyte à n chromosome à 1 chromatide. Les seuls ovocytes à entreprendre une méiose complète sont ceux qui seront fécondés, soit très peu au cours de la vie d'une femme.

Ainsi, la méiose est une étape clé dans la synthèse des gamètes. Une anomalie peut donc être à l'origine d'une infertilité.

2. Anomalies génétiques de la méiose et infertilité

Une altération de l'expression des gènes impliqués dans la méiose peut être responsable d'infertilité.

Dans l'IOP, les causes génétiques sont estimées à 20-25% des cas (20). Dans une cohorte nationale de patientes en IOP, 40% des variants pathogènes identifiés étaient des gènes de réparation de l'ADN dans la méiose (23).
Parmi les gènes, dont une mutation a été identifiée comme responsable de cette pathologie, on retrouve par exemple STAG3, une cohésine spécifique de la méiose (31) ou encore ATM, une protéine qui initie la mise en pause du cycle cellulaire et le recrutement d'acteurs de réparation post-CDB (23). D'autres gènes de la méiose sont à ce jour suspectés et encore à l'étude comme DMC1, MLH3, ou encore Rec8.

Sur le versant masculin, dans la macrocéphalie, la mutation responsable se situe dans le gène de l'*AURKC*. Elle entraîne une disjonction aberrante des chromosomes au cours de la méiose I, à l'origine de spermatozoïdes tétraploïdes (13).

Grâce aux apports des nouvelles technologies et notamment le séquençage de nouvelle génération, d'autres gènes ont pu être identifiés. Par exemple SYCP3, protéine du CS, est responsable d'une anomalie quantitative des spermatozoïdes chez un patient (32). Une mutation non-sens, découverte par séquençage d'exome de *TEX15* – un gène impliqué dans la réparation des CDB au cours de la méiose – a entraîné une azoospermie et une oligozoospermie sévère par blocage méiotique dans une famille turque (33).

Ainsi, il existe de nombreux gènes intervenant dans la méiose et dont une mutation peut être responsable d'infertilité. Ce processus physiologique semble donc intéressant à étudier, à la recherche de nouveaux gènes candidats en infertilité. Par ailleurs, l'identification de ces gènes est cruciale car ces mutations sont parfois aussi associées à une prédisposition pour les cancers. Par exemple, certaines mutations dans le gène *FANCM* peuvent prédisposer à une IOP ou à un cancer de l'ovaire ou du sein, à cause d'un défaut de réparation des cassures double brin (34,35).

D. Défaut de réparation d'une cassure double brin – Cancers et infertilité

1. Généralités

Les cassures doubles brins (CDB) sont des lésions de l'ADN pouvant survenir spontanément lorsqu'une fourche de réplication s'effondre ou après exposition à des génotoxiques comme les rayonnements ionisants (36). Les CDB mettent en danger l'intégrité du génome et la survie de la cellule en cas de défaut de réparation. Elles peuvent également entraîner des réarrangements chromosomiques comme des translocations, des inversions ou des variations du nombre de copies en cas de réparations aberrantes. Tous ces mécanismes peuvent être à l'origine d'un processus tumoral.

Les étiologies les plus communes de cancers héréditaires touchent les gènes de réparation de l'ADN, essentiels à la prise en charge des CDB (37).
Cependant, les CDB sont indispensables à certaines recombinaisons physiologiques programmées comme dans la méiose ou dans le développement lymphocytaire afin de synthétiser le type d'immunoglobuline nécessaire.
Les acteurs impliqués dans les processus de réparation des cassures double brin pourraient donc impacter d'une part l'intégrité du génome, et aboutir à un processus de carcinogenèse et d'autre part la méiose et donc altérer la fertilité.

C'est le cas notamment de deux acteurs de réparation de l'ADN que sont *FANCM* et *BRCA2*, intervenant dans la méiose (29).

2. Le gène *FANCM*

FANCM appartient au groupe des gènes *FANC* dont 21 sont connus à ce jour (de *FANCA* à *V*), tous impliqués dans la réparation de l'ADN (avec *BRCA1* et *2*) (34).

L'anémie de Fanconi survient en cas de mutation de *FANCM* (34). C'est un syndrome autosomique récessif d'insuffisance médullaire – entraînant un risque accru de tumeurs et de leucémies aiguës myéloïdes – associé à un défaut de développement. Cette pathologie s'explique par un défaut de réparation de l'ADN conduisant à une instabilité chromosomique. Elle est souvent complétée par un hypogonadisme, une insuffisance ovarienne et une infertilité. Une mutation de *FANCM* peut aussi être à l'origine de cancer du sein familial et de cancer de l'ovaire de haut grade (35).

D'après Fouquet *et al*., le cortex ovarien de souris homozygotes *knock-out* (KO) pour *Fancm* était dépourvu de follicules primaires et le nombre de follicules primordiaux était diminué par rapport à des ovaires de souris sauvages (souris wild-type WT) (34). Il semble alors que ce gène soit associé à un défaut de fertilité dans le modèle murin.

Chez l'homme, par séquençage d'exomes de deux sœurs finlandaises issues d'une famille consanguine présentant une IOP avec caryotype et *FMR1* normaux, une mutation homozygote dans l'exon 20 de *FANCM* donnant une protéine tronquée a été mise en évidence (34). FANCM intervenant au stade pachytène dans la recombinaison méiotique, cette mutation a entraîné un défaut de méiose et ainsi un stock folliculaire diminué. Cependant, l'absence de survenue de l'anémie de Fanconi suggère que ces patientes possèdent une activité résiduelle de *FANCM* nécessaire et suffisante dans la moelle osseuse.

En revanche, la survenue de cassures et réarrangements chromosomiques chez ces patientes était plus importante que chez leur mère hétérozygote. L'hypothèse d'une susceptibilité accrue au processus de carcinogenèse est alors vraisemblable.
Un autre gène impliqué dans la réparation de l'ADN se situe au carrefour entre cancers et infertilité : *BRCA2*.

3. Les gènes *BRCA*

BRCA1 et 2 sont d'autres acteurs de réparation des CDB. Ils sont déjà largement connus dans la littérature comme gènes de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire et ce, dès l'état hétérozygote (38). Des mutations homozygotes de *BRCA2* peuvent également entraîner une anémie de Fanconi (38).

Une étude établit un lien entre mutations des *BRCA*, cancers et vieillissement ovarien (38). Les patientes *BRCA1* muté ayant recours à une préservation de fertilité en raison d'un cancer du sein obtenaient moins d'ovocytes à la ponction. Également, des patientes *BRCA1* ou *2* muté étaient en ménopause plus précocement que des patientes non mutées ; d'autres encore, *BRCA1* mutées, présentaient un taux d'AMH significativement diminué. Les chercheurs ont alors mis en évidence de plusieurs façons qu'avec l'âge, l'expression des gènes de réparation de l'ADN comme *BRCA, MRE11* et *RAD51* diminue. Ce phénomène s'associe à une propension à l'accumulation de CDB, par défaut de prise en charge, et à une diminution plus rapide de la réserve ovarienne.

Oktay *et al.* montrent enfin que le phénotype d'une patiente sera lié à la sévérité de la mutation de *BRCA* : en premier, c'est la fertilité qui est touchée par dysfonction dans la prise en charge des CDB de la méiose, puis surviennent les cancers du sein et de l'ovaire (38). Il existerait donc des seuils de sévérité d'atteinte de *BRCA* qui touchent d'abord la fertilité puis entraînent l'apparition de cancers.
Enfin, le nombre de patientes infertiles et *BRCA* muté est sous-estimé d'après les auteurs, puisque des ovariectomies préventives sont souvent réalisées, ce qui ne permet plus d'évaluer leur fertilité.

Une autre famille consanguine ayant eu un séquençage d'exome pour IOP a présenté une mutation ponctuelle de *BRCA2* différente des mutations identifiées en cancérologie, touchant un acide aminé très conservé dans le domaine d'interaction avec l'ADN simple brin (39). Caburet *et al.* ont alors montré que cette mutation entraîne une activité résiduelle de *BRCA2* insuffisante pour la recombinaison homologue méiotique mais suffisante pour la réparation des cassures mitotiques, prévenant la survenue d'un cancer. Les auteurs indiquent qu'il semble exister différents seuils d'activité de *BRCA2* impactant la fertilité et le risque de cancer.

Il est donc nécessaire de réaliser un diagnostic génétique précis de toutes les IOP pour établir un conseil génétique approprié en cas de désir de grossesse et de risque de transmission d'un gène de prédisposition à un cancer. Il est également possible de proposer une préservation de fertilité des autres femmes mutées de la famille. Enfin, un suivi renforcé pour diagnostiquer plus précocement la survenue de cancers est nécessaire.

Par ailleurs, des valeurs de seuils d'activité résiduelle paraissent essentielles à étudier pour envisager l'impact phénotypique de chaque mutation occasionnée.

FANCM et *BRCA* sont donc des gènes responsables de la prise en charge des CDB et associés à l'infertilité et au cancer.

D'autres gènes semblent également dans ce cas.

4. Autres gènes

D'autres gènes candidats associés à une susceptibilité accrue à l'infertilité et au cancer chez l'homme sont aujourd'hui proposés (37). En effet, Nagirnaja *et al.* ont croisé 531 gènes causant une infertilité chez la souris mâle et ayant un orthologue humain à une liste connue de gènes impliqués dans le cancer. Cela a permis d'isoler 25 gènes établis comme facteurs de progression d'un cancer dont 19 sont des initiateurs et parmi eux, 44% sont des suppresseurs de tumeurs et 32% des oncogènes.

L'équipe de recherche a ensuite caractérisé chacun de ces gènes dans leur rôle dans l'infertilité et dans le cancer. Ainsi, on retrouve parmi eux des gènes impliqués dans la méiose comme *ATM*, responsable de l'ataxie télangiectasie, un trouble prédisposant au cancer et dont un variant a été identifié dans un cas d'azoospermie non obstructive.

BRCA2 est une fois de plus nommé dans les cancers héréditaires du sein et de l'ovaire, et un variant a été associé à une azoospermie et à une oligozoospermie sévère. Le patient infertile, *BRCA2* muté, pourrait donc transmettre un risque de cancer de haut risque à sa fille.

Enfin, on retrouve d'autres gènes de méiose comme *MLH1* dans le syndrome de Lynch, prédisposant à certains cancers et ayant donné une azoospermie non obstructive et une oligozoospermie.

Par ailleurs, des études épidémiologiques ont également montré que les hommes infertiles sont plus à risque de développer un cancer (37). Cette information renforce l'idée d'une association entre infertilité et cancer.

Ainsi, les gènes de réparation de l'ADN et impliqués dans la méiose peuvent avoir un impact considérable lorsqu'ils sont mutés, que ce soit sur la fertilité mais aussi sur le risque tumoral.

La compréhension de ces mécanismes physiopathologiques est essentielle pour mettre en place des stratégies de prévention et de diagnostics plus précis et plus précoces, mais aussi pour une meilleure prise en charge globale des patients.

C'est pourquoi, il est nécessaire de poursuivre la recherche de nouveaux gènes de réparation de l'ADN et impliqués dans la méiose. Parmi eux, on retrouve le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) et notamment la protéine RAD50 sur laquelle ont porté nos recherches.

E. Complexe MRN - RAD50

1. Le complexe MRN

i. Structure et fonction

Le complexe MRN est un dimère constitué de deux sous-unités de MRE11, de RAD50 et de NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome protein 1*) (figure 16).

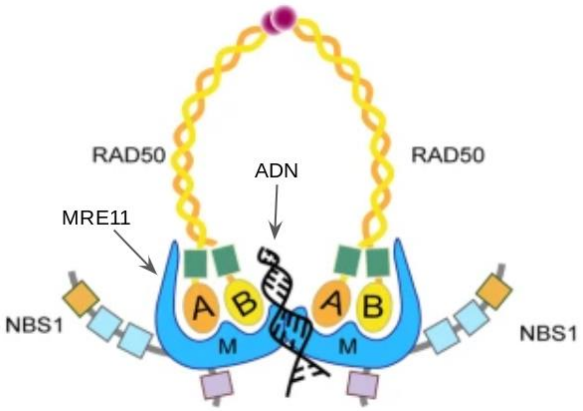


Figure 16 : schéma représentant le complexe MRN, composé d'un dimère de RAD50, MRE11 et NBS1 et sa fixation à l'ADN, adapté de Lavin et al. (40).

Le complexe MRN est très conservé. Il participe au maintien des télomères et à la stabilisation des fourches de réplication. Il joue également un rôle central dans la prise en charge des CDB (40).

Il est présent en quantité constante dans le noyau tout au long du cycle cellulaire et se relocalise rapidement au niveau des CDB. A cet endroit, le complexe MRN entraîne différents mécanismes (41) (figure 17):

- D'une part, il recrute la kinase ATM pour déclencher la signalisation du "DNA damage response" (DDR) en phosphorylant différents acteurs, comme p53, H2AX ou CHK2, ce qui entraîne des points de contrôles du cycle cellulaire, le mettant en pause pour laisser le temps à la cellule de réparer la cassure. En cas de dommages trop importants, seront induites l'apoptose, la sénescence ou l'élimination par le système immunitaire.

- D'autre part, il initie le mécanisme de réparation des CDB : la protéine MRE11 du complexe à activités endo et exonucléasique résèque les deux brins d'ADN afin de générer de courtes extrémités simple brin. Celles-ci sont ensuite prises en charge par d'autres facteurs comme EXO1 qui étend la taille de ces extrémités simple brin. La protéine RPA (protéine de réplication A) repère et se fixe sur ces longues extrémités simple brin ; elle recrute RAD51 qui s'enroule autour, pour procéder à la recherche d'homologie. L'extrémité simple brin peut alors s'intercaler au niveau de sa séquence complémentaire dans le chromosome homologue, lui servant de matrice de réparation. Il s'agit du processus de réparation par recherche d'homologie (RRH), qui n'est possible qu'en phase S ou G2 car il nécessite la présence de la chromatide sœur comme matrice de réparation.

Lorsque d'autres acteurs sont recrutés au niveau de la CDB comme Ku70/80, le processus de NHEJ (*non-homologous end-joining*) est induit (41). Il s'agit d'un mécanisme qui ne nécessite pas de matrice de réparation et qui relie les deux brins d'ADN après la CDB, en délétant ou en insérant un ou plusieurs nucléotides (insertions/délétions, indels), pour créer une microhomologie de séquence. Dans la majorité des cas, le décalage du cadre de lecture ainsi occasionné entraîne le KO du gène.

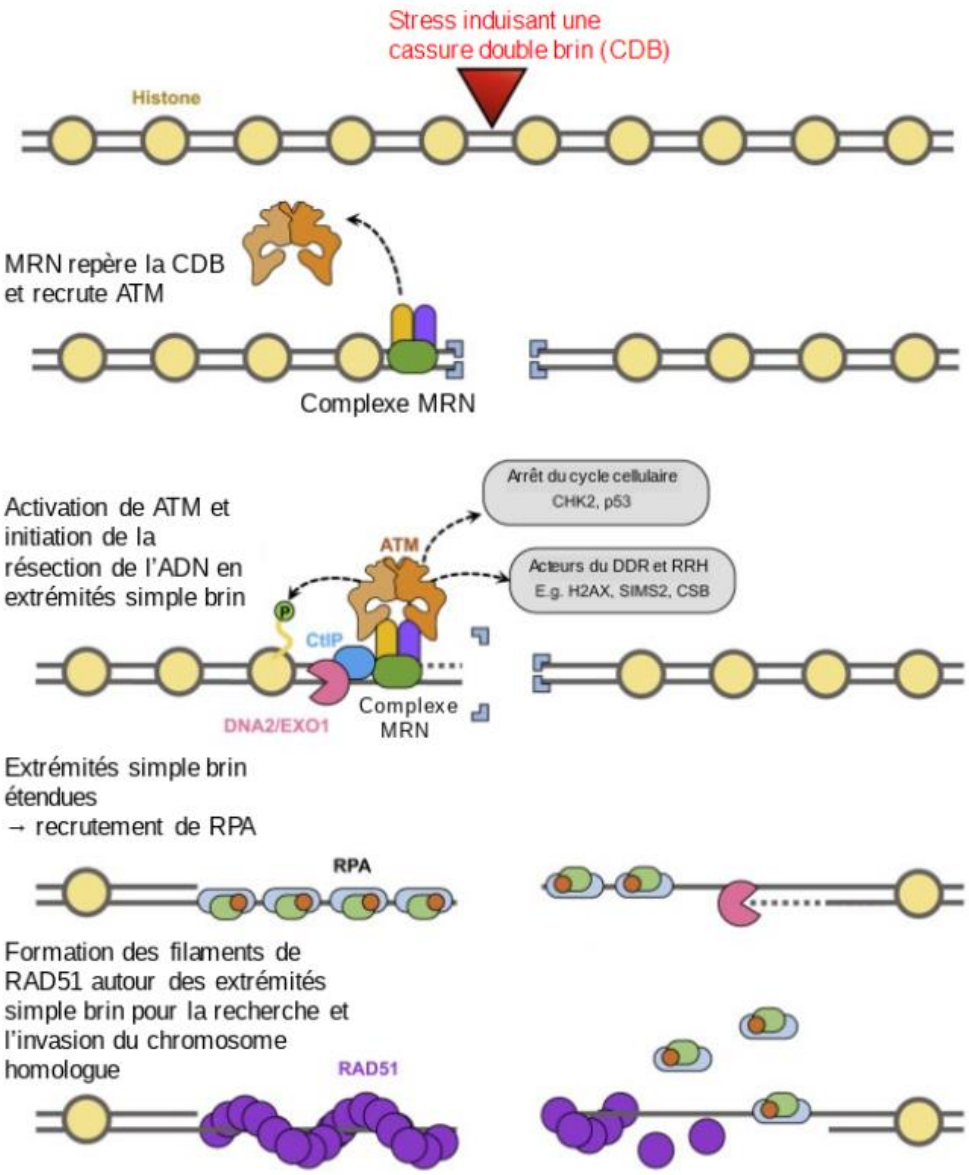


Figure 17 : Schéma représentant les différentes étapes induites par la formation d'une CDB d'après Williams et al. (42). *→ signifie "entraîne"*

Dans les cellules germinales en méiose, les cassures doubles brins provoquées au leptotène par SPO11, une topoisomérase, sont indispensables à la disjonction adéquate des chromosomes homologues et au brassage génétique intergénérationnel (23). Le complexe MRN intervient au stade leptotène pour les prendre en charge. Il les repère et MRE11 entraîne la résection 5'3' des deux brins. Les acteurs de la RRH EXO1, RPA et RAD51 interviennent de la même façon pour induire une recherche d'homologie sur le chromosome homologue. Une fois les séquences complémentaires appariées, survient la formation des *crossing-over*. Certains locus ne sont pas disposés aux *crossing-over* et le complexe MRN entraîne la voie de la recombinaison homologue.

Par son rôle dans la prise en charge des cassures doubles brins, le complexe MRN a déjà été identifié en cancérologie.

ii. Implication dans le cancer

Chez l'homme, des mutations hypomorphiques, c'est-à-dire donnant lieu à un produit moins exprimé ou moins actif, de chacun des trois membres du complexe MRN sont associées à une instabilité génomique (41).

Par exemple, des mutations dans *MRE11* sont responsables de l'*Ataxie Télangiectasie-Like Disorder* (ATLD) et dans NBS1 du *Nijmegen Breakage Syndrome*. Ces deux pathologies sont autosomiques récessives et associées à une immunodépression, une instabilité génomique et une prédisposition au cancer (41).

Ces deux gènes ont également été étudiés dans la fertilité.

iii. Implication dans la fertilité et modèles animaux

Chez la souris, une équipe a étudié l'impact sur la méiose de mutations hypomorphiques de *Mre11* et *Nbs1* (43). La temporalité de la prophase était altérée et la synapse entre les chromosomes homologues était aberrante et incomplète. Enfin, MLH1, un marqueur de *crossing-over*, n'était présent ni en quantité suffisante, ni au bon endroit. Des défauts ont été retrouvés dans la formation du complexe synaptonémal et dans la réparation des CDB. Le nombre de *crossing-over* était augmenté chez les mâles et diminué chez les femelles. L'article ne mentionne cependant pas l'impact de ces mutations sur la fertilité.

Theunissen *et al.* ont étudié la fertilité de souris de génotype homozygote $Mre11^{ATLD1}$, où *ATLD1* est un allèle hypomorphique (44). Les mâles étaient fertiles contrairement aux femelles. En effet, les accouplements intégrant une femelle homozygote mutée ne donnaient pas de petits ou rarement une portée de un à deux souriceaux, quel que soit le génotype des mâles. Bien qu'elles aient produit des blastocystes en nombre normal, la plupart des homozygotes mutants n'arrivaient pas à éclore.

Deux autres équipes de recherche ont montré que des souris portant une mutation homozygote hypomorphe dans *Mre11* présentaient des défauts de réparation des CDB, de formation des *crossing-over*, et donc de synthèse des cellules germinales mâles (45,46). Les auteurs suggèrent alors que MRE11 joue un rôle important dans la spermatogenèse et notamment dans la réparation des CDB dans les spermatocytes.

Zhang B *et al.* a établi un KO conditionnel de *Nbs1* limité aux testicules et qui a rendu les mâles infertiles (47). En effet, aucun spermatozoïde n'a été retrouvé dans les épididymes, la taille et le poids des testicules et le nombre de petits par mâles étaient significativement réduits. Chez les souris adultes, aucune cellule haploïde n'a été retrouvée dans les tubes séminifères, atrophiés à l'étude histologique, et le nombre de cellules apoptotiques était significativement augmenté. D'après les auteurs, cela suggère un arrêt dans la progression de la méiose. Les femelles n'ont pas été impactées par ce KO conditionnel car la recombinase utilisée est induite alors que la méiose est déjà initiée dans les ovocytes, après la liaison de Spo11 aux CDB, Nbs1 ayant alors déjà intervenu. Chez les mâles, la recombinase intervient avant la prophase méiotique et donc avant induction de Nbs1.

Ainsi, la fertilité des souris semble être altérée par des modifications impactant Mre11 et Nbs1, et chez l'homme *NBS1* et *MRE11* ont déjà été identifiés comme responsables d'IOP (23). Ils ont donc rejoint le panel des gènes séquencés en cas d'IOP inexpliquée par le bilan de 1ère intention.

RAD50, le dernier représentant du complexe MRN, semble lui aussi être un gène intéressant à étudier dans le cancer et la fertilité.

2. Focus sur RAD50

i. Structure et fonction

RAD50 est un gène situé sur le chromosome 5 chez l'homme et sur le chromosome 11 chez la souris ; il est constitué de 25 exons. RAD50 appartient à la famille très conservée des protéines de maintien de la structure des chromosomes, comme les cohésines par exemple (48).

RAD50 se compose de quatre parties (figure 18) :

- Le domaine ATPase : l'hydrolyse de l'ATP en ADP permet à MRE11 d'être actif ;
- Le domaine de liaison à MRE11 ;
- Le domaine de bobine enroulée, une structure en heptamère d'acides aminés, assurant la liaison à l'ADN et le maintien de la conformation 3D du complexe MRN ;
- Le domaine crochet permettant la dimérisation Zn^{2+} dépendante du complexe MRN

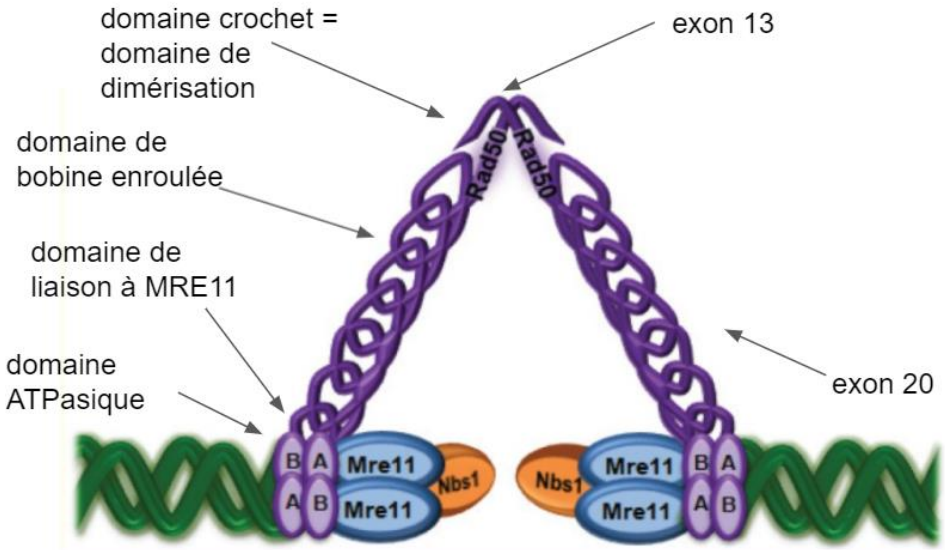


Figure 18 : schéma représentant le complexe MRN et la disposition de ses sous-unités MRE11, NBS1 et RAD50, sa dimérisation et sa fixation à l'ADN, adapté de Lavin et al. (40). Sont également représentés les différents domaines de RAD50 et les exons d'intérêt dans ce travail de thèse.

Identifié comme une sous-unité du complexe MRN, RAD50 intervient dans l'activation de points de contrôles du cycle cellulaire, dans le maintien des télomères et dans la détection des CDB (48).

Au cours de la méiose, il se relocalise au sein du complexe MRN au niveau des CDB. Il permet l'activation de la signalisation à l'origine de la recombinaison homologue et des *crossing over*, indispensables à la formation de gamètes de bonne qualité.

C'est une protéine essentielle car son absence est létale chez la souris mais également pour des cellules souches embryonnaires en culture et pour des embryons en développement précoce (49,50). En effet, Luo *et al.* ont montré chez la souris que les embryons homozygotes KO pour *Rad50* ne donnaient pas lieu à une naissance (49). A 5,5 jours de développement, les embryons mutants ne présentaient pas de différences par rapport au contrôle, mais à 6 jours, leur endoderme et ectoderme étaient anormaux. Le marquage au BrdU, reflétant la prolifération cellulaire, était diminué à cette étape de développement par rapport aux embryons contrôles. C'est à 7,5 jours que les embryons homozygotes KO décédaient (49).

De par son rôle dans la prise en charge des cassures doubles brins, il semble donc intéressant d'étudier le potentiel d'implication de RAD50 dans l'infertilité et dans le cancer.

ii. Implication dans le cancer

Des mutations homozygotes dans le domaine crochet de Rad50 ont induit une tumorigenèse hépatique chez la souris (50). Par ailleurs, Roset *et al* ont également indiqué que lorsque *Rad50* comporte une mutation biallélique, le défaut de réparation des CDB occasionnées peut aboutir à la formation de mutations et de dommages chromosomiques pouvant donner lieu au processus de carcinogenèse (50).

Chez l'homme, des mutations somatiques de *RAD50* ont été identifiées dans certains cancers comme dans le lymphome de Burkitt ou dans le cancer de l'ovaire (41). Ces résultats ont été présentés dans une revue de la littérature dont les auteurs suggèrent que cela met en évidence le rôle suppresseur de tumeur de RAD50.

A ce jour, seulement trois patients avec mutation biallélique de *RAD50* ont été identifiés.

iii. Implication dans la fertilité

1. Modèles animaux

Concernant *Rad50*, plusieurs équipes de recherche ont étudié l'impact de mutation sur la fertilité chez la souris.

Une première équipe de recherche a induit une mutation dans le domaine de liaison à l'ADN de *Rad50* (50), donnant l'allèle 46. L'affinité pour l'ADN et l'efficacité de la dimérisation du complexe MRN étaient alors altérées. On retrouvait chez ces souris une hydrocéphalie, une tumorigenèse hépatique et un défaut d'hématopoïèse. Par ailleurs, les mutantes avaient une fertilité très altérée : tous les mâles étaient stériles et 27% des femelles étaient infertiles; les 73% restantes présentaient une baisse de taille et du nombre de portées.
Par ailleurs, l'équipe de recherche a observé une diminution de la taille des gonades, du nombre de follicules dans les ovaires et une atrophie des tubes séminifères (figure 19). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la mutation induite entraîne un défaut de signalisation entre le complexe MRN et la protéine ATM, essentielle au maintien des cellules souches dans la moelle osseuse et des spermatogonies dans les gonades.

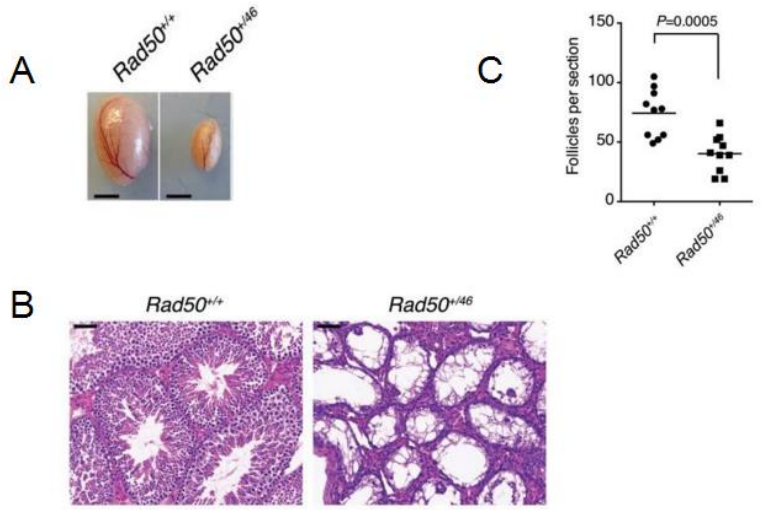


Figure 19 : A : photo des testicules d'une souris WT (à gauche) et d'une souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite), B : photos prises au microscope électronique d'une coloration à l'hématoxyline-éosine de tubes séminifères d'une souris WT (à gauche) et d'une souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite) et C : nombre de follicules par section de coupe histologique entre des souris WT (à gauche) et des souris hétérozygote Rad50$^{+/46}$ (à droite) (50).

Bender *et al.* ont mis en place un modèle de souris de génotype S/S, où S est un allèle hypomorphe (51). Les souris homozygotes ainsi obtenues présentaient un défaut de croissance, une prédisposition aux cancers, une aplasie médullaire et une diminution des spermatogonies ; ce génotype était partiellement létal pour l'embryon. Ni le processus de réparation de l'ADN ni les points de contrôles initiés par le complexe MRN étaient impactés par la mutation de *Rad50*. Par contre, une instabilité chromosomique et un stress génotoxique chromosomique accrus étaient à l'origine d'un excès d'apoptose, p53 dépendant, expliquant le défaut par attrition des cellules souches hématopoïétiques et des spermatogonies. Les mâles présentaient donc une diminution de cellules germinales dans leurs tubes séminifères à quatre semaines. Ils étaient cependant fertiles, de même que les femelles dont les ovaires étaient normaux. En réalisant un KO de p53, le gardien du génome induisant la mort cellulaire en cas de dommages trop importants pour une cellule, l'équipe de recherche a observé une diminution de l'apoptose cellulaire. Par contre, la tumorigenèse a augmenté puisque p53 n'a pas pu limiter la présence de cellules en stress génotoxique en induisant leur mort.

Par ailleurs, dans une lignée de spermatocytes de souris immortalisés et bloqués au stade pachytène, l'utilisation d'un siRNA ciblant *Rad50* a permis d'observer une diminution de la prolifération cellulaire et un excès d'apoptose (46).

Ces études vont dans le sens d'une implication de Rad50 dans l'infertilité chez la souris ; elle reste alors à explorer chez l'homme.

2. Chez l'Homme

Chez l'Homme, seulement deux publications associent une diminution de l'expression de *RAD50* à un défaut de spermatogenèse (45,46). En effet, les équipes de recherches ont comparé l'expression de *RAD50* entre des azoospermies obstructives et non obstructives par arrêt de maturation. Ainsi, le taux d'ARN (acide ribonucléique) messager (ARNm) de *RAD50* était diminué dans les tubes séminifères des patients avec une spermatogenèse altérée.

Cependant, il semble difficile de savoir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence du trouble : on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'expression diminuée de RAD50 dans les tubes séminifères vient de la diminution de la cellularité germinale des patients avec azoospermie non obstructive.

iv. Patients avec mutations bialléliques de *RAD50*

A ce jour, seulement deux patientes ont été identifiées comme présentant une mutation biallélique de *RAD50* (52,53).

La première patiente est une allemande de 23 ans qui présente un syndrome ressemblant au *Nijmegen breakage syndrome* (NBS-like) (52). Cliniquement, on retrouve chez cette patiente une microcéphalie, un retard de croissance, une instabilité chromosomique avec notamment une translocation (7;14), une hypersensibilité à l'irradiation et un taux d'immunoglobulines dans les valeurs de référence. La puberté et le développement des caractères sexuels secondaires sont normaux.
Le séquençage de *RAD50* chez la patiente a donné un génotype hétérozygote composite. Un allèle est muté dans l'exon 21, aboutissant à un codon stop prématuré, hérité de la mère. L'autre allèle, hérité du père, est muté dans l'exon 25, supprimant le codon stop et donnant une protéine avec 66 acides aminés supplémentaires, moins stable et prédominante. L'activité résiduelle de RAD50 a été évaluée à moins de 5%. Après irradiation à 5 Gy des fibroblastes de la patiente, l'équipe de recherche n'a pas observé de recrutement de RAD50 ni de phosphorylation des acteurs en aval, comme p53, SMC1 et ATM.

La deuxième patiente est issue d'une famille turque consanguine (53). Elle a quinze ans au moment de l'étude. Elle a été diagnostiquée avec une mutation homozygote aboutissant à la suppression de l'exon 15 de *RAD50*. Cliniquement, on retrouve chez la patiente une hypothyroïdie, une petite taille et une surdité. Son taux d'immunoglobuline est dans les valeurs de référence. La puberté et le développement des caractères sexuels secondaires sont normaux. Elle ne présente pas d'instabilité génétique mais des cancers du côlon et du poumon sont apparus dans sa famille. L'équipe de recherche a récupéré des fibroblastes de la patiente et a montré que leur irradiation n'a pas entraîné de recrutement ni d'activation par phosphorylation d'ATM. Cette technique permet de modéliser la survenue de cassures doubles brins, normalement prises en charge par le complexe MRN et ATM dans une cellule WT. Ici, les CDB de la patiente ne sont pas correctement réparées puisque ATM n'est pas activé.

Ces deux patientes présentent des symptômes semblant venir de l'accumulation de dommages de l'ADN, qui affectent particulièrement les tissus à forte prolifération et entraînent une attrition dans ce contexte (25).
La fertilité de ces patientes n'a pas pu être étudiée mais il serait intéressant de l'explorer.

Récemment, une équipe parisienne a décrit chez un patient turc de 12 ans, appelé ici patient P1, une mutation biallélique de *RAD50* associée à un déficit immunitaire, un retard de développement, une insuffisance médullaire, une pigmentation de la peau et une microcéphalie (48).

Les mutations bialléliques consistent en (figure 20):

- Un allèle nul (KO) hérité de sa mère : une insertion nucléotidique ayant conduit à un codon stop prématuré dans le domaine crochet dans l'exon 13 ;
- Un allèle *knock-in* (KI) : une délétion *de novo* de 3 nucléotides (GAA) codant pour un acide glutamique en position 1035 (E1035) dans l'exon 20, ce qui perturbe la structure en heptamères d'acide aminé du domaine en bobine enroulée

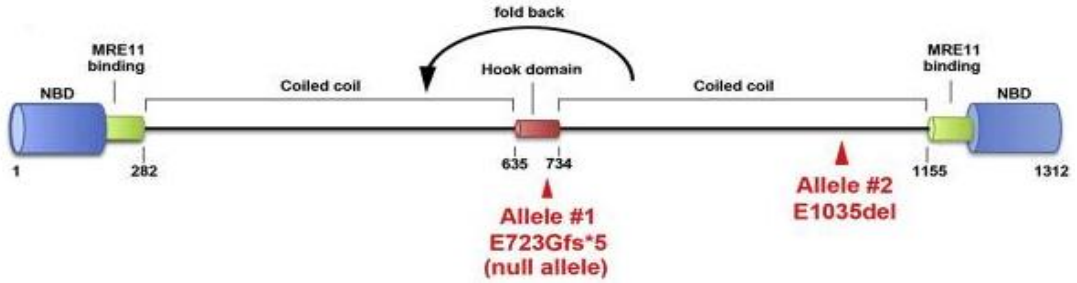


Figure 20 : schéma représentant les domaines de RAD50 et les deux mutations du patient P1 (48). *On retrouve l'allèle nul hérité de la mère dans le "hook domain" (domaine crochet) et la délétion de novo en position 1035 dans le domaine de bobine enroulée (coiled coil).*

La mère du patient (génotype KO/WT) avait un phénotype normal tout en ayant 50% d'activité de *RAD50,* en termes d'ARNm et de protéine. Or, le patient possède le même taux d'expression de *RAD50*. Cela suggère que son allèle KI est hypomorphe puisqu'il est transcrit en un ARNm stable, mais qui code pour une protéine fonctionnellement altérée, aboutissant aux caractéristiques phénotypiques du patient. Elle conserve cependant une activité résiduelle puisque l'absence totale de RAD50 est létale, comme démontré chez la souris (25,27). En effet, l'étude de cette mutation permet de conclure que seule la signalisation du DDR, dépendante de la protéine ATM, reste fonctionnelle. Le mécanisme de RRH est quant à lui défectueux par un défaut d'activité nucléasique de MRE11. Comme c'est la voie de réparation des CDB à l'origine des *crossing-over* indispensables à la méiose, on peut supposer que l'impact sur les cellules germinales sera majeur.

Ce patient étant trop jeune, il n'était pas possible d'étudier sa fertilité. Cependant, l'équipe de recherche de l'institut Imagine - DGSI (*genome and immune system dynamics lab*) ayant décrit ce patient a développé un modèle murin de même génotype. Ces souris ont présenté des difficultés pour se reproduire. Il semble alors intéressant d'étudier la fertilité de ces souris et de mieux comprendre la mécanistique de RAD50 dans des cellules humaines.

Au total, en fonction du domaine impacté de RAD50, des effets différentiels ont été obtenus sur la fertilité et le risque de survenue de cancers. Cela s'explique par une altération hétérogène des domaines et fonctions de RAD50 sur l'apoptose, la voie du DDR, la RRH et le cycle cellulaire (figure 21).

Modèle d'étude	Impact sur RAD50	Fertilité	Apoptose	DDR	RRH	Cycle cellulaire
Souris RAD50 S/S **(51)**	S est un allèle hypomorphe	Femelles : fertiles, ovaires normaux Mâles : développement testiculaire normal, ↘ cellules dans TS à 4 semaines par stress génotoxique chronique	OUI : stress génotoxique sur les chromosomes → instabilité génique et excès d'apoptose p53-dépendante → ↘ des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et des spermatogonies KOp53 : ↘ apoptose et ↗ tumorigenèse	Normal	Normale Pas de défaut de méiose	
Souris RAD50 +/46 **(50)**	46 est un allèle muté dans le domaine crochet → allèle hypermorphe	Mâles infertiles : ↘ cellules en méiose dans les TS dépendante d' ATM (KO ATM : ↗ des cellules) → pas de blocage en méiose car technique d'étalement des chromosomes normale MAIS blocage dans la différenciation Femelles : 27% infertiles + 73% : ↘ petits et portées ↘ follicules + atrophie	NON	Activation chronique du DDR et donc de ATM : ↗ γH2AX ↗ phosphorylation de ATM Signalisation ATM- complexe MRN altérée : perturbation dans le maintien des cellules souches dans la moelle osseuse et la gonade	Moins efficace mais ce n'est pas significatif	
Patient P1 **(48)**	génotype KI/KO			ATM normal Liaison à l'ATP normale	Défaut dans l'activité exonucléasique de MRE11 ↘ liaison ADN Défaut de réparation de l'ADN	Normal
Cellules RAD m1/m1 **(49)**	KO total		NON : ↘ prolifération car ↘ BrdU quand KO total			
Patiente de 15 ans **(53)**	Homozygote mutée dans l'exon 15			Pas d'activation de ATM : pas de phosphorylation en aval		
Patiente de 23 ans **(52)**	Hétérozygote composite doublement mutée dans les exons 21 et 25 : activité résiduelle <5% *NBS-like syndrome*			↘ phosphorylation de p53, SMC1 et ATM Hypersensibilité à l'irradiation	↘ MRE11, NBS1	Défaut de réparation des CDB →accumulation en phase G2 par défaut dans les points de contrôle en phases G1/S Sauvetage génique par apport de RAD WT
RAD50 **(55)**	Mutations dans les domaines de liaison à l'ATP de RAD50			Domaines tous nécessaires pour hydrolyser ATP		
GC-2spd(ts) **(46)**	siRNA contre *Rad50*		OUI → prolifération cellulaire ↘		↘ MRE11	

Figure 21 : Tableau présentant une revue de la littérature sur les différentes façons de moduler l'expression de RAD50 et leur impact fonctionnel. *↑ signifie augmentation, ↓ signifie diminution et → signifie « entraîne ».*

L'objectif de mon travail est donc d'étudier l'impact de modulations de l'expression de *RAD50* sur la fertilité mâle dans le modèle murin et sur la prise en charge d'une cassure double brin modélisée par CRISPR-Cas9 dans des cellules humaines.

Pour cela, nous évaluerons dans une première partie la fertilité de modèles murins présentant différents génotypes pour *RAD50*. Dans une seconde partie, nous étudierons la prise en charge de cassures doubles brins induites *in vitro*, mimant celles de la méiose, dans des fibroblastes humains dont l'expression de *RAD50* est modulée. Nous pourrons donc observer l'impact de ce stress sur la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et la mort cellulaire.

II. Matériels et méthodes

A. Etude *in vivo* du rôle de Rad50 dans l'infertilité murine

1. Les modèles murins

Au travers d'une collaboration avec l'institut Imagine - DGSI (*genome and immune system dynamics lab*), l'examen des testicules de souris d'intérêt a permis de connaître l'impact phénotypique de différents génotypes pour *Rad50* : WT/WT, KO/WT, KI/WT, KI/KO et KI/KI.

Le KI correspond à l'allèle *knock-in* mimant la mutation du patient P1, présenté plus haut (Cf. supra) : la délétion de 3 nucléotides (GAA) dans l'exon 20 entraîne la délétion de l'acide glutamique en position 1035 (E1035).

Le KO correspond à l'allèle *knock-out* de *Rad50* par ajout d'un nucléotide, entraînant un décalage dans le cadre de lecture et l'arrivée d'un codon stop prématuré.

2. Mise en reproduction

Dans un premier temps, les souris des génotypes KI/KI ont été mises en reproduction pendant 4 mois avec des souris WT. En parallèle, des mâles et femelles WT ont également été accouplés, afin d'avoir un contrôle pour étudier par comparaison la reproduction des souris mutantes.

Malheureusement, aucun accouplement pour les souris KO/KI n'a pu être testé du fait de la pénurie de souris vivantes de ce génotype au moment de l'expérimentation.

Le nombre de portées a été comparé aux souris contrôles pour observer l'impact de la mutation E1035 à l'état homozygote sur la fertilité des souris.

3. Dissection de l'épididyme et étude histologique

Les testicules et épididymes ont été prélevés après euthanasie des souris mutantes et WT âgées de 2 à 3 mois et de 5 et 6 mois. Ils ont été inclus en paraffine puis coupés et colorés à l'hématoxyline-éosine. La lecture a été effectuée au microscope optique aux grossissements x5, x10, x20 et x40.

B. Etude *in vitro* de l'impact de la modulation de RAD50 dans des cellules humaines

1. Culture cellulaire de fibroblastes humains (hFF)

Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des fibroblastes humains de peau immortalisés (hFF, *human foreskin fibroblasts*). Ces cellules ont été mises en culture dans un milieu minimum essentiel de Eagle modifié Dulbecco (DMEM Gibco□) à 4,5g/L de D-glucose enrichi en sérum de veau fœtal (20%) Eurobio□, et en glutamax Gibco□ à 100X, en pénicilline-streptomycine Eurobio□ à 100 U/mL (antibiotique et antifongique), en amphotéricine B Sigma□ à 0,5µg/mL (antifongique), en ciprofloxacine Biogaran□ à 10µg/mL (antibiotique) et en acides aminés Gibco□ à 100X.

Elles ont été diluées régulièrement à l'approche de la confluence, grâce à l'action enzymatique de la trypsine Gibco□ à 0,25% après lavage au Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS Gibco□).

2. Modulation de l'expression de *RAD50*

L'expression de *RAD50* a ensuite été modulée dans ces hFF par différentes approches.

i. Surexpression de RAD50

RAD50 peut être surexprimé par approche lentivirale. Le lentivirus est un vecteur efficace pour apporter un gène d'intérêt dans les cellules cibles.

Pour ce faire, des bactéries (souche de E. Coli) contenant des plasmides qui expriment *RAD50* ont été commandées sur Addgene□ (référence du plasmide : #116784). Elles ont été étalées sur gélose à l'ampicilline – le plasmide contenant un gène de résistance à cet antibiotique (figure 22).
Une colonie bactérienne a été amplifiée ; le plasmide a été récupéré par lyse alcaline et transduit dans des cellules HEK (*human embryonic kidney*). Ces cellules servent d'usine de production du lentivirus qui contient la séquence comprise entre les deux LTR (l*ong terminal repeats*) et d'autres protéines indispensables pour la transduction future. Parmi ces dernières, on retrouve notamment des protéines d'enveloppe, nécessaires à la structure du lentivirus, et l'intégrase permettant à la séquence d'intérêt de s'insérer dans le génome de la cellule transduite.
1,16 x10^8 particules lentivirales/mL contenant le transgène *RAD50* sous la dépendance d'un promoteur fort et ubiquitaire (EF1alpha) ont été produites par la plateforme de vectorologie Vectub' de l'unité 1035 de l'INSERM de Bordeaux.

Des fibroblastes humains ont été transduits à une *multiplicity of infection* (MOI) 30, ce qui signifie que l'on utilise 30 particules virales par cellule, en déposant 22µL de préparation lentivirale dans un millilitre de milieu de culture.
Grâce à la présence dans le vecteur d'un gène de résistance à la puromycine (*puroR*) (figure 22), les cellules ayant intégré le transgène ont été sélectionnées par l'ajout de 1µL de l'antibiotique à 1µg/mL dans le milieu de culture, 72h après la transduction.
La pression de sélection a été maintenue en ajoutant de la puromycine une fois par semaine pendant 4h.

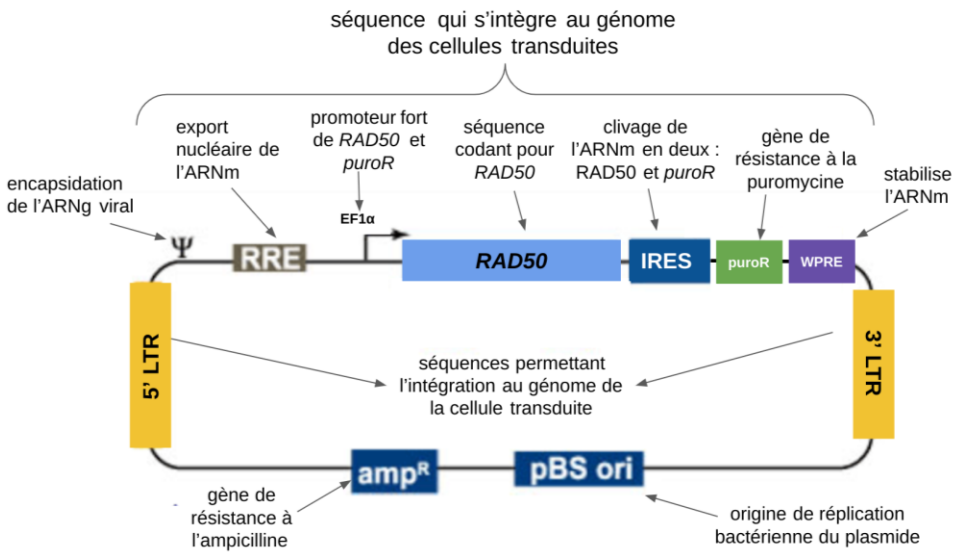


Figure 22 : Carte simplifiée du vecteur de surexpression de RAD50 : *la séquence contenue entre les deux LTR (long terminal repeats) s'intègre dans le génome de la cellule transduite et code pour un seul ARNm comprenant RAD50, IRES (Internal ribosome entry site) et puroR sous la dépendance du promoteur EF1alpha. Cet ARNm est clivé en deux grâce à la séquence IRES. RRE (élément de réponse à Rev) permet ensuite l'export nucléaire du transcrit et WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) le stabilise. Les séquences ampR et pBS ori servent à la production par amplification bactérienne du plasmide : pBS ori permet d'initier la réplication du plasmide et ampR à sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide sur gélose à l'ampicilline.*

Pour mesurer l'efficacité de cette transduction, nous avons contrôlé la surexpression en quantifiant l'ARNm de *RAD50* dans nos cellules transduites ou non par RT-qPCR (PCR quantitative après rétrotranscription). Les séquences des amorces sens et anti-sens (annexe 1) ont été designées grâce à Ensembl□ et Primer blast tool□ puis commandées sur Eurogentec□ pour cibler une séquence de 212 paires de bases (pb) du transcrit de *RAD50* flanquant les exons 3 et 4.

Pour réaliser la RT-qPCR, les ARN totaux ont été extraits des culots cellulaires utilisant le kit et le protocole Nucleospin□ *RNA isolation*. La concentration en ARN a été mesurée à 260nm et la pureté vérifiée par le rapport de l'absorbance à 260 sur l'absorbance à 280nm. Les extraits d'ARN ont ensuite été mis en contact avec un mix réalisé avec les composants du kit *applied biosystems* de Thermo Fisher□ contenant des dNTP (désoxyribonucléotides) à 100mM, des *random primers* à 10X, une transcriptase inverse à 50 U/µL et un tampon pour RT-qPCR à 10X. Le tout, afin de procéder à la transcription inverse selon le programme suivant :

- 25° pendant 10 minutes
- 37° sur 120 minutes
- 85° pendant 5 minutes

Les ARN rétrotranscrits en ADNc ont été déposés dans une plaque de qPCR en présence d'un *Master mix* à 2X Promega□ – comprenant l'agent intercalant fluorescent et la polymérase Taq – et des amorces à 5µM designées pour *RAD50* mais aussi pour deux gènes de ménage que sont la *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* et le *TATA box binding protein (TBP)*. Ces deux gènes servent de contrôle interne puisqu'ils ne sont pas impactés dans les cellules d'intérêts et permettent de normaliser la quantité d'ADNc de *RAD50* amplifiée dans chaque condition. Les séquences utilisées pour les deux gènes de ménage lors de la qPCR sont disponibles dans l'annexe 1.

La plaque de RT-qPCR est ensuite déposée dans un thermocycleur avec le programme suivant :

- 95° pendant deux minutes
- 44 cycles de :
    - 30 secondes à 95° pour la dénaturation
    - 1 minute à 62° pour l'annealing
- Augmentation d'un degré toutes les cinq secondes entre 65 et 95°

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de cycles (CT) nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence défini qui correspond à une détection significative de l'ADNc recherché.
On peut comparer ensuite les CT entre eux par la formule $2^{-(\Delta Ct2 - \Delta Ct1)}$. Le ΔCt1 correspond à la différence entre le CT de *RAD50* et celui d'un des deux gènes de ménage dans une condition expérience. Quant au ΔCt2, il correspond à la différence entre le CT de *RAD50* et celui d'un des deux gènes de ménage dans une condition contrôle. On évalue alors l'expression de *RAD50* dans les différentes conditions expérimentales par rapport au WT.

ii. Diminution de l'expression de RAD50

1. Par approche lentivirale par shRNA

L'expression de *RAD50* a ensuite été diminuée par deux approches : par shRNA et par invalidation de *RAD50*.

Un shRNA (*short RNA*) est une petite séquence d'ARN qui s'intègre au génome de la cellule transduite et qui permet de déstabiliser constamment son ARNm cible pour inhiber sa traduction. Il induit donc un *knock-down* du gène ciblé : celui-ci reste exprimé mais de façon bien moindre en fonction de l'efficacité du shRNA.

Deux shRNA ciblant *RAD50* ont été produits (toujours par la plateforme Vect'ub) en utilisant deux séquences sélectionnées en fonction de leur efficacité sur Sigma (figure 23) (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/genes/RAD50?lang=fr&region=FR) :

- shRNA 1 : 84% d'efficacité selon Sigma avec un titre à $6,5 \times 10^7$ particules virales/mL
5' CCGGCGCCTAAAGAACGACATAGAACTCGAGTTCTATGTCGTTCTTTAGGCGTTTTTG 3'

- shRNA 2 : 74% d'efficacité selon Sigma avec un titre à $3,98 \times 10^7$ particules virales/mL
5' CCGGTCCATTGAAGAATCGTCTAAACTCGAGTTTAGACGATTCTTCAATGGATTTTTG 3'

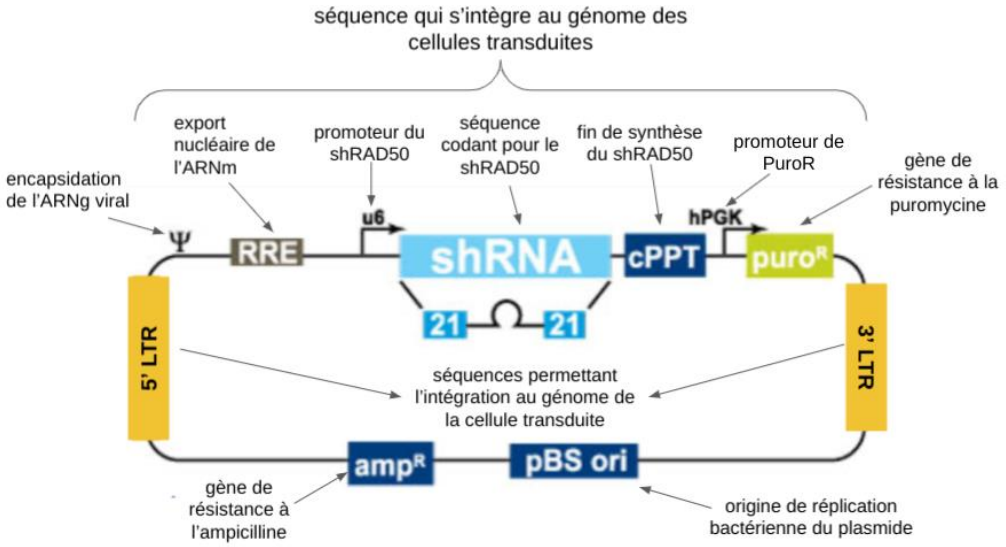


Figure 23 : Carte simplifiée du vecteur d'expression du shRNA dirigé contre RAD50 : *la séquence contenue entre les deux LTR s'intègre dans le génome de la cellule transduite et code pour un shRNA ciblant RAD50 sous la dépendance du promoteur u6 et pour un gène de résistance à la puromycine. La région cPPT (central polypurine tract-central termination sequence) permet de finaliser la synthèse du shRNA et RRE servira à son export nucléaire.*

50 000 cellules ont été transduites à une MOI 30 par dépôt de 23µL du sh1 et 38µL du sh2 dans un millilitre de milieu de culture. Les cellules ayant intégré le transgène ont été, là encore, sélectionnées par la puromycine grâce à la présence du gène de résistance à cette drogue.

L'utilisation concomitante d'un shRNA *scramble*, ciblant une région non spécifique (séquence 5' CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG 3'), servira de contrôle pour comparer les valeurs obtenues avec les deux shRNA anti-*RAD50*.
En effet, la transduction lentivirale d'un shRNA peut avoir différents impacts délétères pour la cellule. Par son homologie de structure avec les miARN, il entre en compétition dans leur processus d'export du noyau. Par ailleurs, le shRNA peut avoir des effets *off-target* graves en s'intégrant dans le génome. Il a également été produit par la plateforme Vect'ub à un titre de $5{,}51 \times 10^7$ particules virales/mL. 27µL de cette préparation permettent alors de transduire 50 000 fibroblastes à une MOI 30.

L'impact des shRNA 1 et 2 dirigés contre *RAD50* et du shRNA *scramble* a été mesuré par RT-qPCR comme décrit dans le paragraphe précédent.

2. Par CRISPR-Cas9 au locus *RAD50*

a. Induction d'un knock-out

La deuxième approche de diminution de l'expression de *RAD50* a reposé sur l'obtention de différents génotypes par invalidation ou modification du gène au niveau de l'exon 20, locus de la mutation d'intérêt du patient P1.

Le premier génotype souhaité était un homozygote KO afin de connaître l'impact d'une absence totale d'expression du gène.

Pour cela, les hFF ont été transfectées par nucléofection avec un complexe ribonucléoprotéique CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)* pour invalider *RAD50* (figure 24).

Cette technique nécessite un guide ARN (sgRNA) qui s'hybride à l'ADN cible par complémentarité de séquence (54) (figure 24). Ce guide comporte un cr-ARN (*CRISPR-ARN*) – designé grâce au logiciel CRISPOR□ pour cibler l'exon 20, au niveau de la mutation KI du patient P1 et qui reconnaît la séquence cible. Le guide contient également un tracr-ARN (*transactivating* ARN), une séquence universelle en épingle à cheveux.

Le guide à 100µM est reconstitué en déposant chacun des constituants à 200µM dans un tube PCR de 5µL, plongé dans un bain marie à 95° pour les annihiler. On prépare le complexe ribonucléoprotéique (RNP) en ajoutant 1,2µL de guide à 2,1µL de DPBS Gibco□ et 1,7µL de Cas9 (*CRISPR associated protein 9)* (IDT□), nucléase provenant du *Streptococcus pyogenes* Cas9, qui établit son activité endonucléasique au niveau de deux sites : HNH et RuvC.

Le complexe ribonucléoprotéique obtenu est mis en contact avec 200 000 hFF avant de procéder à l'électroporation grâce au kit et à l'appareil Nucleofector 4D Lonza□. La transfection par CRISPR-Cas9 entraîne une CDB dans le gène de *RAD50* qui sera réparée par la voie du NHEJ, ce qui induit des indels. Si le cadre de lecture est perturbé, les indels peuvent invalider le gène, en cas de codon stop prématuré ou de modification altérant la stabilité et aboutissant à la dégradation de l'ARNm ou de la protéine ainsi produits.

Par cette technique, il est en théorie possible d'obtenir les génotypes KO/WT et KO/KO selon que les deux allèles sont modifiés ou non.

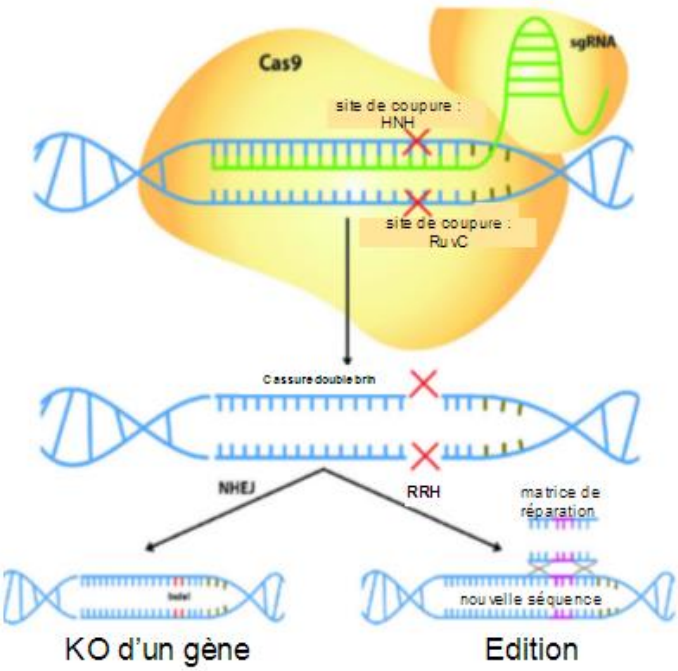


Figure 24 : Schéma d'après Jiang et al. (54) présentant le mécanisme d'action de CRISPR-Cas9 : *le guide ARN (sgRNA) s'apparie à la séquence cible, la CDB est induite par la nucléase Cas9 au niveau de RuvC et HNH. Les mécanismes de réparation entraînés sont alors le NHEJ qui induit des indels à l'origine d'un KO du gène et la RRH, en présence d'une matrice de réparation permettant l'édition de la séquence.*

On a mesuré l'efficacité de cette cassure double brin au locus *RAD50* par PCR, puis séquençage et analyse par le logiciel ICE (*inference of CRISPR Editing)*. Les séquences des amorces de PCR, qui permettent l'amplification d'un fragment de 205 pb autour de la zone de survenue de la CDB dans l'exon 20 de *RAD50*, ont été designées sur Primer blast tool puis commandées à Eurogentec (annexe 1).

Pour amplifier *RAD50* par PCR, l'ADN total des culots cellulaires est extrait grâce à l'action d'un tampon de lyse mis à leur contact pendant 2 heures à 56 degrés puis 10 minutes à 95 degrés.
1µL d'ADN extrait est ensuite déposé dans un puits de PCR en présence d'un mix Qiagen comprenant 1µL de dNTP à 10mM, 5µL de tampon PCR à 10X, 1µL de chlorure de magnésium (*$MgCl_2$*) à 25mM, 1 µL de chacune des amorces de *RAD50* à 5µM, 0,25µL de polymérase HotStarTaq à 5U/µL et 39,75µL d'eau stérile de qualité biologie moléculaire.
La PCR peut commencer dans le thermocycleur selon le programme suivant :

- 95° pendant cinq minutes
- 40 cycles de :
    - 30 secondes à 94°
    - 51° (température d'hybridation des amorces) pendant 30 secondes
    - 72° pendant 45 secondes
- 10 minutes à 72°

Les produits de PCR obtenus sont déposés sur un gel à 2% d'agarose puis révélés sous UV : si l'on retrouve une bande au niveau de 205 pb, indiquée par l'échelle de taille déposée dans le gel, on confirme l'amplification de la séquence de *RAD50* dans le puits de PCR. On purifie l'amplicat grâce au kit Nucleospin *Gel and PCR clean up*. Pour finir, 5µL de produit purifié associés à 5 µL d'amorces sens (annexe 1) de *RAD50* à 5µM sont envoyés à la plateforme Eurofins Genomics pour le séquençage par technique SANGER.

Le logiciel ICE permet ensuite de comparer les chromatogrammes SANGER de *RAD50* issus des cellules transfectées à une condition contrôle WT non manipulée. Il utilise pour cela un algorithme robuste donnant le pourcentage d'indels et de KO sur toutes les séquences analysées.
L'impact de la CDB sur *RAD50* a été mesuré par RT-qPCR comme décrit dans le paragraphe sur la surexpression de *RAD50* (Cf. supra).

b. Induction d'un knock-in

L'objectif était ensuite de modéliser la mutation KI du patient au même locus, dans l'exon 20 de *RAD50*. Pour cela, les hFF ont été transfectées par nucléofection avec un complexe ribonucléoprotéique CRISPR-Cas9 et un oligonucléotide qui sert de matrice de réparation pour intégrer la mutation d'intérêt (figure 24).

Cette technique nécessite à nouveau un complexe ribonucléoprotéique comportant le guide ARN ciblant l'exon 20 de *RAD50*, la nucléase Cas9 et enfin l'oligonucléotide designé sur le logiciel CHOP CHOP□, de séquence : CCTTACTTTAAGAAAAAGAAATGAGGAACTAAAAGAAGTTGAAGAAAGAAAACAACATTTGAAGGAAATGGGTCAAATGC. Il s'agit de la séquence WT de 83 nucléotides avec le codon GAA en moins (entre le T et le G en rouge), correspondant à la délétion E1035 du patient et 40 nucléotides de part et d'autre. On ajoute alors 5µL de cet oligonucléotide à 0,2 mmol/L au complexe RNP.

La transfection par CRISPR-Cas9 de 200 000 fibroblastes entraîne une CDB dans le gène de *RAD50* qui sera réparée pour une partie des cellules par la voie de réparation RRH, entraînant une édition de la séquence du gène et intégrant la mutation souhaitée en cas de succès. Le restant des cellules répareront la CDB par la voie du NHEJ, ce qui induit des indels.
Par cette technique, il est en théorie possible d'obtenir les génotypes KI/KI, KI/WT, KI/KO, KO/WT et KO/KO selon la façon dont les cellules prennent en charge la CDB et selon le nombre d'allèles modifiés.

On a mesuré l'efficacité de cette cassure double brin au locus *RAD50* par PCR, puis séquençage et analyse par le logiciel ICE □, donnant le taux d'édition si on lui renseigne la séquence de l'oligonucléotide utilisé.

3. Mesure de l'impact de la modulation de *RAD50*

i. Mesure de la prolifération cellulaire

Dans une plaque 96 puits, 10 000 cellules de chaque condition de modulation de l'expression de *RAD50* ont été déposées dans 6 puits différents. 5h après, le contenu de 3 puits par condition a été compté pour quantifier le nombre de fibroblastes effectivement déposés dans le puits et servant de taux basal.

Pour cela, les cellules ont été lavées au DPBS Gibco□ et décollées par l'action enzymatique de la trypsine Gibco□ à 0,25% pendant 3 minutes à 37°, neutralisée par l'ajout de milieu de culture.

Chaque puits a ensuite été homogénéisé et compté en cellule de Malassez au microscope optique. Les cellules vivantes et mortes sont distinguées grâce à l'utilisation de bleu trypan.

Un compte 4 jours plus tard, réalisé selon la même technique, a permis de mesurer la prolifération cellulaire.

ii. Etude de la mort cellulaire

Lorsque les cellules sont en apoptose, leurs phosphatidylsérines membranaires sont externalisées et accessibles à un anticorps anti-annexine V couplé à l'APC qui est visible en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives pour l'Annexine V reflète la proportion de cellules en apoptose.

Lorsque les cellules sont au stade de nécrose, l'intégrité membranaire est perdue. L'iodure de propidium peut entrer dans la cellule et venir s'intercaler dans l'ADN. Cette drogue est alors détectable par cytométrie en flux. De plus, les phosphatidylsérines de ces cellules sont toujours externalisées et présentent donc de façon concomitante un marquage positif pour l'annexine V. Le pourcentage de cellules positives pour l'iodure de propidium et pour l'annexine V reflète la proportion de cellules au stade de nécrose.

Le double marquage des cellules est réalisé par une incubation de 15 minutes en présence d'une solution à 11µg/mL d'iodure de propidium Biotium□ et à 0,05 µg/mL d'annexine V Bio Legend□. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100µL de tampon.

Cette expérience a été réalisée dans les différentes conditions de modulation de l'expression de *RAD50* seules et 24 ou 48h après induction d'une CDB – délais nécessaire pour visualiser la mort cellulaire d'après la littérature.

iii. Etude du cycle cellulaire

Les culots cellulaires ont été fixés par du paraformaldéhyde Ozyme□ (PFA) 3,7% puis perméabilisés par du DPBS Gibco□, Triton 0,5% LABOSI□ avant d'être mis en présence de RNAse MoBiTec□ à 100µg/mL pendant une nuit à 37 degrés pour éliminer l'ARN pouvant interférer avec le résultat.

Les cellules ont ensuite été marquées avec de l'iodure de Propidium (IP) (Biolegend□) à 4µg/mL, un intercalant fluorescent de l'ADN, puis analysées par cytométrie en flux (laser Phycoerythrin PE).

Trois populations se sont dessinées : un premier pic de faible intensité de fluorescence, correspondant à n quantité d'iodure de propidium et donc n quantité d'ADN (G0,G1) et un deuxième pic de forte intensité de fluorescence correspondant à 2n quantité d'ADN (G2,M). Entre ces deux pics, on retrouve les cellules en phase S et donc en réplication, passant de n à 2n quantité d'ADN.
L'aire sous la courbe de ces pics représente le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle.

Cette expérience a été réalisée dans les différentes conditions de modulation de l'expression de *RAD50* seules et 7h après induction d'une CDB, les effets de CRISPR-Cas9 étant maximum dans les 24 premières heures après la transfection selon la littérature.

iv. Induction d'une CDB par CRISPR-Cas9

Pour modéliser *in vitro* la coupure double brin que RAD50 prend en charge dans une cellule, chaque lignée de fibroblastes, de niveau d'expression de *RAD50* variable, a été transfectée par CRISPR-Cas9 pour cibler les loci *FAM* ou *SORCS1* sur le chromosome 10.
Le complexe ribonucléoprotéique est préparé en ajoutant 2,1µL de guide (séquence pour cibler le locus *FAM* : GAGATCCTCCCACTCGAUGG et pour le locus *SORCS1* : TGATAGACGGTGTGCCGAAG) à 1,2µL de DPBS Gibco□ et 1,7µL de nucléase Cas9 IDT□.

On vérifie ensuite au premier passage des cellules que la transfection a fonctionné en envoyant pour séquençage à la plateforme EUROFINS genomics□, l'ADN amplifié au loci *FAM* ou *SORCS1* et extrait de chaque condition de modulation de l'expression de *RAD50.* Les séquences utilisées pour la PCR et le séquençage sont disponibles dans l'annexe 1.

On amplifie alors l'ADN dans un thermocycleur avec le programme suivant :
- 95° pendant cinq minutes
- 38 cycles de :
    - 30 secondes à 94°
    - 56° pour *FAM* et 53° pour *SORCS1* (températures d'hybridation des amorces) pendant 30 secondes
    - 72° pendant 45 secondes
- 10 minutes à 72°

On vérifie la présence d'indels au loci *FAM* ou *SORCS1* grâce au logiciel ICE□ témoins qu'une CDB a bien eu lieu.

On peut maintenant mesurer l'impact fonctionnel de cette CDB sur les cellules, sur la prolifération, le cycle et la mort cellulaire.

III. Résultats

A. Etude de la fertilité dans un modèle murin *Rad50* muté

1. Mise en reproduction

La fertilité des souris *Rad50* mutantes produites par l'institut Imagine - DGSI (*genome and immune system dynamics lab)* a été évaluée en collaboration avec ce laboratoire.

Dans un premier temps, les souris des différents génotypes pour *Rad50* ont été mises en reproduction.

L'absence de souris KO/KO obtenue après accouplement des mâles KO/WT avec des femelles KO/WT suggère la non viabilité de ce génotype.

En revanche, les génotypes KO/KI et KI/KI sont viables, ce qui est en faveur d'une activité résiduelle de *Rad50* chez ces souris.

Il est intéressant de noter qu'après 4 mois de mise en reproduction de mâles KI/KI avec des femelles WT (avec 3 femelles différentes), ou de mâles WT avec des femelles KI/KI, aucune portée n'a été obtenue. Dans le même temps, deux portées ont en revanche vu le jour pour les croisements contrôles (WT/WT x WT/WT).

Malheureusement, aucun accouplement pour les souris KO/KI n'a pu être testé, du fait de la pénurie de souris vivantes de ce génotype au moment de l'expérimentation.

Ainsi, les souris de génotype doublement mutées ont présenté des difficultés pour se reproduire. Il est maintenant nécessaire de trouver l'origine de ce trouble.

2. Analyse macroscopique des testicules

Une fois les animaux euthanasiés, leurs testicules ont été récupérés et mesurés.

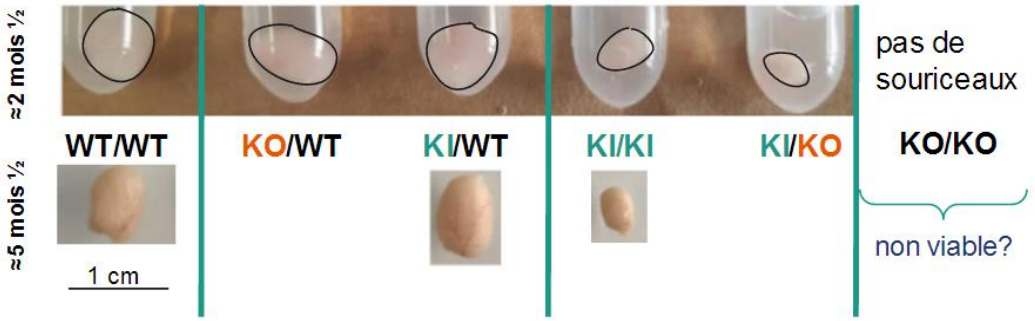
D'un point de vue macroscopique, la taille des testicules différait selon le génotype des souris (figure 25).

En effet, le testicule de la souris âgée de 2 mois et demi et de génotype KI/KI est 1,52 fois plus petit que celui de la souris WT âgée de 2 mois et 22 jours. Le testicule de la souris KI/KI âgée de 5 mois et demi est 1,2 fois plus petit que la souris WT âgée de 5 mois.

Par ailleurs, le testicule de la souris KI/KO âgée de 2 mois et demi est 1,75 fois plus petit que celui de la souris WT âgée de 2 mois et 22 jours.

Le testicule KI/WT, prélevé à 6 mois, était légèrement plus grand que celui de la souris WT euthanasiée à 5 mois, ce qui peut potentiellement être expliqué par l'âge des animaux : le testicule de la souris KI/WT a été prélevé 1 mois plus tard, lui laissant le temps d'évoluer.

Concernant les testicules âgés de deux mois et demi de génotypes KO/WT et KI/WT, mesurant respectivement 0,8 et 0,75 cm, leur taille était similaire au testicule de 0,75cm de la souris WT.



	âge (souris 1)	taille du testicule (souris 1)	âge (souris 2)	taille du testicule (souris 2)
WT/WT	2 mois 22j	0,75 cm	5 mois	0,71 cm
KO/WT	2 mois ½	0,8 cm		
KI/WT	2 mois ½	0,75 cm	6 mois	0,86 cm
KI/KI	2 mois 6j	0,58 cm	5 mois ½	0,57 cm
KI/KO	2 mois ½	0,5 cm		

Figure 25 : photos et tailles des testicules de souris de génotype WT/WT, KO/WT, KI/WT et KI/KI et KI/KO prélevées à deux âges différents (souris 1 pour les premiers sacrifices et souris 2 pour les deuxièmes).

Ainsi, une mutation biallélique semble nécessaire pour impacter le phénotype testiculaire, les testicules des souris hétérozygotes étant de tailles similaires aux WT.

3. Analyse microscopique de dissection de l'épididyme et de l'histologie épididymaire et des tubes séminifères

Après analyse macroscopique des testicules, les épididymes ont été disséqués pour analyser leur contenu. De nombreux spermatozoïdes ont été retrouvés dans le milieu de dissection de l'épididyme des souris WT, contrairement aux souris KI/KI (figure 26).

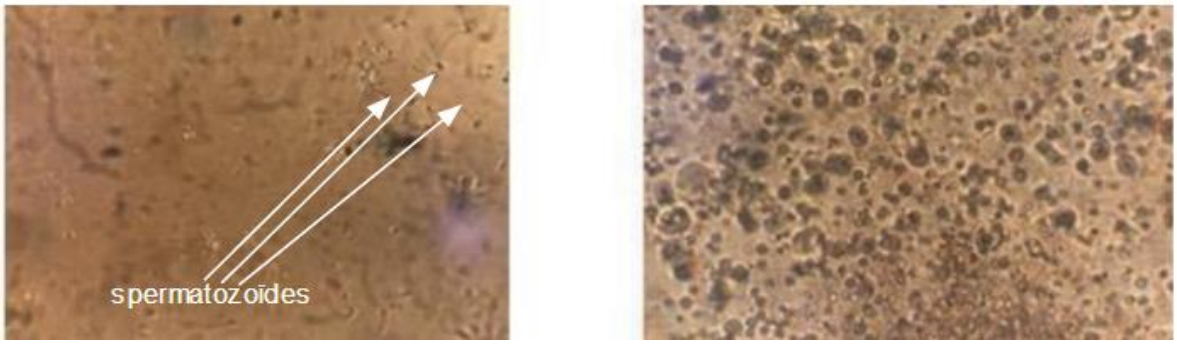


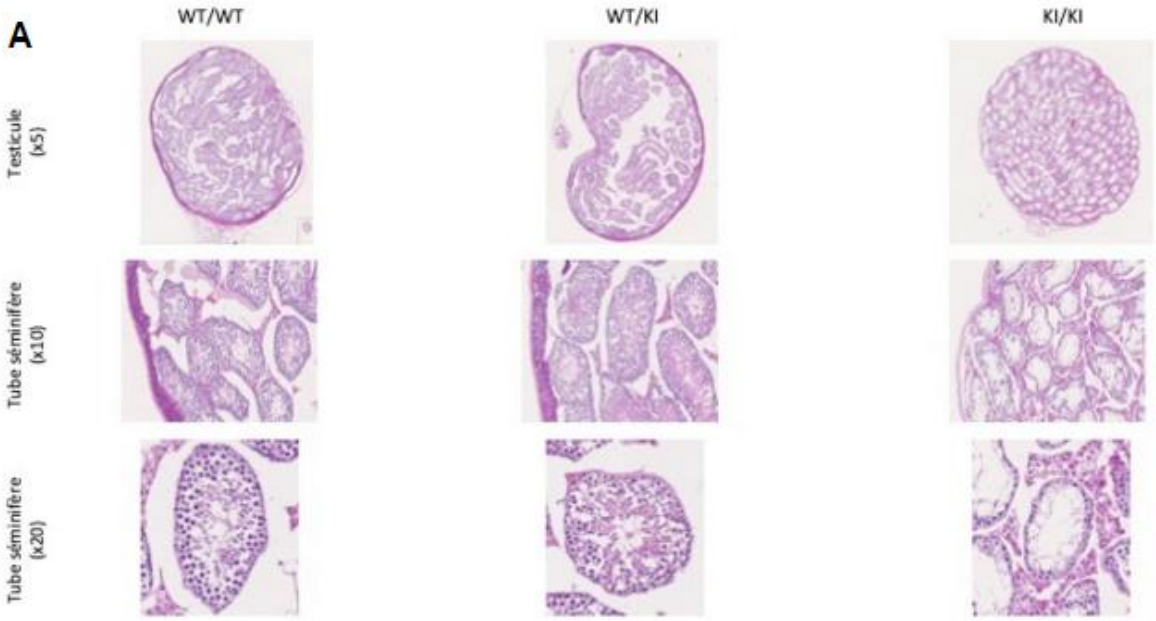
Figure 26 : photo de dissection de l'épididyme d'une souris WT/WT présentant de nombreux spermatozoïdes (à gauche) et d'une souris KI/WT pour Rad50 ne contenant pas de spermatozoïdes (à droite).

Ensuite, les testicules de souris ont été coupés et déposés sur lame pour être observés au microscope (figure 27) :

- Au premier grossissement x5, on peut observer une désorganisation de l'architecture testiculaire chez la souris KI/KI.

- Au grossissement x10 et x20, les tubes séminifères de souris KI/KI sont trois fois plus petits que ceux des souris WT ou KI/WT.

- Au grossissement x40, la spermatogenèse a pu être évaluée dans les tubes séminifères. Tous les stades de la méiose sont représentés jusqu'à la différenciation terminale en spermatides et en spermatozoïdes dans les coupes de souris WT/WT, KO/WT et KI/WT. En revanche, les spermatozoïdes sont absents des tubes séminifères des souris KO/KI et KI/KI et certains spermatocytes primaires apparaissent bloqués en prophase I. Dans la lumière épididymaire, des spermatozoïdes sont présents pour les génotypes WT/WT, KO/WT et KI/WT ce qui n'est pas le cas des génotypes KO/KI et KI/KI.



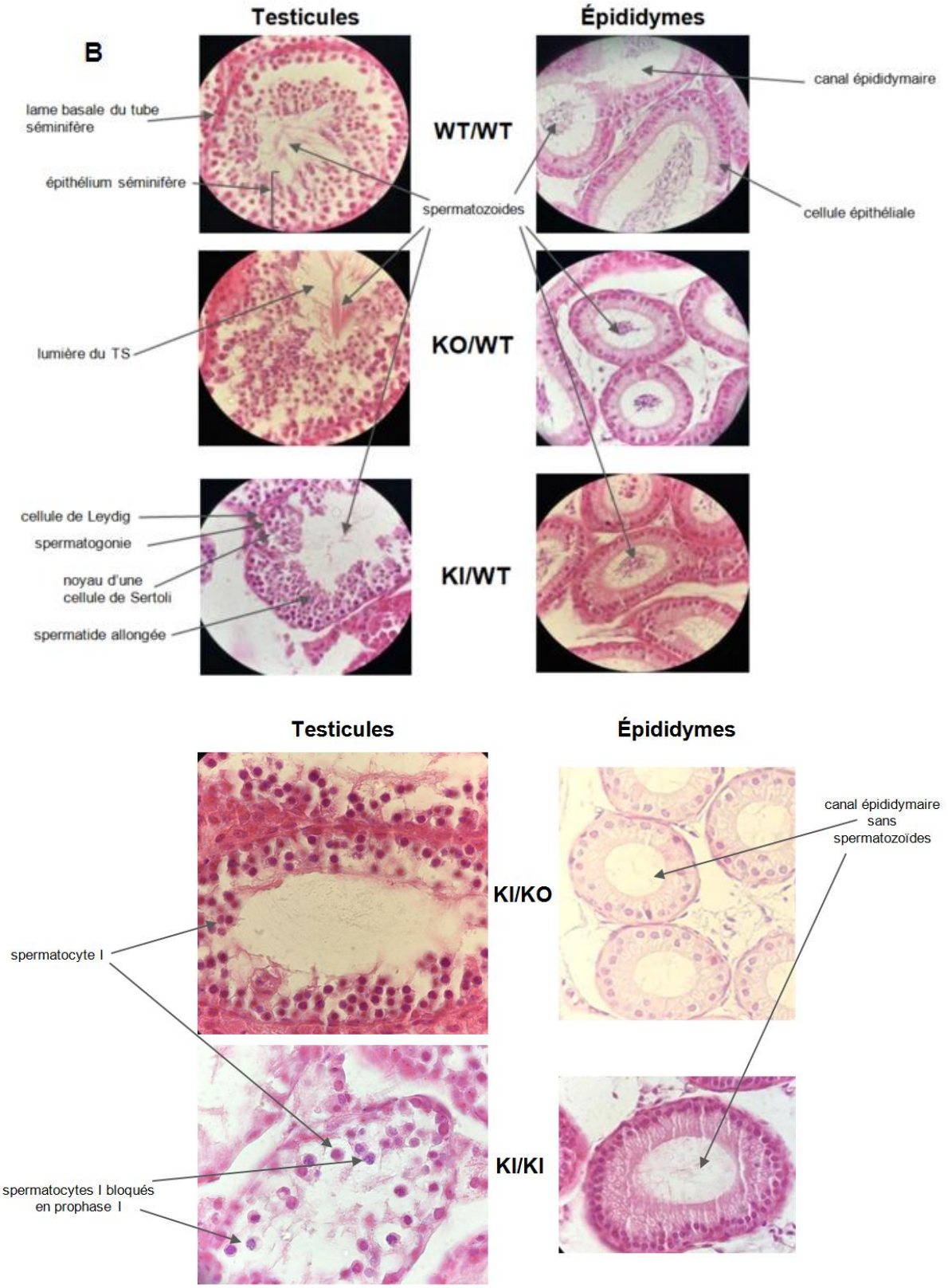
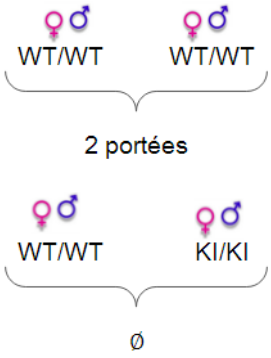


Figure 27 : photos d'observations au microscope aux grossissements x5, x10, x20 (A) et x40 (B) des testicules et épididymes de souris de génotypes WT/WT, KO/WT, KI/WT, KI/KI et KI/KO sacrifiées à environ 2 mois et demi.

Au total, nous avons observé que la fertilité des souris mâles est impactée lorsqu'elles présentent une mutation biallélique de *Rad50,* qu'elles soient de génotype KO/KI ou KI/KI (figure 28).



	Viabilité ♀♂	Fertilité ♂	Anomalies ♂
WT/WT	OUI	OUI	
WT/KO	OUI	OUI	
WT/KI	OUI	OUI	
KI/KI	OUI	NON	- testicule et TS de tailles réduites - absence de spermatozoïdes dans les TS et les épididymes - blocage des spermatocytes I en prophase I
KI/KO	OUI	NON	
KO/KO	NON		

Figure 28 : Tableau et schéma récapitulatifs des paramètres étudiés chez les souris de différents génotypes concernant la viabilité et la fertilité.

En effet, elles ont montré de plus grandes difficultés pour se reproduire, des testicules atrophiés et une absence de spermatozoïdes dans les épididymes et les tubes séminifères. Par ailleurs, les spermatocytes primaires sont bloqués en première division méiotique, probablement au stade leptotène, moment où intervient Rad50 en prophase I.

A l'état hétérozygote, une mutation de *Rad50* ne semble pas avoir de répercussion sur la fertilité de ces souris modèles qui ne présentent pas de différences sur tous les paramètres analysés par rapport aux souris WT. Ce résultat est en corrélation avec le phénotype de la mère du patient P1, non symptomatique à l'état hétérozygote.

Maintenant que nous avons avancé des arguments quant à l'impact potentiel de RAD50 sur la fertilité, nous allons moduler son expression dans des cellules humaines fibroblastiques pour mesurer son impact fonctionnel et notamment après induction d'une CDB, mimant celles de la méiose.

B. Etude de l'impact de la modulation de l'expression de *RAD50* dans des cellules humaines *in vitro*

1. Validation des méthodes de modulation de l'expression de *RAD50*

i. shRNA dirigé contre *RAD50*

Avant de mesurer l'impact fonctionnel de la modulation de l'expression de *RAD50*, il est nécessaire de vérifier qu'elle a bien été modifiée.

Pour mesurer l'efficacité de la transduction des 2 shRNA dirigés contre *RAD50*, une RT-qPCR a révélé que l'expression de *RAD50* était à :

- 96% d'extinction pour le shRNA 1 par rapport au WT
- 92% d'extinction pour le shRNA 2 par rapport au WT

Ces deux shRNA sont donc efficaces pour réduire l'expression de *RAD50* dans les hFF.

Les cellules transduites par le shRNA *scramble* ont, quant à elles, le même niveau d'expression de *RAD50* que les cellules WT ($2^{-(\Delta Ct2 - \Delta Ct1)}$= 1,1) ; ceci permet de valider son utilisation en tant que contrôle de l'effet seul de la transduction d'un shARN et de démontrer la spécificité de nos outils.

ii. KO et KI de *RAD50* par CRISPR-Cas9

Afin de mesurer l'efficacité de la transfection des fibroblastes humains par la RNP CRISPR-Cas9 et son guide ciblant *RAD50*, la zone encadrant la CDB induite dans l'exon 20 a été séquencée par SANGER et analysée par ICE□.

Ce logiciel révèle la présence de 59% d'indels. Le guide sélectionné pour CRISPR est donc efficace pour induire une CDB dans l'exon 20 de *RAD50* (figure 29). 59% des allèles séquencés ont été réparés par NHEJ, induisant des indels à l'origine d'une invalidation du gène (KO).
L'analyse polyclonale des allèles a été réalisée par ICE□ et montre une grande hétérogénéité des séquences dans l'exon 20 de *RAD50* (figure 29). Des gains de 1 base jusqu'à des délétions de 26 bases ont été obtenus. Cependant, on ne retrouve pas la séquence éditée (KI) que l'on souhaitait obtenir, avec la délétion du codon GAA en position E1035 chez le patient P1. La présence de l'oligonucléotide n'a pas été suffisante pour entraîner une réparation par RRH.

Figure 29 : Résultat de l'analyse ICE□ des séquences de l'exon 20 de RAD50 des cellules transfectées comparées au contrôle : *59% d'indels ont été obtenus en moyenne. Les séquences de RAD50 les plus représentées dans la population polyclonale sont détaillées ici. 36% des séquences ont conservé la séquence WT (première ligne) et aucune ne présente la délétion E1035 d'intérêt.*

Nous avons ensuite sous-cloné par cytométrie en flux cette population polyclonale, en isolant une cellule par puits dans une plaque 96 puits, dans le but de sélectionner un clone KO/KO et un clone KO/WT pour *RAD50*.
Sur 18 clones amplifiés et séquencés (figure 30) :

- 6 n'ont pas d'altération de séquence au locus de *RAD50* : 0% d'indels, soit un génotype WT/WT ;
- 10 ont autour de 50% d'indels ; ils sont hétérozygotes avec un allèle WT et un allèle KO, soit un génotype KO/WT ;
- 2 ont plus de 90% d'indels ce qui signifie que les deux allèles sont impactés : un allèle KO et un allèle présentant une délétion de deux acides aminés, donnant un génotype KO/del.
- Aucun clone de génotype KO/KO n'a été obtenu, suggérant à nouveau que ce n'est pas viable

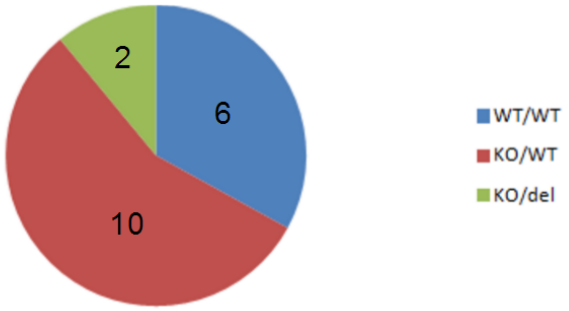


Figure 30: Répartition du nombre de clones au sein des différents génotypes pour RAD50.

Pour la suite du travail, 2 clones ont été récupérés et amplifiés pour donner :

- **Une lignée RAD50$^{KO/WT}$**, hétérozygote, avec un allèle WT et un allèle KO par perte d'une adénosine dans l'exon 20, entraînant un décalage du cadre de lecture (figure 31) ce qui donne lieu à un codon stop prématuré et ainsi, un ARNm tronqué.

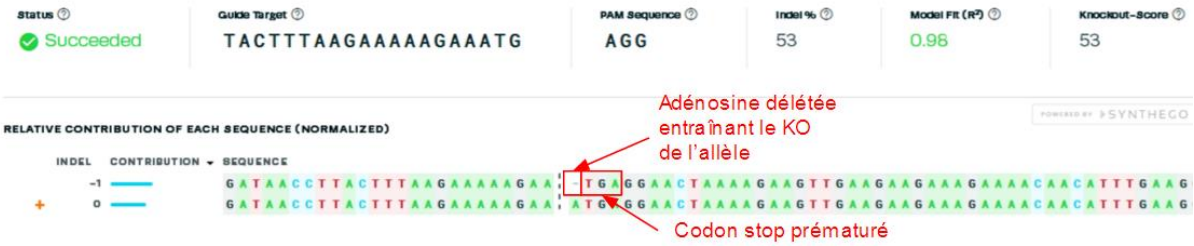


***Figure 31 : Analyse ICE des séquences du clone RAD50$^{KO/WT}$**: la deuxième ligne représente la séquence WT non impactée et la première ligne présente une adénosine en moins entraînant un décalage du cadre de lecture, ce qui donne un codon stop prématuré et donc le KO du gène.*

Une RT-qPCR analysant le niveau d'expression de l'ARNm de *RAD50* montre que celui-ci est réduit de moitié (49%) dans la lignée RAD50$^{KO/WT}$ par rapport au fibroblastes WT. L'allèle KO avec un codon stop prématuré a donc abouti à un ARNm tronqué instable.

- **Une lignée RAD50$^{KO/del}$** a été établie en parallèle. Elle présente un allèle KO par perte de 7 nucléotides dans l'exon 20 entraînant un décalage du cadre de lecture, ce qui donne lieu à un codon stop prématuré et ainsi, un ARNm tronqué. L'autre allèle porte une délétion de 6 nucléotides (AGAAAT), soit une arginine et une asparagine en moins (figure 32), situés à 7 et 8 acides aminés de l'acide glutamique délété chez le patient P1.

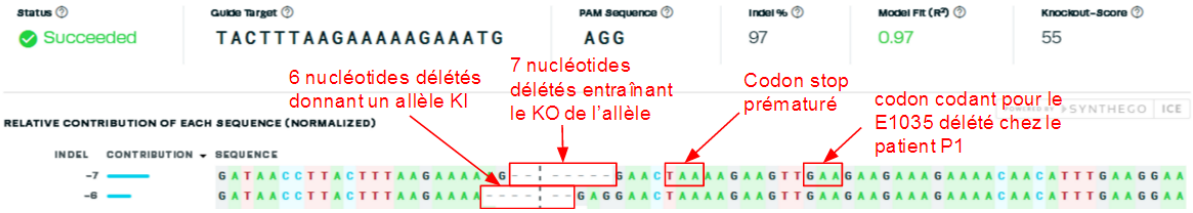


Figure 32 : Analyse ICE des séquences du clone RAD50$^{KO/del}$ *: la première ligne représente l'allèle KO par 7 nucléotides délétés entraînant un codon stop prématuré et la deuxième ligne correspond à la séquence de l'allèle del avec les six nucléotides en moins, à 7 et 8 acides aminés d'écart avec le E1035 du patient P1.*

Dans cette lignée RAD50$^{KO/del}$, l'analyse par RT-qPCR de l'expression de *RAD50* montre un niveau d'expression diminué de moitié (46%), comme dans la lignée RAD50$^{KO/WT}$. Cela suggère que l'allèle del donne un transcrit stable malgré la délétion de 6 nucléotides, soit deux acides aminés. Cependant, on peut supposer que comme chez le patient P1, l'enchaînement d'heptamères d'acides aminés du domaine de bobine enroulée sera impacté, rendant probablement cet allèle hypomorphe.

Ces résultats permettent de valider la mise en place de deux populations cellulaires exprimant *RAD50* à environ 50% de son niveau basal. Le génotype de ces deux lignées a régulièrement été contrôlé.

iii. Surexpression de *RAD50*

Maintenant qu'ont été mises en place deux lignées à expressions partielles de *RAD50*, il sera possible de procéder à un sauvetage génique (*rescue*) pour récupérer des fonctions cellulaires potentiellement affectées. Pour cela, un lentivirus de surexpression a été développé. Pour mesurer son efficacité, une RT-qPCR a été réalisée après transduction des cellules par le lentivirus de surexpression de *RAD50*. Elle a révélé que l'expression de *RAD50* dans les cellules infectées était 30 fois supérieure aux cellules WT, permettant de valider cet outil de surexpression de *RAD50* par approche lentivirale. Cette technique n'a cependant pas été utilisée au cours de cette thèse mais fera l'objet d'expérimentations futures.

Au total, nous avons développé de nombreux outils permettant de moduler l'expression de *RAD50* à l'exception du KO total qui n'a pas été viable dans les fibroblastes humains primaires immortalisés.

Nous avons pu obtenir une expression :

- Entre 0 et 10% pour les deux sh*RAD50*
- Autour de 50% pour la lignée hétérozygote RAD50$^{KO/WT}$
- Autour de 50% pour la lignée RAD50$^{KO/del}$, mais dont on ne connaît pas la fonctionnalité résiduelle
- 100% pour la lignée RAD50$^{WT/WT}$
- Un vecteur de surexpression de *RAD50.*

Ayant des difficultés à amplifier les cellules transduites par les sh*RAD50* 1 et 2, les deux populations ont été poolées, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules à moins de 10% d'expression de *RAD50* pour les expériences de prolifération cellulaire, d'apoptose et de cycle cellulaire.

L'impact fonctionnel de la diminution de l'expression de *RAD50* peut alors être étudié.

2. Impact fonctionnel de la modulation de l'expression de *RAD50*

i. Prolifération cellulaire

1. Lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$

Tout d'abord, nous avons évalué l'impact des génotypes KO/WT et KO/del sur la prolifération des cellules humaines sur un temps de 4 jours (figure 33). L'analyse de 5 expériences indépendantes montre que la lignée hétérozygote RAD50$^{KO/WT}$ prolifère de façon similaire aux cellules WT. Nous observons une discrète baisse non significative de 17% du nombre de cellules par rapport aux conditions WT après 4 jours de mise en prolifération (p=0,46). Ainsi, l'expression résiduelle de *RAD50* à environ 50% dans la lignée hétérozygote semble suffisante pour ne pas affecter la prolifération cellulaire.

On note cependant une baisse significative de la prolifération de la lignée Rad50$^{KO/del}$, à seulement 52% par rapport aux fibroblastes WT (p= 0,018). Ainsi, malgré une expression de *RAD50* identique à la lignée hétérozygote (environ 50% d'ARNm de *RAD50*), la lignée Rad50$^{KO/del}$ a proliféré deux fois moins que les cellules WT en 4 jours. Cela suggère que les deux acides aminés perdus dans la lignée Rad50$^{KO/del}$ conduisent à un transcrit mais que la protéine obtenue a une fonctionnalité altérée. Les deux acides aminés semblent donc indispensables à l'établissement d'une protéine fonctionnelle pour une prolifération correcte des cellules.

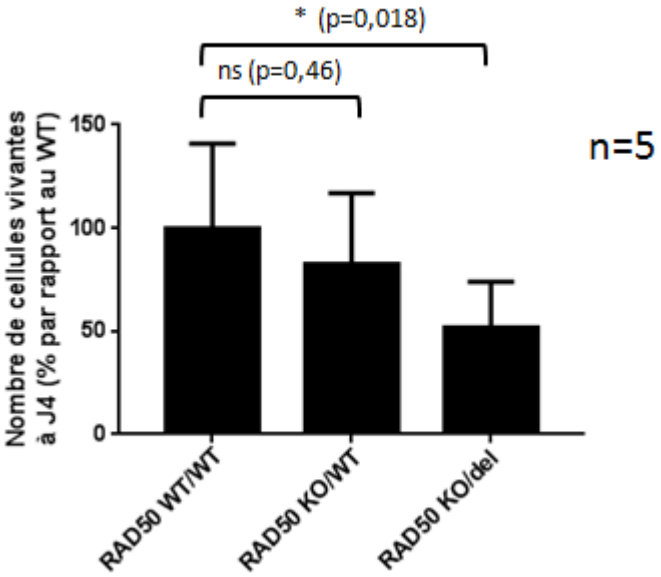


Figure 33 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de cinq expérimentations indépendantes, par lecture en cellule de Malassez. Ces résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$. *La prolifération cellulaire n'est pas impactée pour la lignée RAD50$^{KO/WT}$ (p=0,46) et significativement diminuée pour la lignée RAD50$^{KO/del}$ (p=0,018) par rapport au WT.*

2. Cellules transduites par le shRNA anti-RAD50

De la même façon, l'impact des shRNA ciblant *RAD50* sur la prolifération cellulaire a été évalué sur six expériences indépendantes (figure 34). On observe que les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* prolifèrent moins qu'après transduction par le shRNA *scramble* et que les cellules WT. Les résultats montrent une baisse de 63,5% du nombre de cellules à J4 lorsqu'elles sont transduites par le shRNA dirigé contre *RAD50* par rapport au cellules WT (p=0,007). Comparé au shRNA scramble contrôle, cette baisse reste significative et s'élève à -31% (p=0,047). Au contraire, l'effet du shRNA scramble sur la prolifération n'est pas significatif par rapport aux cellules WT (p= 0,13).

La prolifération cellulaire est donc perturbée lorsque *RAD50* est très fortement impacté (baisse de plus de 90% du niveau d'ARNm).

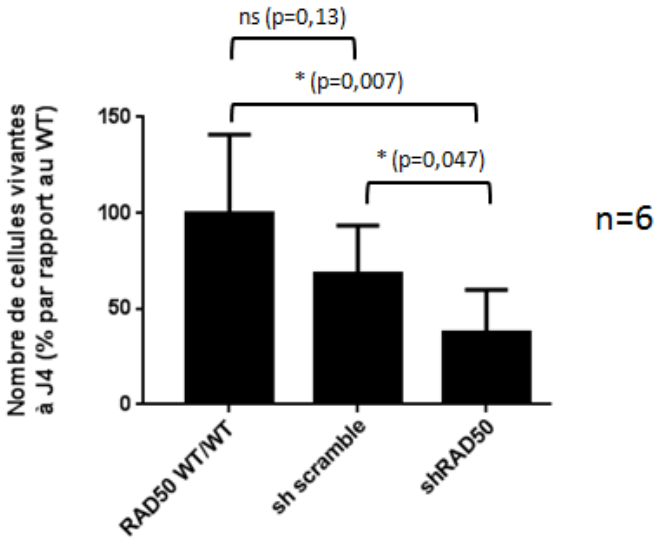


Figure 34 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de six expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez. Ces résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées transduites par le sh scramble, le shRNA anti-RAD50. *La prolifération cellulaire n'est pas impactée pour la lignée sh scramble (p=0,13) et significativement diminuée pour les cellules transduites par le shRNA dirigé contre RAD 50 (p=0,007) par rapport aux cellules WT.*

Ces résultats semblent révéler un seuil en dessous duquel on peut observer un impact de l'expression de *RAD50* sur la prolifération cellulaire. Ce seuil est inférieur à 50% d'expression puisque les cellules prolifèrent dans la lignée $RAD50^{KO/WT}$ – à 50% d'expression de *RAD50* – de façon similaire aux cellules WT.

Pour conforter cette idée de seuil, l'expression de *RAD50* a été contrôlée un mois après transduction des deux shRNA. Elle s'élevait alors à 40% malgré la pression de sélection maintenue par la puromycine une fois par semaine. Cela suggère que les cellules effectivement transduites, mais avec un faible nombre de copies du sh *RAD50* et exprimant alors plus fortement *RAD50,* présentent un avantage proliferatif au détriment des cellules transduites par de nombreuses copies, et exprimant *RAD50* de façon bien moindre. Les cellules exprimant 40% du niveau basal d'expression de *RAD50* ont proliféré de façon similaire aux WT (données non montrées ici, la manipulation n'ayant été réalisée qu'une seule fois). Ceci suggère que le seuil d'expression de *RAD50* qui impacte la prolifération est inférieur à 40%.

Les cellules transduites avec le shRNA *RAD50* avec une expression de moins de 10% et la lignée KO/del prolifèrent moins que les WT ; nous avons voulu comprendre s'il s'agit d'une perturbation du cycle cellulaire ou d'un excès de mort cellulaire.

ii. Cycle cellulaire

Nous avons ensuite évalué l'impact du niveau d'expression de *RAD50* sur le cycle cellulaire.

Nous sommes capables de quantifier la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Les cellules en phase G0/G1 correspondent au premier pic d'iodure de propidium et à n quantité d'ADN. En phase G2/M, les cellules apparaissent dans le deuxième pic d'IP à 2n quantité d'ADN. Entre les deux pics formés, se trouvent les cellules en phase S. En effet, ces dernières sont en réplication et en cours de transition entre n et 2n quantité d'ADN.

Après modulation de l'expression de *RAD50* dans les fibroblastes, aucune différence significative (p>0,36) n'est mesurée entre les proportions de cellule dans chaque phase du cycle cellulaire par rapport aux cellules WT (figure 35). En effet, la moyenne du nombre de cellules WT et transduites par le shRNA anti-*RAD50* en phase G0/G1 est de 90%. Les cellules avec un niveau d'expression réduit de *RAD50* ne sont donc pas bloquées en phase G0/G1.
Par ailleurs, la moyenne du nombre de cellules en phase G2/M est discrètement réduite dans les cellules sh*RAD50* par rapport aux cellules WT, mais de façon non significative (respectivement 4,83% pour le shRNA et 5,17% pour les WT, (p>0,36).

Ainsi, la répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire ne semble pas perturbée par une diminution drastique de l'expression de *RAD50*.
Pour compléter cette étude, nous devrons également analyser la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle de la lignée RAD50$^{KO/del}$.

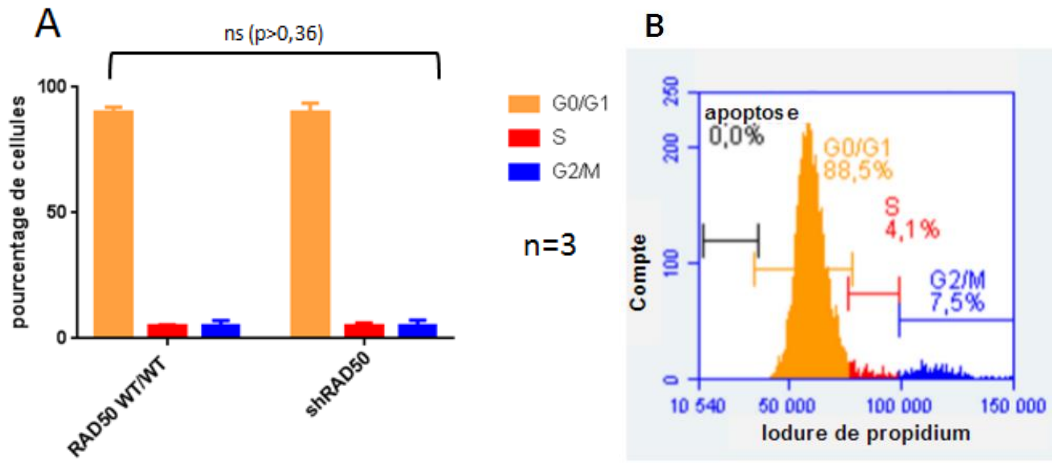


Figure 35 : A : Représentation de la répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, obtenue à partir des résultats de cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium des cellules WT (B), et des fibroblastes transduits par le shRNA anti-RAD50. *Le premier pic d'iodure de propidium correspond à la phase G0/G1, le deuxième pic à la phase G2/M et entre les deux, on retrouve la phase S.*

L'absence de différence de répartition entre les phases du cycle cellulaire n'exclut pas la possibilité d'un allongement du cycle cellulaire pour les cellules proliférant moins vite, comme la lignée RAD50$^{KO/del}$ et les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50*. Ceci peut être estimé en mesurant le temps de doublement de la population cellulaire dans chaque condition. Pour les cellules WT, nous avons calculé un temps de doublement cellulaire d'environ 24h, contre 52h pour la lignée RAD50$^{KO/del}$, 66h pour le shRNA anti-*RAD50* et 42h pour les cellules transduites par le shRNA contrôle.

Ce résultat est donc à explorer notamment par le test du CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*), afin de mesurer le nombre de division cellulaire sur un temps donné.

Intéressons-nous alors à l'hypothèse d'un excès de mort cellulaire induit par une diminution d'expression de *RAD50*.

iii. Mort cellulaire

La mort cellulaire des différentes conditions de modulation de l'expression de *RAD50* a ensuite été évaluée.

1. Lignée RAD50$^{KO/del}$

L'analyse de quatre expériences indépendantes montre que la lignée RAD50$^{KO/del}$ n'est pas soumise à plus de mort cellulaire que les cellules WT : 7,5% contre 6,6% pour les WT, valeurs non significativement différentes (p>0,37) (figure 36).

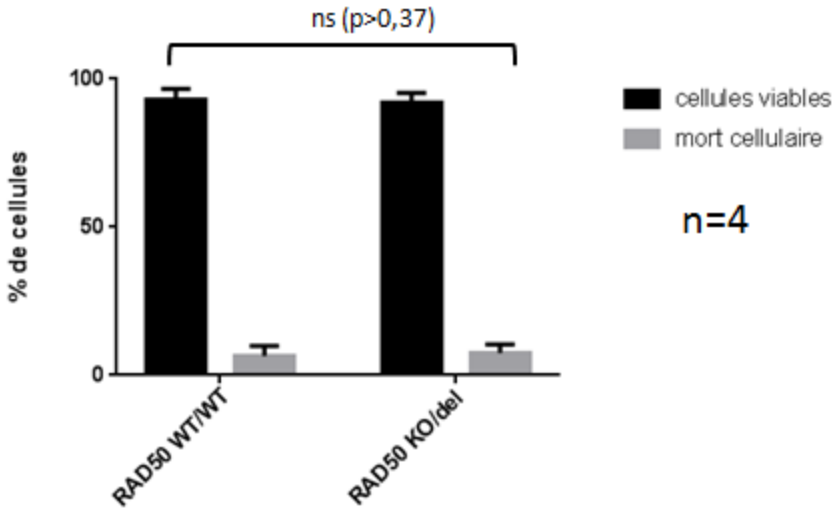


Figure 36 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et RAD50$^{KO/del}$. *Le pourcentage de cellules en mort cellulaire a été obtenu par addition des cellules en apoptose, positives à l'annexine V et des cellules en nécrose, doublement marquées par l'annexine V et par l'iodure de propidium. Aucune différence n'est significative entre les proportions de cellules viables et en mort cellulaire entre la lignée RAD50$^{KO/del}$ et les cellules WT (p>0,37).*

Pour rentrer dans les détails, la lignée RAD50$^{KO/del}$ n'est pas plus apoptotiques (2,1% *versus* 2,5% pour les WT) ou nécrotiques (5,4% *versus* 4,1% pour les WT) que les cellules ayant un taux de *RAD50* physiologique (p>0,19) (figure 37).

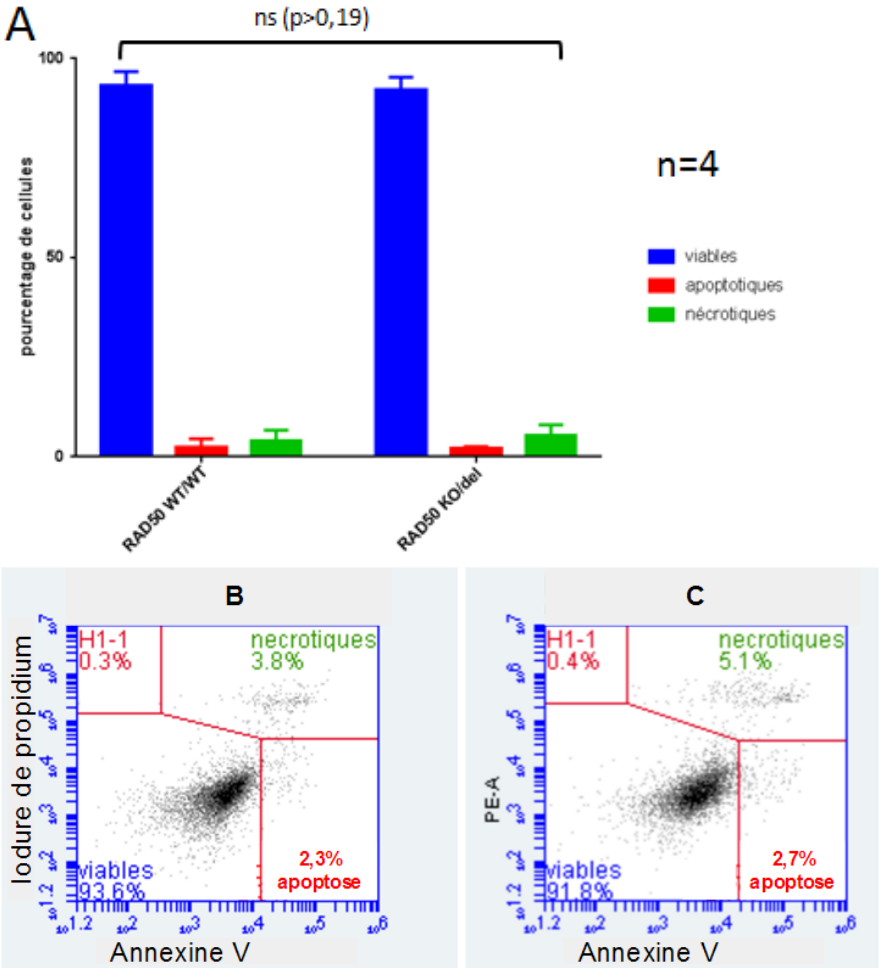


Figure 37 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT (B) et RAD50$^{KO/del}$ (C). *Les cellules en apoptose sont positives à l'annexine V et les cellules en nécrose sont positives à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Aucune différence n'est significative entre les proportions de cellules en apoptose et en nécrose de chaque lignée cellulaire (p>0,19).*

Ainsi, l'amplification plus faible de la lignée RAD50$^{KO/del}$ ne s'explique pas par un excès de mort cellulaire, ni par un blocage dans une phase du cycle cellulaire.

2. Cellules avec shRNA anti-RAD50

L'impact du shRNA ciblant *RAD50* sur la mort cellulaire a ensuite été évalué.

L'analyse de trois expériences indépendantes montre que la diminution drastique d'expression de *RAD50* par shRNA dans les fibroblastes impacte le pourcentage de cellules en mort cellulaire (figure 38). En effet, la proportion de cellules engagées dans le processus de mort cellulaire est trois fois plus importante pour les cellules transduites par le sh*RAD50* que les cellules WT (19,5% contre 6,6%, $p<10^{-5}$) et deux fois plus importante pour les cellules transduites par le sh*RAD50* que les cellules avec le shRNA scramble (19,5% contre 9,2%, p<0,002), elles-mêmes non significativement différentes des WT (p>0,09).

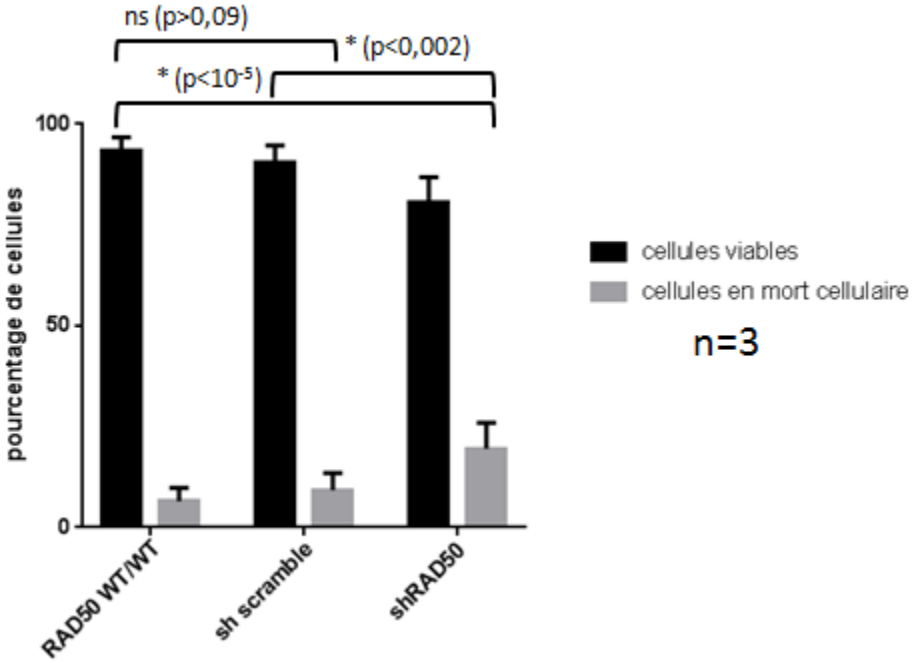


Figure 38 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par le sh scramble ou par le shRNA anti-RAD50. *Les proportions de cellules viables et en processus de mort cellulaires sont significativement différentes entre les cellules transduites par le shRNA anti-RAD50 et les cellules WT ($p<10^{-5}$) et entre les cellules transduites par le shRNA anti-RAD50 et les cellules transduites par le shRNA contrôle (p<0,002).*

L'analyse fine montre que les cellules en apoptose représentent en moyenne 2,5% des cellules WT et 4,1% des cellules sh scramble contre 16,1% pour les cellules sh*RAD50*, soit plus de six fois plus que les cellules WT (p<0,001) et près de quatre fois plus que les cellules transduites par le shRNA scramble contrôle (p<0,001) (figure 39). Les cellules en apoptose ne sont pas dans une proportion significativement plus importante pour les cellules transduites par le shRNA scramble contrôle que les cellules WT (p=0,16).

Le pourcentage de cellules en nécrose est en moyenne de 3,4% pour le sh*RAD50* contre 4,1% pour les fibroblastes WT et 5,2% pour les cellules transduites par le sh scramble, ce qui suggère que ce paramètre n'est pas impacté par une expression altérée de *RAD50* (p>0,07).

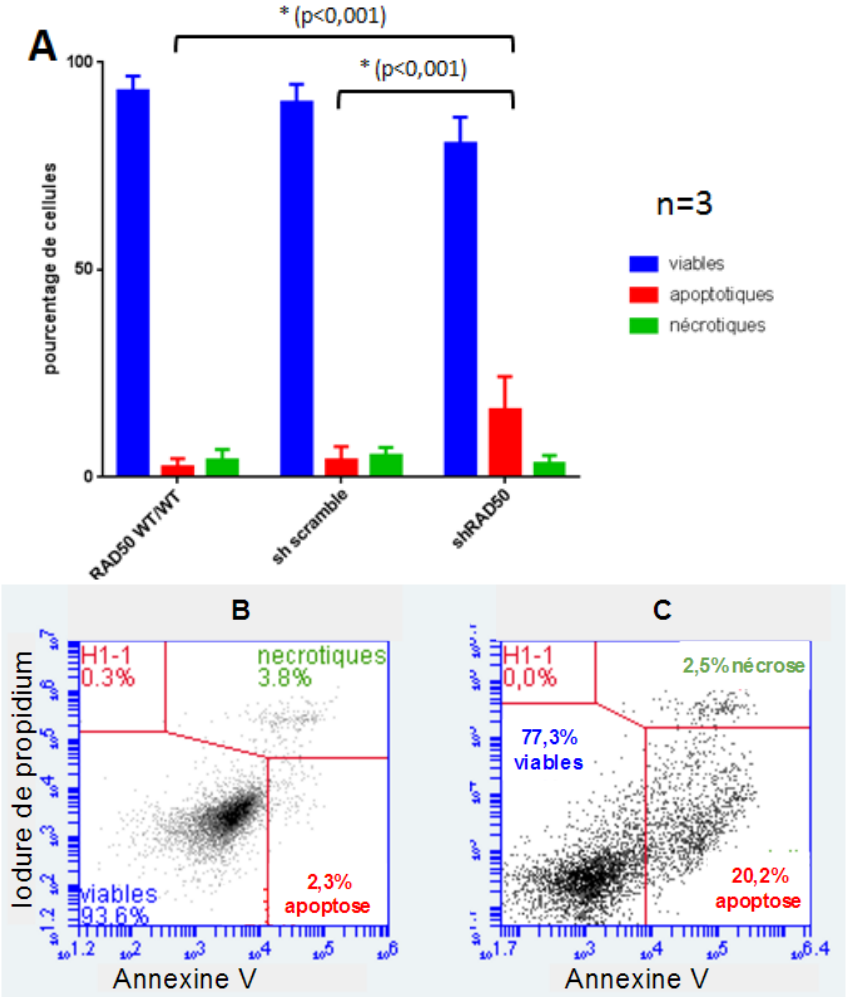


Figure 39 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT (B) et transduites par les shRAD50 (C). *Les cellules en apoptose sont positives à l'annexine V et les cellules en nécrose sont positives à l'annexine V et à l'iodure de propidium. L'apoptose est significativement plus importante pour les cellules transduites par le shRAD50 que les cellules WT et que les fibroblastes transduits contrôles (p<0,001).*

Ainsi, l'excès d'apoptose des cellules exprimant moins de 10% du niveau basal de *RAD50* pourrait expliquer leur défaut de prolifération.

Voyons maintenant comment la modulation de *RAD50* peut impacter la prise en charge des CDB.

3. Impact du niveau d'expression de *RAD50* sur la prise en charge des cassures double brin

i. Contrôle d'efficacité des CDB

Nous souhaitons mesurer l'impact d'une CDB sur les cellules présentant différents niveaux d'expression de *RAD50*. Nous avons d'abord vérifié l'efficacité de la transfection CRISPR-Cas9 pour induire une cassure double brin au locus *FAM* du chromosome 10 dans nos différentes lignées. Nous avons choisi ce locus car les outils CRISPR avaient déjà été désignés et développés au laboratoire et validés dans une lignée cellulaire humaine (HEK293).

Nous avons analysé le pourcentage d'allèles présentant des indels au locus *FAM* ciblé par CRISPR-Cas9 dans toutes nos lignées de fibroblastes humains, par séquençage et analyse ICE . La présence d'indels est le témoin d'une cassure double brin et d'une réparation par NHEJ. Une CDB a pu être obtenue dans toutes les lignées, avec une efficacité qui varie de 20,25% pour la lignée RAD50$^{KO/del}$, à 49,75% pour la lignée RAD50$^{KO/WT}$ (figure 40). Ces résultats valident le design du sgRNA pour induire une CDB par CRISPR-Cas9 dans le locus *FAM*.

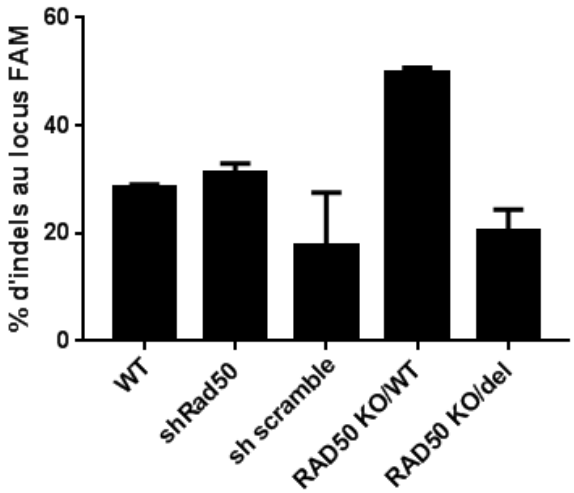


Figure 40: représentation des pourcentages d'indels au locus FAM après transfection par CRISPR-Cas9 dans les cellules WT, dans les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$ et dans les fibroblastes transduits par les shRAD50 ou par le sh scramble. *L'analyse a été réalisée pour chaque expérience pour contrôler que la CDB est bien survenue.*

ii. Prolifération cellulaire

1. Lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$

L'impact d'une CDB sur la prolifération des cellules humaines de génotypes WT/WT, KO/WT et KO/del sur un temps de 4 jours a été étudié (figure 41).

L'analyse de trois expériences indépendantes montre que la CDB induit un discret ralentissement de la prolifération cellulaire dans toutes les lignées (WT, RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$). En effet, la survenue d'une CDB dans les lignées WT, RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$ réduit leur prolifération cellulaire de respectivement 49, 20 et 22%. Cependant, ces baisses ne sont pas significatives (p>0,14). Ces données suggèrent tout de même un effet toxique de la nucléofection, de l'expression de CRISPR-Cas9 et de la CDB, indépendamment de la modulation de *RAD50*.

Les cellules hétérozygotes KO/WT en présence de CDB se comportent comme les WT avec CDB, à respectivement 62% et 51% de prolifération par rapport aux cellules WT (p=0,7). Par contre, si l'on compare le taux de prolifération des cellules RAD50$^{KO/del}$ en présence d'une CDB aux cellules WT en présence d'une CDB, on note une baisse de 21%, ce qui est significatif (p=0,047). Ainsi, le génotype doublement muté pour *RAD50* est plus impacté par la CDB et les cellules prolifèrent moins, après induction de ce stress.

Au total, la lignée RAD50$^{KO/del}$ prolifère moins vite que les cellules WT à l'état basal et cet effet est majoré en cas d'induction d'une CDB. Cela suggère que l'allèle délété conduit à une protéine RAD50 qui ne prend pas correctement en charge la CDB, aboutissant à un défaut de prolifération des cellules.

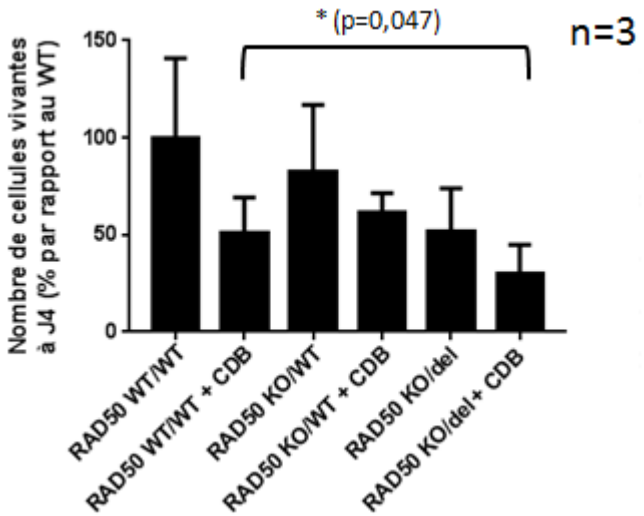


Figure 41 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez, exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après le dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées RAD50$^{KO/WT}$ et RAD50$^{KO/del}$, après induction ou non d'une CDB.

2. Cellules avec shRNA anti-RAD50

De la même façon, l'impact d'une CDB sur la prolifération cellulaire des fibroblastes transduits par le shRNA ciblant *RAD50* a ensuite été évalué sur trois expériences indépendantes (figure 42).

On observe, une fois de plus, que l'induction d'une CDB dans tous les types cellulaires semble entraîner une baisse de leur prolifération (respectivement -49% , -26% et -12% avec une CDB par rapport à sans CDB pour les cellules WT, transduites avec le shRNA scramble contrôle et avec le shRNA dirigé contre *RAD50*). Cependant, aucune différence n'est statistiquement significative (p>0,06). Ces données confirment tout de même un effet toxique de la nucléofection, de l'expression de CRISPR-Cas9 et de la CDB, indépendamment de la modulation de *RAD50*.

Les cellules transduites par le sh scramble en présence de CDB se comportent comme les WT avec CDB, à respectivement 42% et 51% de prolifération par rapport aux cellules WT, soit une différence de 9% non significative (p=0,6). Par contre, si l'on compare le taux de prolifération des cellules transduites par le shRNA dirigé contre *RAD50* en présence d'une CDB aux cellules WT en présence d'une CDB, on note une baisse de 25%, passant de 51% à 26%. Si on les compare cette fois aux cellules en présence du sh scramble avec une CDB, on observe une diminution de 16%, passant de 42% à 26%. Ces baisses de proliférations ne sont pas significatives (p=0,12 et 0,22 respectivement). Cependant, ces résultats suggèrent que les cellules exprimant *RAD50* à moins de 10% tendent à proliférer de façon moins efficace après survenue d'une CDB. Ces cellules seraient donc plus impactées par l'induction de ce stress.

Au total, la lignée transduite par le shRNA anti-*RAD50* prolifère moins vite que les cellules WT et que les cellules en présence du sh scramble à l'état basal et cet effet a tendance à être majoré en cas d'induction d'une CDB.

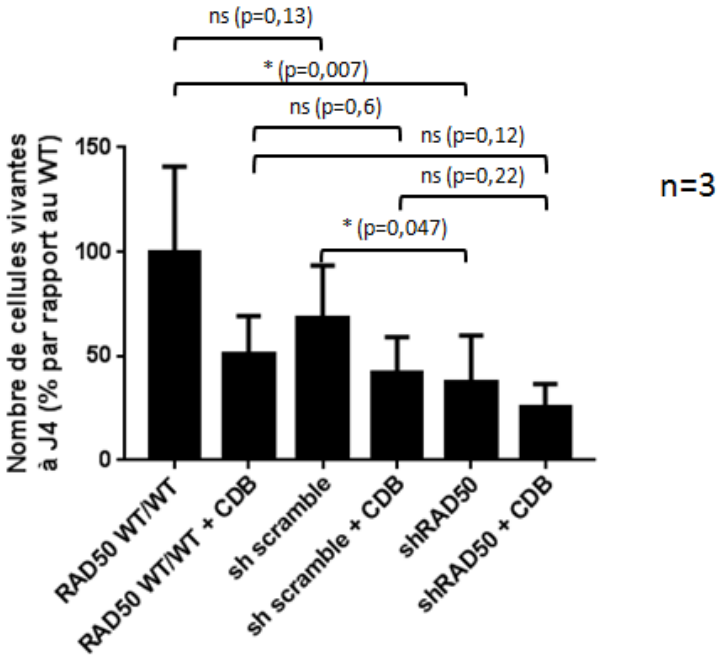


Figure 42 : Résultats de prolifération cellulaire obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes par lecture en cellule de Malassez, exprimés en pourcentage du nombre de cellules par rapport aux cellules WT, 4 jours après le dépôt de 10 000 cellules par puits, dans les conditions WT, et pour les lignées transduites par le sh scramble et par le shRNA anti-RAD50 après induction ou non d'une CDB.

Ainsi, l'induction d'une cassure double brin dans les fibroblastes a tendance à altérer leur prolifération cellulaire, quel que soit le niveau d'expression de *RAD50*.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la CDB impacte le cycle et la mort cellulaire.

iii. Cycle cellulaire

Nous avons évalué l'impact d'une CDB sur la répartition des cellules durant les phases du cycle cellulaire dans les conditions WT et pour les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50*.

L'analyse de trois expériences indépendantes, 7h après transfection et induction d'une CDB, montre que la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire n'est pas modifiée de façon significative pour les deux types cellulaires (figure 43). Chaque phase du cycle est en effet représentée par un pourcentage de cellules dans chaque phase non significativement différent de celui des cellules non transfectées, que ce soit pour les WT ou les cellules sh*RAD50* (p>0,36). En effet, les proportions de cellules en phase G0/G1, S et G2/M sont respectivement de 90%, 5% et 5% pour les cellules WT, 91%, 5% et 4% pour les cellules WT avec une CDB, 90%, 5% et 5% pour les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* et 88%, 6% et 6% pour ces mêmes cellules après induction d'une CDB.

Une expérimentation a été réalisée sur la lignée RAD50$^{KO/del}$ 24h après l'induction de la CDB et n'a pas révélé de blocage dans une des phases (résultats non montrés).

Au total, ces résultats préliminaires montrent que la baisse d'expression de *RAD50* n'induit pas de blocage du cycle cellulaire en G0/G1 suite à une CDB.

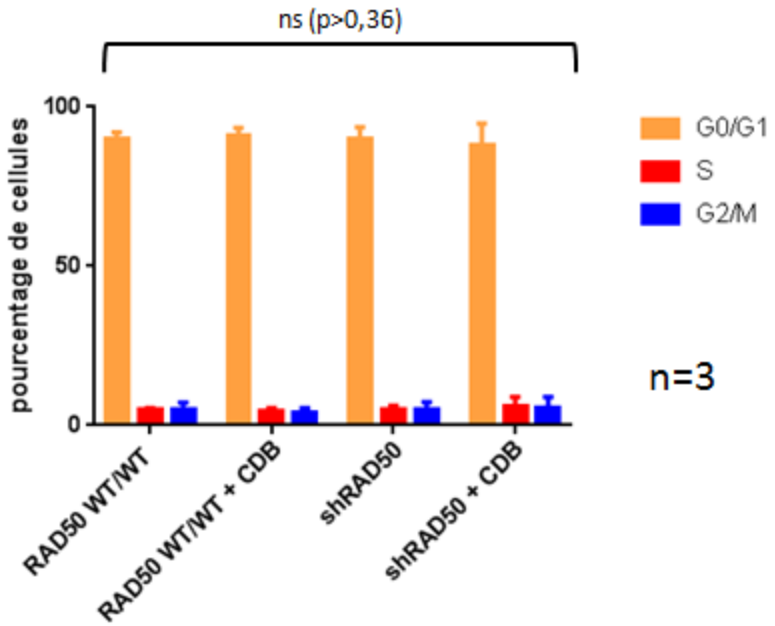


Figure 43 : Représentation de la répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire obtenue à partir des résultats de cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium des cellules WT et des fibroblastes transduits par les shRAD50 avant ou 7h après l'induction d'une CDB.

iv. Mort cellulaire

1. Lignée RAD50$^{KO/del}$

Nous avons ensuite évalué l'impact d'une CDB dans les différentes conditions de modulation de l'expression de *RAD50* sur l'apoptose et la nécrose par cytométrie en flux.

L'analyse de trois expériences indépendantes montre que la viabilité des cellules est impactée par la CDB : les taux de cellules engagées dans le processus de mort cellulaire passent de 6,6% à 8,7% après induction d'une CDB pour les cellules WT (p=0,04) et de 7,5% à 15,1% après CDB pour la lignée RAD50$^{KO/del}$ (p<0,001) (figure 44). Ces données suggèrent à nouveau un effet toxique de la nucléofection, de l'expression de CRISPR-Cas9 et de la CDB, impactant la viabilité cellulaire.

Si l'on compare le taux de mort cellulaire pour les cellules KO/del avec une CDB aux cellules WT avec une CDB, il est presque multiplié par 2, passant de 8,7% à 15,1% (p<0,001). Ainsi, la lignée RAD50$^{KO/del}$ est plus sensible à la CDB. Ce stress n'est pas correctement pris en charge par la protéine RAD50 modifiée de cette lignée.

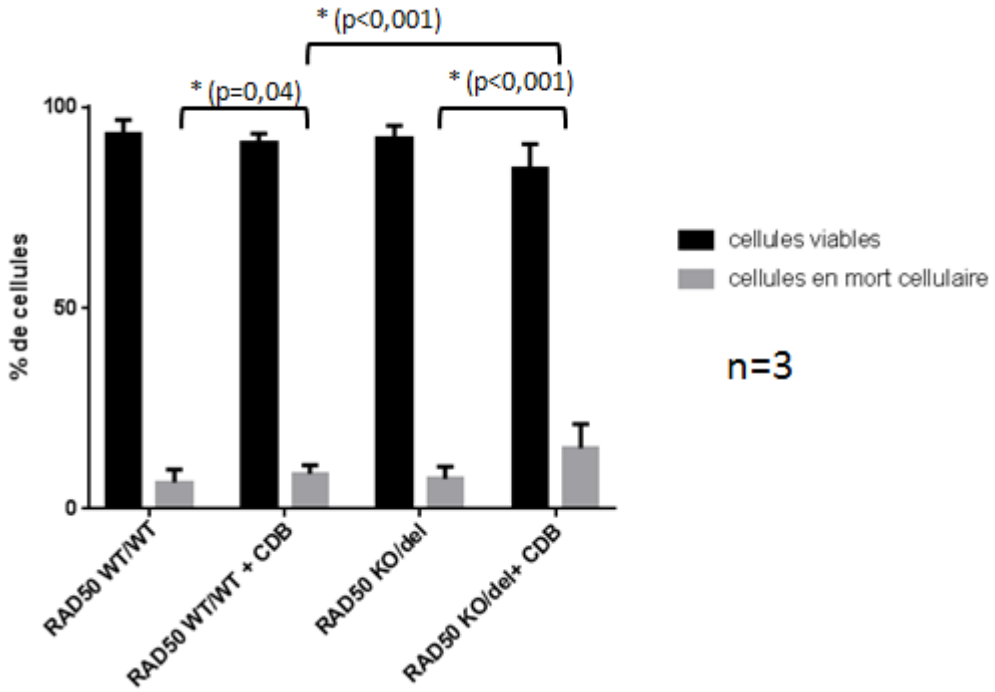


Figure 44 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et des cellules RAD50$^{KO/del}$, seules ou 24h après induction d'une CDB. *Les proportions de cellules en processus de mort cellulaires sont significativement différentes pour la lignée RAD50$^{KO/WT}$ et après induction d'une CDB (p<0,001) pour les cellules WT et après induction d'une CDB (p=0,04) et entre les cellules RAD50$^{KO/WT}$ avec une CDB et les cellules WT avec une CDB (p<0,001).*

Nous rentrons maintenant dans le détail de la mort cellulaire induite par la CDB (figure 45).

Pour la lignée RAD50$^{KO/del}$, le pourcentage de cellules en nécrose est presque multiplié par 3, passant de 4,7% en moyenne à 14% avec induction de la CDB (p<0,001). Par ailleurs, la proportion de cellules nécrotiques 24h après la CDB pour la lignée RAD50$^{KO/del}$ est significativement plus élevée que pour les WT avec CDB : 14% contre 6,6% (p=0,002).
Il en est de même pour l'apoptose : pour la lignée RAD50$^{KO/del}$, le pourcentage de cellules est presque multiplié par 3, passant de 2,5% en moyenne à 7,2% avec induction de la CDB (p<0,001). Par ailleurs, la proportion de cellules en apoptose 24h après la CDB est significativement plus élevée que pour les WT avec CDB : 7,2% contre 4,5% (p=0,01).

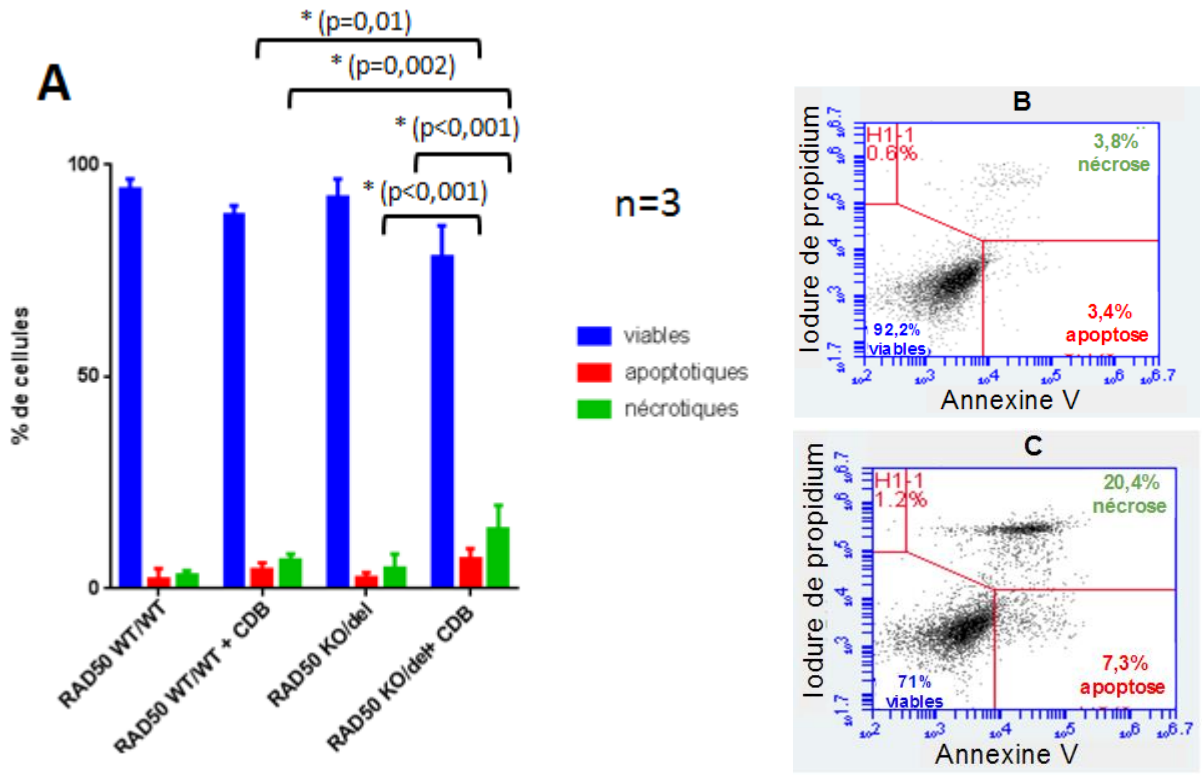


Figure 45 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et de la lignée RAD50$^{KO/del}$(B), avant ou 24h après induction d'une CDB (C : RAD50$^{KO/del}$+ CDB).
Les cellules en apoptose sont positives à l'annexine V et les cellules en nécrose sont positives à l'annexine V et à l'iodure de propidium.

De plus, ces résultats ont été confirmés par induction d'une CDB à un autre locus, le gène *SORSC1 (données non montrées).* Ces phénomènes apoptotique et nécrotique ne sont donc pas liés à la perturbation occasionnée dans le gène *FAM*.

Les cellules RAD50$^{KO/del}$ ont alors de grandes difficultés à survivre au stress induit par la CDB. RAD50 semble être indispensable à la prise en charge des cassures double brin pour éviter que la cellule n'entre massivement en apoptose et en nécrose.

2. Cellules avec shRNA anti-RAD50

L'impact sur la mort cellulaire 48h après induction d'une CDB a ensuite été évalué pour les lignées transduites par le shRNA anti-*RAD50* et par le sh scramble.

L'analyse de trois expériences indépendantes montre que la viabilité des cellules est impactée par la CDB : les taux de cellules engagées dans le processus de mort cellulaire passent de 6,6% à 8,7% après induction d'une CDB pour les cellules WT (p=0,04) et de 19,5% à 38% après CDB pour les cellules transduites par le shRNA dirigé contre *RAD50* (p=0,008) (figure 46). Les cellules avec le sh scramble tendent à reproduire le même phénomène, passant de 9,2% à 13,4%, 48h après induction d'une CDB, bien que cela ne soit pas significatif (p=0,09). Ainsi, une fois de plus, on peut voir que les différentes lignées sont sensibles à la nucléofection, à l'expression de CRISPR-Cas9 et à la CDB, impactant la viabilité cellulaire. Et ce, indépendamment du niveau d'expression de *RAD50*.

Si l'on compare les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* avec une CDB aux cellules WT avec une CDB, le taux de mort cellulaire est presque multiplié par 4, passant de 8,7% à 38% (p<0,001). La proportion de cellules en mort cellulaire dans la lignée sh*RAD50* avec CDB à 38% est également près de trois fois supérieure à celle de la lignée sh scramble avec CDB, s'élevant à 13,4% (p=0,006).

Ainsi, les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* sont plus sensibles à la CDB. *RAD50* ne semble donc pas suffisamment exprimé pour maintenir la viabilité cellulaire post-CDB.

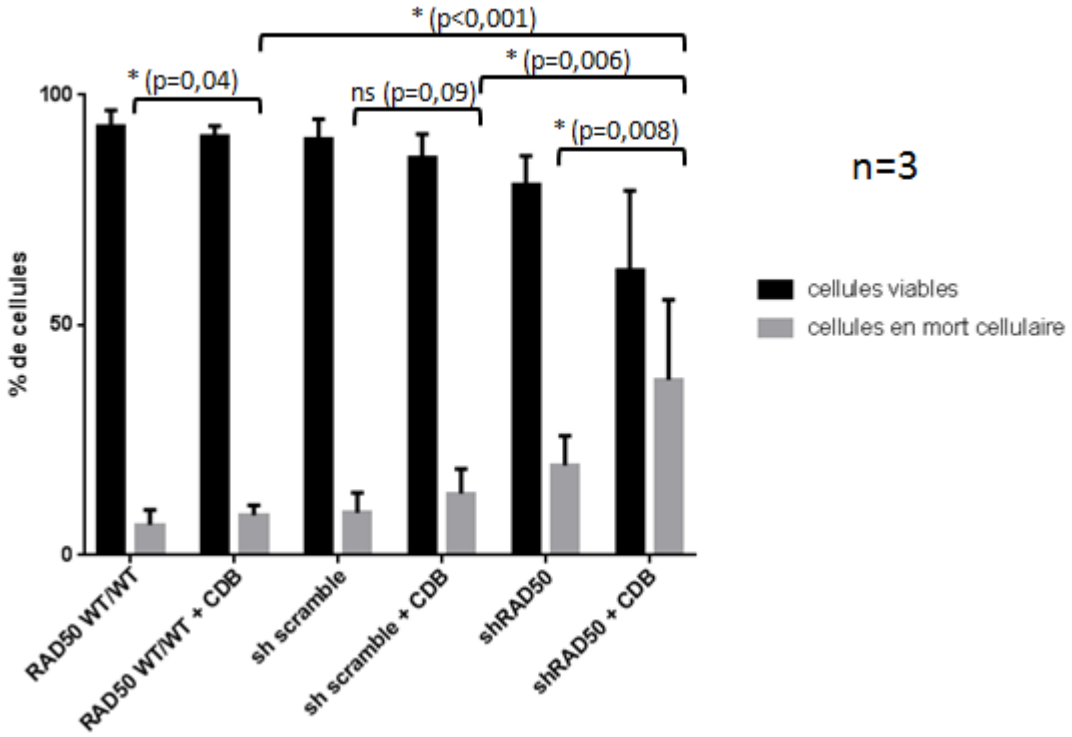


Figure 46 : Représentation des proportions de cellules viables et engagées dans un processus de mort cellulaire obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par le sh scramble ou par le shRNA anti-RAD50, avant ou 48h après induction d'une CDB. *Les proportions de cellules en processus de mort cellulaires sont significativement différentes entre les cellules transduites par le shRNA anti-RAD50 avec une CDB et les cellules WT avec une CDB (p<0,001) et entre les cellules transduites par le shRNA anti-RAD50 avec une CDB et les cellules transduites par le shRNA contrôle avec une CDB (p=0,006). Également, la proportion de cellules en mort cellulaire est plus importante entre les cellules shRAD50 avec une CDB que sans CDB (p=0,008) et entre les cellules WT avec une CDB que sans CDB (p=0,04).*

L'analyse fine de trois expériences indépendantes permet de détailler le processus de mort cellulaire impacté par le défaut d'expression de *RAD50* : c'est l'apoptose qui est touchée par l'induction d'une CDB. 48h après déclenchement de ce stress, le taux de cellules en apoptose dans les cellules transduites par le sh*RAD50* est presque multiplié par 2, passant de 16,1% à 31,2% (p=0,03) (figure 47).

De plus, les cellules présentant moins de 10% d'expression de *RAD50* avec une CDB voient leur apoptose multiplier par huit par rapport aux cellules WT avec une CDB (p<0,001) et par 5 par rapport aux cellules transduites par le sh scramble (p<0,001). En effet, 31,2% des cellules sh*RAD50* après la CDB sont apoptotiques contre respectivement 3,8% et 6,3% pour les cellules WT avec CDB et sh scramble avec CDB.

Ainsi, les cellules présentant un défaut majeur d'expression de *RAD50* entrent massivement en apoptose après induction d'une CDB. RAD50 a donc un rôle prédominant pour prendre en charge cette CDB.

Les pourcentages de cellules en nécrose ne sont pas impactés par l'induction d'une CDB. Ces taux ont tendance à légèrement augmenter mais de façon non significative (p>0,18). En effet, la proportion de cellules en nécrose s'élève à 4,1% pour les cellules WT et à 4,9% 48h après CDB, à 5,2% pour les cellules transduites par le sh scramble et à 7,1% lorsqu'elles ont subi une CDB et à 3,4% pour les cellules sh*RAD50* contre 6,9% pour ces mêmes fibroblastes avec une CDB. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes, ce qui suggère que ce paramètre n'est pas impacté par une CDB en conditions d'expression altérée de *RAD50* dans ce type cellulaire.

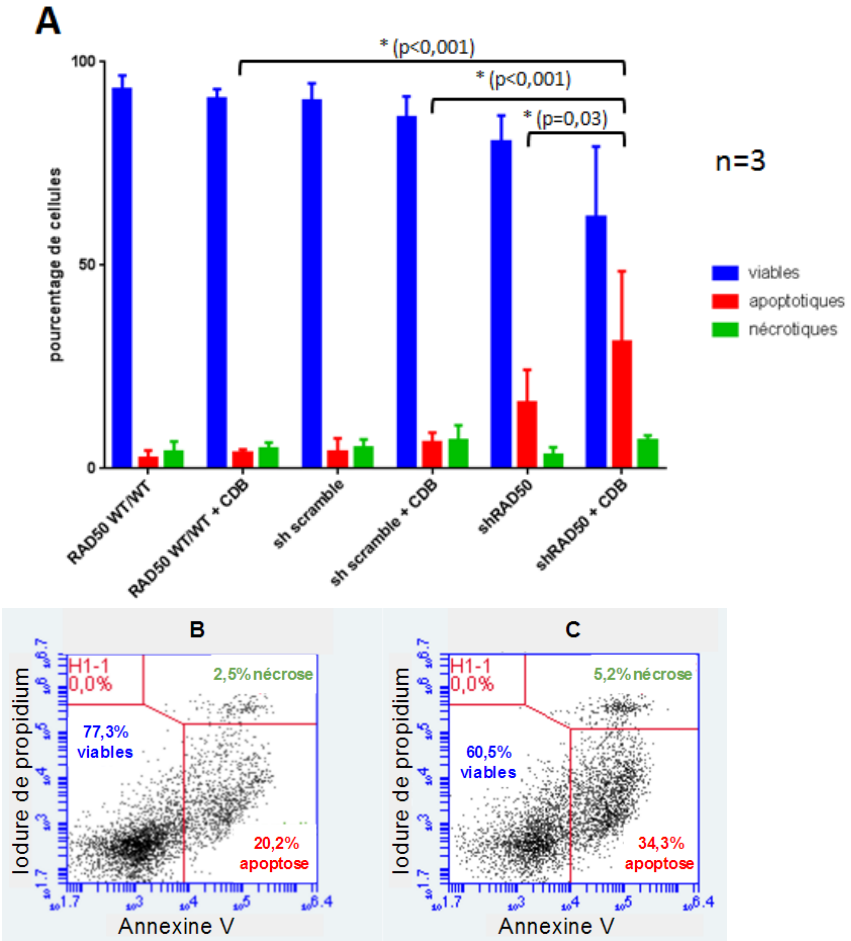


Figure 47 : A : Représentation des proportions de cellules viables, en apoptose ou en nécrose obtenues à partir des résultats de cytométrie en flux après double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V des cellules WT et transduites par les shRAD50 (B), avant ou 48h après induction d'une CDB (C : shRAD50 + CDB). *Les cellules en apoptose sont positives à l'annexine V et les cellules en nécrose sont positives à l'annexine V et à l'iodure de propidium.*

Nous avons donc montré que les cellules à moins de 10% d'expression de *RAD50* ont de plus grandes difficultés à proliférer que les cellules WT, à l'état basal et lorsqu'une CDB survient.

Également, la diminution de l'expression de *RAD50* impacte la survie post-CDB. Lorsque *RAD50* n'est pas suffisamment exprimé pour une prise en charge correcte de ce stress, les cellules sont plus sujettes à la mort cellulaire par apoptose.

Nous avons résumé tous les résultats obtenus dans la figure 48.

Le génotype hétérozygote KO/WT se comporte comme les cellules WT. Les cellules hétérozygotes composites KO/del et les cellules transduites par le shRNA anti-*RAD50* présentent un défaut de prolifération cellulaire, majoré en cas d'induction d'une CDB, ce qui s'explique par une mort cellulaire accrue (figure 48).

		Sans CDB			**Avec CDB**		
	Expression de RAD50	**Prolifération cellulaire**	**Cycle cellulaire**	**Mort cellulaire**	**Prolifération cellulaire**	**Cycle cellulaire**	**Mort cellulaire**
RAD50 WT/WT	100%	normale	normal	normale	tendance à ↘	normal	normale
RAD50 KO/WT	49%	normale		normale	tendance à ↘		normale
RAD50 KO/del	46%	↘		normale	↘		apoptose et nécrose ↗
shRNA anti-*RAD50*	< 10%	↘	normal	apoptose ↗	tendance à ↘	normal	apoptose ↗
sh scramble	100%	normale		normale	tendance à ↘		normale

Figure 48 : tableau récapitulatif des résultats de prolifération cellulaire, de cycle cellulaire et de mort cellulaire obtenus sur les différentes lignées seules ou après induction d'une CDB.

IV. Conclusion et discussion

Toutes ces expériences auront permis de consolider l'hypothèse selon laquelle une mutation biallélique de *RAD50* pourrait avoir un impact sur la fertilité, par son rôle majeur dans la méiose et notamment dans la prise en charge des CDB.

La fertilité mâle dans le modèle murin.
La fertilité des souris présentant une mutation biallélique de *RAD50* est altérée : les croisements de souris KI/KI mâles ou femelles avec des souris WT n'ont pas donné de portées. De plus, les testicules des souris doublement mutées KO/KI et KI/KI sont de taille inférieure aux WT et l'architecture testiculaire est désorganisée avec des tubes séminifères atrophiés. Aucun spermatozoïde n'a pu être visualisé dans leurs TS et leurs épididymes. Roset *et al.* ont obtenu des résultats similaires par induction d'une mutation dans le domaine de liaison à l'ADN d'un des deux allèles de *Rad50* : les testicules étaient de taille diminuée et les tubes séminifères atrophiés, ce qui a rendu les mâles stériles (50).

Les tubes séminifères des souris KI/KO ou KI/KI comportaient des spermatocytes qui semblaient bloqués en prophase I. Ceci suggère que les CDB occasionnées par Spo11 ne seraient pas correctement prises en charge par Rad50, laissant les spermatocytes bloqués en prophase I. Or, Chansel *et al.* ont mis en évidence que l'allèle KI aboutit à une protéine RAD50 qui altère l'activité exonucléasique de MRE11 dans la RRH (48). Ce mécanisme est indispensable à la prise en charge des CDB dans la méiose. Il ne semble donc pas étonnant d'observer un défaut dans la méiose I, objectivé par un blocage des spermatocytes I probable au leptotène, moment où Rad50 intervient.
Cherry *et al.* ont d'ailleurs montré qu'un blocage en méiose des spermatocytes I était possible : des souris doublement mutées pour Mre11 présentaient une différence de répartition des cellules germinales dans les étapes de la prophase par rapport aux contrôles (43). D'après des résultats d'immunofluorescence, Rad51 s'exprimait de façon prolongée et persistait jusqu'au pachytène, alors qu'il intervient seulement au leptotène. Le pachytène correspond à l'étape de formation des crossing-over maintenus par le complexe synaptonémal (CS), une synapse constituée notamment de SYCP3. Le marquage de ce composant du CS a permis de mettre en évidence un défaut dans l'appariement des chromosomes homologues : la révélation en immunofluorescence montre que ces derniers sont à distance et donc non appariés. Ainsi, la persistance de Rad51 au-delà du leptotène empêche les acteurs en aval d'effectuer leur rôle, et notamment au niveau de la formation du CS. Les spermatocytes et ovocytes sont donc bloqués au stade pachytène.
Il faudrait confirmer l'hypothèse d'un arrêt en prophase I des spermatocytes I des souris KI/KO et KI/KI par technique d'étalement des chromosomes en méiose, permettant d'observer les différentes étapes de la prophase I (50). Il sera alors probablement possible d'objectiver un blocage des spermatocytes au stade leptotène.

Il est également nécessaire de poursuivre l'analyse de la fertilité de ces souris par la mesure de l'apoptose par technique TUNEL sur coupe testiculaire. Cela permettra de mettre en évidence si les spermatocytes I bloqués en prophase I sont dirigés vers ce processus de mort cellulaire.

L'expression de Rad50 et de ses partenaires méiotiques comme Mre11, Spo11, Atm et Nbs1 reste aussi à explorer par analyse immunohistochimique. Comme c'est le mécanisme de RRH qui est impacté par la mutation E1035 (48), on peut s'attendre à un défaut de recrutement de ces acteurs dans les tubes séminifères des souris mutantes.

L'étude de la fertilité des souris mutantes femelles est également essentielle. Pour cela, l'analyse de l'histologie ovarienne permettrait dans un premier temps de visualiser la présence de follicules et de comparer la folliculogenèse à celle de souris WT. Les souris femelles obtenues par Roset *et al.* présentaient une diminution du nombre de follicules dans les ovaires lorsqu'un de leurs allèles était muté dans le domaine crochet de *Rad50* (50). La mise en évidence de corps jaunes objectiverait la survenue d'une ovulation et serait un bon reflet du fonctionnement ovarien. Il serait intéressant d'évaluer le cycle estrien par réalisation de frottis vaginaux quotidiens. Une souris en insuffisance ovarienne présenterait une absence de cyclicité. Il est fondamental d'étudier la méiose femelle dès le stade embryonnaire puisqu'elle débute en période anténatale à 12,5 jours post-conception (28).

Enfin, il serait intéressant d'étudier le génotype des zygotes et embryons obtenus chez la souris pour conclure sur la viabilité embryonnaire d'un génotype homozygote KO. Si aucun individu présentant un KO total de *Rad50* n'est identifié dès le stade une cellule, cela suggère que la fécondation de deux gamètes KO pour *Rad50* n'est pas possible. Si en revanche, un double KO est identifié, observer son développement *in utero* permettra de mettre en évidence le moment où celui-ci s'altère jusqu'à entraîner son décès. Luo *et al.* ont montré que c'est à 6 jours de développement que les embryons KO/KO devenaient anormaux jusqu'à entrer en atrésie à 7,5 jours (49).

Expériences *in vitro*.

Concernant les expériences *in vitro*, nous avons dans un premier temps validé quatre outils de modulation de l'expression de *RAD50,* en la diminuant pour trois d'entre eux. Ainsi, différentes lignées ont été produites : une lignée hétérozygote KO/WT à 50% d'expression, une lignée hétérozygote composite KO/del également à 50% et une lignée à moins de 10% d'expression par transduction d'un shRNA anti-*RAD50*.

Tout comme dans notre étude *in vivo*, nous n'avons pas retrouvé d'altération fonctionnelle dans la lignée KO/WT. Elle se comporte sensiblement comme les cellules WT, suggérant qu'une baisse d'expression de 50% de *RAD50* est sans impact phénotypique, même en cas de cassure double brin.

La lignée RAD50$^{KO/del}$ a présenté une prolifération cellulaire diminuée par rapport aux cellules WT, qui ne s'explique pas par un excès de mort cellulaire, ni par un blocage des cellules dans une phase du cycle cellulaire. Les temps de doublement cellulaires calculés à partir des mesures de prolifération ont cependant permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le cycle cellulaire de cette lignée serait allongé. Il est donc nécessaire d'approfondir l'étude de la lignée RAD50$^{KO/del}$ en réalisant une expérience de CFSE, permettant d'objectiver le nombre de divisions cellulaires sur un temps donné.

Par contre, l'altération de la prolifération cellulaire des fibroblastes transduits par le shRNA anti-*RAD50* s'explique, d'après nos résultats, par un excès d'apoptose. Cette information concorde avec la littérature (46) : une lignée de spermatocytes de souris immortalisée et bloquée au stade pachytène présentait une altération de la prolifération cellulaire par excès d'apoptose après transduction par un siRNA ciblant *Rad50*.
Ce défaut de prolifération cellulaire a d'ailleurs occasionné des difficultés techniques devant le nombre de cellules nécessaires pour chaque expérimentation et donc un ralentissement dans le planning initial.

Par ailleurs, quel que soit le niveau d'expression de *RAD50* dans les fibroblastes, l'induction d'une CDB a entraîné un défaut de prolifération cellulaire et un excès de mort cellulaire. Cela suggère que les différentes lignées sont sensibles à la nucléofection, à l'expression de CRISPR-Cas9 et à la CDB, impactant la viabilité cellulaire. Ces résultats concordent avec la littérature qui décrit que la CDB déclenchée par CRISPR-Cas9 entraîne une réponse par la voie du DDR dans laquelle p53 intervient pour mettre le cycle cellulaire en pause afin d'enclencher des points de contrôle. Quand la cellule ne parvient pas à réparer la CDB, elle entre en apoptose que l'on dit «p53-dépendante» (56,57,58).

Cet effet a été majoré lorsque *RAD50* était exprimé à moins de 10% et pour la lignée RAD50$^{KO/del}$ puisque les cellules étaient significativement plus engagées dans le processus de mort cellulaire après une CDB que les cellules WT en présence d'une CDB. La survenue de ce stress a orienté les fibroblastes transduits par le shRNA anti-*RAD50* vers l'apoptose quand la lignée RAD50$^{KO/del}$ se tournait à la fois vers la nécrose et l'apoptose. Ainsi, cela suggère que les cellules déficientes en RAD50 ou exprimant un reliquat tronqué n'arrivent pas à prendre correctement en charge la CDB et p53 induit le mécanisme d'apoptose. Le niveau de p53 serait intéressant à étudier puisque ce gardien du génome doit être massivement activé.
Un excès d'apoptose p53-dépendant a d'ailleurs été mis en évidence par Bender *et al.* chez des souris présentant deux allèles hypomorphes pour *Rad50* (51). Cela a entraîné une attrition massive des cellules souches hématopoïétiques et des spermatogonies, bien que les mâles soient restés fertiles.

L'excès de mort cellulaire induit par une CDB a été à l'origine de la baisse de la prolifération cellulaire pour la lignée RAD50$^{KO/del}$. Concernant la transduction par le shRNA ciblant *RAD50*, l'augmentation de l'apoptose liée à la survenue de la CDB a seulement entraîné une tendance à la baisse de la prolifération, même si ce résultat n'est pas significatif. Les *p-value* sont cependant proches de la significativité (p=0,12 et 0,22). Il serait donc intéressant de répéter cette expérimentation plusieurs fois pour améliorer sa puissance. Reproduire cette manipulation en comptant les cellules au-delà de 4 jours permettrait de mettre en évidence un delta de prolifération cellulaire plus important avec les conditions contrôles, qui deviendra probablement significatif.

Par ailleurs, le cycle cellulaire n'a pas été impacté par la modulation de l'expression de *RAD50* en conditions basales comme 7h après l'induction d'une CDB. Il serait cependant intéressant de l'étudier 48h après la CDB pour compléter ce résultat, ce délai pouvant être de rigueur pour observer le blocage des cellules dans l'une des phases. Les fibroblastes de la patiente hétérozygote composite pour *RAD50* ont présenté un défaut dans les points de contrôles en phase G1 et S ce qui a entraîné un blocage et une accumulation des cellules en phase G2, 48h après irradiation et induction de CDB (52). Ce résultat n'a cependant pas été retrouvé dans les fibroblastes du patient P1 qui avait un profil de cycle cellulaire semblable aux cellules contrôles (48).

Nous faisons l'hypothèse qu'il ne sera pas possible de visualiser un résultat probant puisque les cellules subissant la CDB entrent de façon majorée dans le processus de mort cellulaire. Ainsi, les cellules analysées dans l'expérience de cycle cellulaire sont celles qui ont survécu à la CDB. Il peut donc s'agir des cellules qui n'ont pas été transfectées ou transduites (l'efficacité n'étant pas de 100%) ou présentant un niveau plus faible de shRNA anti-*RAD50* et exprimant *RAD50* suffisamment pour prendre en charge correctement la CDB.

Proposition d'un modèle.

Ainsi, nous proposons un modèle mettant en relation les différents niveaux d'expression de *RAD50* associés aux génotypes obtenus dans ce travail de thèse avec leur impact phénotypique (figure 49).
L'état hétérozygote n'est pas délétère : les fibroblastes ont présenté des résultats similaires aux WT et la fertilité des souris était normale. La mère du patient P1, elle-même hétérozygote, est cliniquement normale et fertile puisqu'elle a pu avoir trois enfants (48).
Par contre, lorsque les deux allèles de *RAD50* sont mutés, la fertilité est altérée pour les génotypes KO/KI et KI/KO et les fibroblastes prolifèrent moins. Cet effet est majoré par l'induction d'une CDB qui entraîne une apoptose et une nécrose massives. Enfin, le génotype KO/KI du patient P1 est responsable de son déficit immunitaire, de la pigmentation de sa peau, de sa microcéphalie et de sa dysmorphie.
Les fibroblastes présentant moins de 10% d'expression de *RAD50* prolifèrent également moins, du fait de leur entrée en apoptose accrue. En présence d'une CDB, ce processus de mort cellulaire est démultiplié.
Le KO total n'est pas viable : nous n'avons pas obtenu de génotype KO/KO chez la souris et dans les fibroblastes humains.
Il serait donc intéressant d'identifier des patients présentant un niveau d'expression de *RAD50* suffisamment altéré pour étudier leur fertilité.
Des seuils d'expression de *RAD50* avec différents impacts phénotypiques semblent exister, comme pour *BRCA* et *FANCM* dont l'atteinte touche d'abord la fertilité et entraîne un processus de carcinogenèse dans les cas les plus sévères (34, 38, 39).

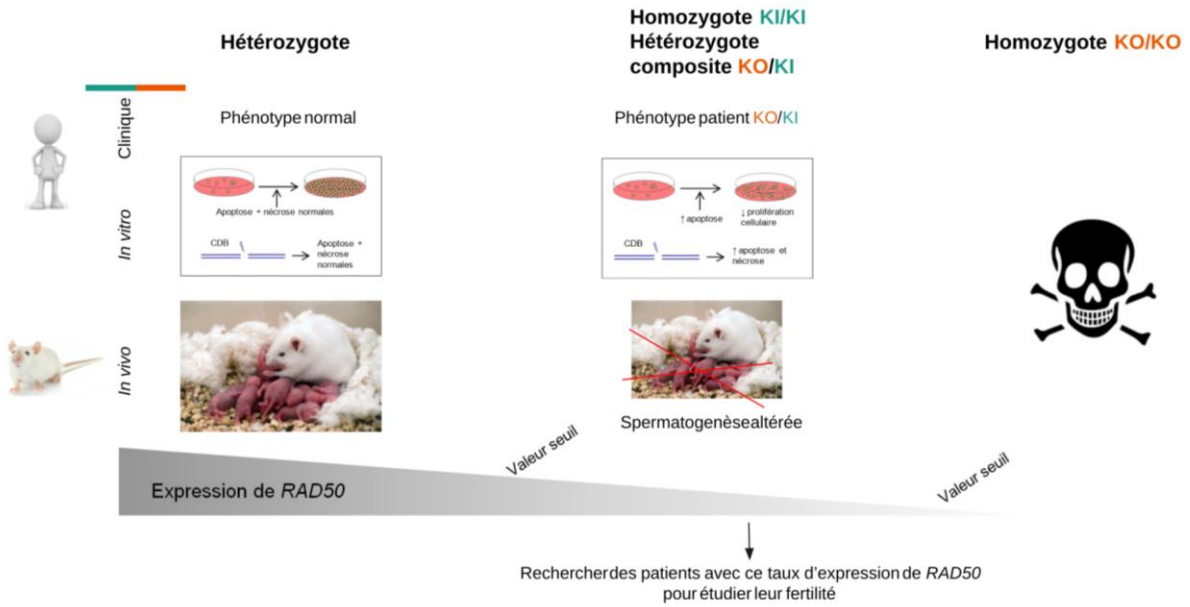


Figure 49 : Modèle mettant en relation le niveau d'expression de RAD50 et son impact phénotypique.

Expression protéique de *RAD50*.
Les résultats de RT-qPCR sont à compléter par une analyse *Western blot* (WB) pour conclure quant à l'expression protéique de *RAD50* dans chacune des lignées d'intérêt. Cette expérience est actuellement en cours. L'anticorps utilisé, de référence 13B3/2C6 (ab89) Abcam□, reconnait les 425 premiers acides aminés en N-terminal. Il permet de mettre en évidence les formes entières (150kDa) plus ou moins tronquées mais stables de RAD50.

Ce résultat de WB est très attendu et notamment pour la lignée KO/del. En effet, cette lignée pourrait servir de modèle cellulaire d'étude du patient P1. Il comporte lui aussi un allèle KO et un allèle del présentant 2 codons en moins, à 7 et 8 acides aminés de distance de l'acide glutamique E1035 délété chez le patient P1. Comme chez ce patient, la délétion créée devrait perturber la structure en heptamère d'acides aminés du domaine de bobine enroulée de RAD50 et donner une protéine partiellement fonctionnelle (48). En ce sens, parmi les deux acides aminés délétés, l'arginine est polaire. Sa suppression fait donc disparaître un motif chargé, important pour les liaisons ioniques dans la structure 3D des protéines. Les résultats des expériences *in vitro* orientent également vers l'idée d'une protéine RAD50 altérée devant les perturbations fonctionnelles objectivées dans la lignée $RAD50^{KO/del}$. En effet, les cellules prolifèrent moins, ce qui est majoré en cas d'induction d'une cassure double brin. Ce stress ne peut pas être correctement pris en charge par RAD50 et induit de l'apoptose et de la nécrose cellulaire.

L'analyse par WB permettra de conclure sur la capacité de l'allèle del qui code pour un transcrit stable détecté par RT-qPCR à produire une protéine. De plus, le résultat du WB apportera des informations sur le poids moléculaire, la stabilité et la quantité protéique de RAD50.

Nous faisons l'hypothèse qu'une protéine RAD50 sera effectivement détectée et donc stable, puisqu'une absence totale n'est pas viable, comme démontré dans la littérature (49,50). Nos résultats vont également dans ce sens puisqu'aucune souris ni clone fibroblastique de génotype KO/KO n'a été obtenu.

RAD50, une protéine complexe.
La littérature montre que suivant la façon dont on module *RAD50,* l'impact fonctionnel n'est pas le même.

Tout d'abord, un modèle d'étude de génotype hétérozygote Rad50$^{+/46}$ a entraîné une perturbation du DDR (50). Ainsi, la modification +46 est suffisamment toxique pour impacter le phénotype des souris dès l'état hétérozygote – l'état homozygote n'était d'ailleurs pas viable. C'est pour le moment le seul génotype hétérozygote avec impact phénotypique.

De plus, des effets différentiels ont été observés selon le domaine impacté de *RAD50*. En effet, c'est parfois le processus d'apoptose qui sera majoré (46,51) contrairement à d'autres modèles (49,50). La voie du DDR peut être activée massivement et en continu pour un modèle de souris (50), ne plus être déclenchée pour les deux patientes doublement mutées dans *RAD50* (52,53) ou encore ne pas être altérée chez le patient P1 (48). La RRH n'est pas toujours détériorée suivant que MRE11 présente un défaut d'activité exonucléasique liée à une mutation de *RAD50* pour le patient P1 (48) ou que MRE11 et NBS1 soient seulement moins recrutés (52). L'impact sur *RAD50* peut également être à l'origine de prédisposition à des cancers (51), entraîner de la tumorigenèse hépatique (50) ou encore une aplasie médullaire qui est un facteur de risque de leucémies aiguës (48). Le cycle cellulaire est parfois normal, comme pour le patient P1 (48), mais il peut aussi être bloqué en phase G2 dans les fibroblastes de la patiente hétérozygote composite (52).

Enfin, concernant la fertilité, les deux sexes peuvent être impactés comme dans le modèle de souris Rad50$^{+/46}$ (50). Une autre étude a montré que seuls les mâles étaient touchés par le génotype Rad50$^{S/S}$, les femelles étant fertiles (51).

On pourrait expliquer ces effets différentiels par le fait que RAD50 comporte de nombreux sites avec des activités différentes : le domaine de bobine enroulée assurant la liaison à l'ADN et le maintien de la conformation 3D du complexe MRN , les domaines d'assemblage aux autres membres du complexe MRN, les domaines ATPasiques et le domaine crochet permettant la dimérisation du complexe MRN (40). Ainsi, selon le site touché, toutes les fonctions de RAD50 ne seront pas altérées et pas de la même façon.
On a également retrouvé cette hétérogénéité dans nos expériences *in vitro* : les cellules de génotype KO/del entrent à la fois en nécrose et en apoptose après survenue d'une CDB quand les fibroblastes à expression drastiquement réduite de *RAD50* sont dirigés seulement vers l'apoptose après induction de ce stress. Également, le défaut de prolifération cellulaire de la lignée RAD50$^{KO/del}$ ne s'explique pas par un excès de mort cellulaire comme c'est le cas pour les cellules transduites par le shRNA dirigé contre *RAD50*. Selon que l'on soit en présence d'une protéine normale mais en quantité réduite ou d'un reliquat modifié, l'impact fonctionnel n'est donc pas le même.

Ainsi, des tests fonctionnels *in vitro* doivent compléter nos résultats pour mettre en évidence le ou les rôles de RAD50 altérés lorsque l'on diminue son expression ou que l'on modifie son génotype et qui sont à l'origine de la baisse de la prolifération cellulaire et de l'excès d'apoptose ou de nécrose.

Par technique WB, la quantification de la protéine ATM dans sa forme phosphorylée permettra de contrôler l'activation de la voie du DDR après induction d'une CDB. Le dosage des autres protéines co-activées comme MRE11, NBS1 ou encore p53 dans leur forme non phosphorylée permettra d'objectiver leur recrutement et des formes phosphorylées de mettre en évidence leur activation.
La mutation dans le domaine de liaison à l'ADN induite par Roset *et al.* dans des fibroblastes de souris a entraîné un défaut de signalisation entre le complexe MRN et la protéine ATM (50), qui était activée de façon chronique. Ce résultat a été mis en évidence par un excès des formes phosphorylées de H2AX et ATM au WB, sans induction de CDB.
Un WB après une irradiation par 5Gy des fibroblastes des deux patientes doublement mutées dans *RAD50* a permis de montrer que RAD50, p53, SMC1 et ATM n'étaient pas correctement activés. En effet, leur forme phosphorylée était significativement moins présente que pour les fibroblastes contrôles, voire absente (52,53).
Cependant, la voie du DDR dépendante d'ATM et entraînant la cascade de phosphorylation des acteurs en aval n'est pas impactée chez le patient P1 (48). La lignée RAD50$^{KO/del}$ ayant une modification proche des fibroblastes du patient P1, il est possible que la voie du DDR ne soit pas perturbée non plus.

Il sera intéressant de voir si l'activité ATPasique de RAD50 est altérée en déposant de l'ATP comportant un phosphate radioactif en présence de la protéine modifiée de la lignée RAD50$^{KO/del}$. En conditions normales, RAD50 hydrolyse l'ATP, libérant le phosphate radioactif et entraînant une augmentation de la radioactivité. Deshpande *et al.* ont montré qu'une mutation touchant n'importe lequel des sites de liaison à l'ATP de RAD50 entraîne un défaut de son hydrolyse (55). Chez le patient P1, la liaison de RAD50 à l'ATP est normale (48). L'hypothèse la plus probable est celle d'observer un résultat similaire dans la lignée RAD50$^{KO/del}$.

Enfin, il pourrait être intéressant de mesurer l'impact de la modification de RAD50 sur l'activité exonucléasique de MRE11. Pour cela, des fragments d'ADN sont déposés sur un gel en présence du complexe MRN. S'ils ne sont pas correctement clivés, c'est le recrutement ou l'activation de MRE11 par RAD50 qui est altéré. C'est de cette manière que Chansel *et al.* ont démontré que la protéine MRE11 du patient P1 avait une activité exonucléasique altérée, par défaut d'hydrolyse des substrats d'ADN de 50pb (48). Ce résultat est alors attendu dans la lignée RAD50$^{KO/del}$ puisque la perturbation occasionnée dans l'allèle del est très proche de la mutation E1035.

De plus, une transduction des cellules RAD50$^{KO/del}$ par le lentivirus de surexpression de *RAD50* validé au cours de ce travail de thèse permettrait d'effectuer un sauvetage génique. Ainsi, on pourrait conclure que le défaut de *RAD50* serait le seul élément à l'origine des perturbations fonctionnelles responsables de l'excès de nécrose et d'apoptose 24h après l'induction d'une CDB. Cette technique a été réalisée dans les fibroblastes de la patiente de 23 ans hétérozygote composite pour *RAD50*, ce qui a permis de récupérer les fonctions de RAD50 qui étaient altérées (52) : la phosphorylation activatrice des acteurs du DDR a été restaurée.

En outre, les outils de modulation de l'expression de *RAD50* étant validés, il serait intéressant de reproduire ces différentes expériences visant à mesurer leur impact fonctionnel sur des lignées cellulaires d'intérêts. En effet, les fibroblastes utilisés ici présentent l'avantage d'être des cellules primaires et humaines. Cependant, les cassures doubles brins induites sont prises en charge en conditions mitotiques, ce qui ne reflète pas l'activité de RAD50 dans les cellules germinales.
Ainsi, des spermatocytes pourraient être isolés de déchets de soins issus de biopsies testiculaires humaines. Leur immortalisation nécessaire pourrait être réalisée par transduction lentivirale de hTERT ou SV40, des inhibiteurs de télomérases. Dans ces cellules, il sera par la suite possible de se rapprocher de conditions méiotiques.

Perspectives en oncologie.
RAD50 pourrait être impliqué dans le cancer. En effet, des mutations somatiques ont été identifiées chez l'homme (41. Étant un gène impliqué dans la prise en charge des cassures doubles brins et notamment dans la méiose, il pourrait ainsi être au carrefour de l'infertilité et du cancer, comme ses homologues *FANCM* et *BRCA* (29,34,35,38,39). Le cas échéant, il sera utile d'effectuer un diagnostic précis de ces patients *RAD50* mutés afin de prévenir la survenue de cancer et d'effectuer un conseil génétique adapté en cas de risque de transmission à la descendance.

Ce gène a d'ailleurs rejoint le panel des gènes de prédisposition séquencés à Bordeaux en cancérologie, afin de recueillir des données et d'établir son potentiel d'implication dans le cancer. Il sera intéressant d'étudier la fertilité des patients présentant une mutation dans *RAD50* et de leur famille. Et ce, d'autant plus qu'il n'a pas été possible d'explorer la fertilité des deux patientes avec mutation biallélique (52,53). Retrouver ces patientes serait d'un grand intérêt : étudier leur réserve ovarienne et leurs cycles *via* des dosages hormonaux et analyser leur arbre généalogique à la recherche de troubles de la fertilité permettraient d'explorer l'implication de *RAD50* dans la reproduction humaine. De même, un spermogramme pourrait être proposé aux hommes mutés pour *RAD50*.

A plus long terme et en cas de mise en évidence de mutation impliquées dans l'infertilité, *RAD50* pourra rejoindre le panel des gènes séquencés chez les patients présentant des difficultés à concevoir.

Références bibliographiques

(1) *Infertilité [Internet]. Who.int. 2021. Available from: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/infertility*

(2) *Agence de la biomédecine [Internet]. Rams.agence-biomedecine.fr. 2021. Available from: https://rams.agence-biomedecine.fr/principaux-chiffres-de-lactivite*

(3) *Khoshnood B, Bouvier-Colle M, Leridon H, Blondel B. Impact de l'âge maternel élevé sur la fertilité, la santé de la mère et la santé de l'enfant. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. 2008;37(8):733-747.*

(4) *Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. Nature Reviews Urology. 2018;15(6):369-384.*

(5) *Canipari R, De Santis L, Cecconi S. Female Fertility and Environmental Pollution. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17(23):8802.*

(6) *Organization, W., 2021. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization.*

(7) *Recommandations de l'AFU et de la SALF concernant l'évaluation de l'homme infertile [Internet]. Urofrance.org. 2021. Available from: https://www.urofrance.org/base-bibliographique/recommandations-de-lafu-et-de-la-salf-concernant-levaluation-de-lhomme*

(8) *Boehm U, Bouloux P, Dattani M, de Roux N, Dodé C, Dunkel L et al. European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. Nature Reviews Endocrinology. 2015;11(9):547-564*

(9) *Deebel N, Bradshaw A, Sadri-Ardekani H. Infertility considerations in klinefelter syndrome: From origin to management. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2020;34(6):101480.*

(10) *Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A et al. Analysis of Meiosis in Intratesticular Germ Cells from Subjects Affected by Classic Klinefelter's Syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999;84(10):3807-3810.*

(11) *Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA / EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. Andrology. 2013;2(1):5-19.*

(12) *de Souza D, Faucz F, Pereira-Ferrari L, Sotomaior V, Raskin S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. Andrology. 2017;6(1):127-135.*

(13) *Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H et al. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. Human Molecular Genetics. 2009;18(7):1301-1309.*

(14) *Fesahat F, Henkel R, Agarwal A. Globozoospermia syndrome: An update. Andrologia. 2019;52(2).*

(15) *Beke A. Genetic Causes of Female Infertility. Experientia Supplementum. 2019;:367-383.*

(16) *Lie Fong S, Schipper I, Valkenburg O, de Jong F, Visser J, Laven J. The role of anti-Müllerian hormone in the classification of anovulatory infertility. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2015;186:75-79.*

(17) *Stérilité du couple : conduite de la première consultation [Internet]. Cngof.net. 2021. Available from: http://www.cngof.net/E-book/GO-2016/CH-13.html*

(18) *Wathen N, Perry L, Lilford R, Chard T. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. BMJ. 1984;288(6410):7-9.*

(19) *Tal R, Seifer D. Ovarian reserve testing: a user's guide. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2017;217(2):129-140.*

(20) *Fortuño C, Labarta E. Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2014;31(12):1573-1585.*

(21) *Lesourd F. Syndrome de Turner et désir de grossesse. Le syndrome de Turner. 2009;:103-108.*

(22) *Christin-Maitre S, Pasquier M, Donadille B, Bouchard P. L'insuffisance ovarienne prématurée. Annales d'Endocrinologie. 2006;67(6):557-566.*

(23)*Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L et al. Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2018;29(6):400-419.*
(24)*Larose H, Shami A, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud S. Gametogenesis: A journey from inception to conception. Current Topics in Developmental Biology. 2019;:257-310*
(25)*Li L, Yang R, Yin C, Kee K. Studying human reproductive biology through single-cell analysis and in vitro differentiation of stem cells into germ cell-like cells. Human Reproduction Update. 2020;26(5):670-688.*
(26)*Smith P, Wilhelm D, Rodgers R. Development of mammalian ovary. Journal of Endocrinology. 2014;221(3):R145-R161.*
(27)*Baker T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences. 1963;158(972):417-433.*
(28)*Bolcun-Filas E, Handel M. Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. Biology of Reproduction. 2018;99(1):112-126.*
(29)*Baudat F, Imai Y, de Massy B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. Nature Reviews Genetics. 2013;14(11):794-806.*
(30)*Ishiguro K. The cohesin complex in mammalian meiosis. Genes to Cells. 2018;24(1):6-30.*
(31)*Le Quesne Stabej P, Williams H, James C, Tekman M, Stanescu H, Kleta R et al. STAG3 truncating variant as the cause of primary ovarian insufficiency. European Journal of Human Genetics. 2015;24(1):135-138.*
(32)*Robay A, Abbasi S, Akil A, El-Bardisi H, Arafa M, Crystal R et al. A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. Arab Journal of Urology. 2018;16(1):53-64.*
(33)*Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation inTEX15causing spermatogenic failure in a Turkish family. Human Molecular Genetics. 2015;24(19):5581-5588.*
(34)*Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. eLife. 2017;6.*
(35)*Lopes J, Chaudhry S, Lopes G, Levin N, Tainsky M. FANCM, RAD1, CHEK1 and TP53I3 act as BRCA-like tumor suppressors and are mutated in hereditary ovarian cancer. Cancer Genetics. 2019;235-236:57-64.*
(36)*Oh J, Symington L. Role of the Mre11 Complex in Preserving Genome Integrity. Genes. 2018;9(12):589.*
(37)*Nagirnaja L, Aston K, Conrad D. Genetic intersection of male infertility and cancer. Fertility and Sterility. 2018;109(1):20-26.*
(38)*Oktay K, Turan V, Titus S, Stobezki R, Liu L. BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging1. Biology of Reproduction. 2015;93(3).*
(39)*Caburet S, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S et al. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. Journal of Medical Genetics. 2020;58(2):125-134.*
(40)*Lavin M, Kozlov S, Gatei M, Kijas A. ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. Biomolecules. 2015;5(4):2877-2902.*
(41)*Bian L, Meng Y, Zhang M, Li D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. Molecular Cancer. 2019;18(1).*
(42)*Williams R, Zhang X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2021;163:109-119.*
(43)*Cherry S, Adelman C, Theunissen J, Hassold T, Hunt P, Petrini J. The Mre11 Complex Influences DNA Repair, Synapsis, and Crossing Over in Murine Meiosis. Current Biology. 2007;17(4):373-378.*
(44)*Theunissen J, Kaplan M, Hunt P, Williams B, Ferguson D, Alt F et al. Checkpoint Failure and Chromosomal Instability without Lymphomagenesis in Mre11ATLD1/ATLD1 Mice. Molecular Cell. 2003;12(6):1511-1523.*
(45)*Bonache S, Algaba F, Franco E, Bassas L, Larriba S. Altered gene expression signature of early stages of the germ line supports the pre-meiotic origin of human spermatogenic failure. Andrology. 2014;2(4):596-606.*
(46)*Hu M, Li L, Liu S, Lou Y, Wang L, Le F et al. Decreased expression of MRE11 and RAD50 in testes from humans with spermatogenic failure. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2020;37(2):331-340.*

(47) *Zhang B, Tang Z, Li L, Lu L. NBS1 is required for SPO11-linked DNA double-strand break repair in male meiosis. Cell Death & Differentiation. 2020;27(7):2176-2190.*
(48) *Chansel-Da Cruz M, Hohl M, Ceppi I, Kermasson L, Maggiorella L, Modesti M et al. A Disease-Causing Single Amino Acid Deletion in the Coiled-Coil Domain of RAD50 Impairs MRE11 Complex Functions in Yeast and Humans. Cell Reports. 2020;33(13):108559.*
(49) *Luo G, Yao M, Bender C, Mills M, Bladl A, Bradley A et al. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(13):7376-7381.*
(50) *Roset R, Inagaki A, Hohl M, Brenet F, Lafrance-Vanasse J, Lange J et al. The Rad50 hook domain regulates DNA damage signaling and tumorigenesis. Genes & Development. 2014;28(5):451-462.*
(51) *Bender C. Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50S/S mice. Genes & Development. 2002;16(17):2237-2251.*
(52) *Waltes R, Kalb R, Gatei M, Kijas A, Stumm M, Sobeck A et al. Human RAD50 Deficiency in a Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder. The American Journal of Human Genetics. 2009;84(5):605-616.*
(53) *Ragamin A, Yigit G, Bousset K, Beleggia F, Verheijen F, Wit M et al. Human RAD50 deficiency: Confirmation of a distinctive phenotype. American Journal of Medical Genetics Part A. 2020;182(6):1378-1386.*
(54) *Jiang F, Doudna J. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. Annual Review of Biophysics. 2017;46(1):505-529.*
(55) *Deshpande R, Lee J, Paull T. Rad50 ATPase activity is regulated by DNA ends and requires coordination of both active sites. Nucleic Acids Research. 2017;45(9):5255-5268.*
(56) *Ihry R, Worringer K, Salick M, Frias E, Ho D, Theriault K et al. p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. Nature Medicine. 2018;24(7):939-946.*
(57) *Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nature Medicine. 2018;24(7):927-930.*
(58) *Enache O, Rendo V, Abdusamad M, Lam D, Davison D, Pal S et al. Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations. Nature Genetics. 2020;52(7):662-668.*

Annexes

	Amorce sens	Amorce anti-sens	Tm
PCR			
RAD50	ACTTGCTGTCACCAGTTGCC	ATTTGCAAAACCTGCATTTGACC	51°
FAM	TGATGAAAGACATCAGGGCGA	AGGCCAGTTCAAACGCTCTT	56°
SORCS1	TTGGATCTGAGTGCTGAACTGG	TGAACGCCCCACAAATGCTC	53°
RT-qPCR			
RAD50	AACTCTGGAAGGAGTCATTACTA	TTGCTGAAAAAATCTCATCAAACT	62°
TPB	AGTGAAGAACAGTCCAGACTG	CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT	62°
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGGTCCACCACTGACACGTT	62°

Annexe 1 : séquences et températures d'hybridation des amorces de PCR de RAD50, de FAM et de SORCS1 et de RT-qPCR de RAD50, TBP et GAPDH.

Titre : Implication de RAD50 dans l'infertilité

Résumé : RAD50 est un acteur de prise en charge des cassures doubles brins (CDB) indispensables à la ségrégation des chromosomes homologues durant la méiose.
Alors que ce gène semble être un bon candidat, peu de publications étudient un possible rôle de *RAD50* dans l'infertilité.
L'objectif a été d'étudier l'impact de la modulation de l'expression de *RAD50* sur la fertilité des souris mâles et sur la prise en charge d'une cassure double brin dans des cellules humaines.
Dans une première approche, des coupes histologiques testiculaires provenant d'un modèle murin muté pour *Rad50* ont été effectuées pour l'analyse de l'architecture de l'épithélium séminifère.
La deuxième approche *in vitro*, a consisté en l'étude de l'impact d'une cassure double brin induite par CRISPR-Cas9, réalisées dans des fibroblastes humains dans lesquels l'expression de *RAD50* a été modulée par deux approches (shRNA et édition génomique).
Les souris mâles mutantes présentent une diminution de la taille de leur testicule et de leurs tubes séminifères (TS). Dans la lumière des TS, aucun spermatozoïde n'a été observé et les spermatocytes semblent bloqués en prophase I, moment où RAD50 intervient au cours de la méiose.
Par ailleurs, un seuil d'expression de *RAD50* inférieur à 10%, obtenu par le shRNA anti-*RAD50,* impacte la prolifération cellulaire, par excès d'apoptose, majoré par l'induction d'une CDB.
Ainsi, l'exploration de RAD50 dans la fertilité doit être poursuivie, par étude de la fertilité des femelles mutantes et en tentant de reproduire ces expérimentations en conditions méiotiques.

Mots clés : RAD50 – Complexe MRN- Infertilité - Cassure double brin – Méiose

---

Title : Impact of RAD50 on fertility

Abstract : RAD50 has a major role in double strand breaks' (DSB) repair, which is essential for homologous chromosome pairing during meiosis.
While *RAD50* seems to be a good candidate gene in hereditary infertility, there are few publications on its possible role.
The aim was to study the impact of *RAD50'*s expression on male mice's fertility and then on its role in repairing DSBs within human cells.
The mutated mice had reduced testicles and histological sections revealed that they had seminiferous epithelium architecture abnormalities. No spermatozoa was present in seminiferous tubules. Spermatocytes seemed to be locked in the first prophase, which is when RAD50 plays its role.
To evaluate DSB's impact in human RAD50-deficient cells, we altered *RAD50'*s expression by shRNA and genome editing in human primary foreskin fibroblasts (hFF). We then induced a DSB by CRISPR-Cas9 and studied viability/cell death in this cell model. We observed that RAD50 is essential for human cell survival and that low *RAD50's* expression compromise cellular proliferation, and induce excessive apoptosis after DSB.
Our preliminary results suggest that the exploration of RAD50 in fertility needs to be further developed, with the study of mutated female's fertility and by reproducing these experiments under meiotic conditions.

Keywords : RAD50 - MRN complex - infertility - Double strand break - Meiosis

---

DISCIPLINE : BIOLOGIE MEDICALE

Unité INSERM 1035 - Équipe Biothérapie

Université de Bordeaux - Campus Carreire

Bâtiment TP Zone Sud, 146 Rue Léo Saignat 4ème étage, 33000 Bordeaux

---