

Aspects moléculaires de la spermatogenèse : la réparation post-réplication de l'ADN et le système ubiquitine.

J.A. GROOTEGOED¹, R. VAN DER LAAN², H. P. ROEST², W.M. BAARENDS¹

*Department of Endocrinology and Reproduction¹ and MGC-Department of Cell Biology and Genetics²,
Erasmus University Rotterdam. P.O. Box 1738, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands*

RÉSUMÉ

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, ubiquitaire et hautement conservée, qui peut être liée de manière covalente à des protéines cellulaires par un processus multi-enzymatique. La mono- ou poly-ubiquitination représente un signal induisant des modifications fonctionnelles des protéines ou leur dégradation. Le système d'ubiquitination est essentiel pour toutes les cellules eucaryotes. De nombreux composants de ce système présentent une remarquable conservation à travers l'évolution des espèces, de la levure aux mammifères. Des aspects spécifiques du système ubiquitine apparaissent importants pendant la gamétogenèse. Le gène *HR6B* est un homologue autosomique du gène *RAD6* de levure qui code pour une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. *RAD6* est impliquée, chez la levure, dans diverses fonctions cellulaires comme la sporulation, la réparation de l'ADN et la mutagenèse. L'inactivation du gène *HR6B* chez la souris provoque une infertilité mâle par trouble de la spermatogenèse. Des composants du système ubiquitine apparaissent impliqués dans différentes étapes de la gamétogenèse dont le contrôle de la méiose et la réorganisation de la structure de la chromatine.

Mots clés : spermatogenèse, ubiquitine, chromatine, méiose.

Les espèces eucaryotes, des levures aux mammifères, reposent sur un nombre impressionnant de mécanismes multi-enzymatiques interactifs qui agissent sur l'ADN, catalysant et contrôlant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Pendant la gamétogenèse, les mécanismes de réparation de l'ADN sont impliqués non seulement dans la réparation des différents dommages subis par l'ADN dans les cellules de la lignée germinale en développement, mais sont aussi impliqués dans les processus de recombinaison méiotique et d'autres aspects des remaniements et réorganisations de la chromatine.

Les différents mécanismes primitivement impliqués dans la réparation de l'ADN sont : la réparation de l'excision d'un nucléotide, la réparation de l'excision d'une base, la réparation des misappariements, la réparation des recombinaisons homologues et la réparation post-réplication. Nous envisagerons essentiellement ici la réparation post-réplication en relation avec le phénomène d'ubiquitination des protéines.

La réparation post-réplication ne s'exerce pas de manière directe sur l'ADN. Le mécanisme de réparation s'effectue pendant la phase S de la mitose des cellules somatiques qui effectuent la réplication à partir du modèle d'ADN

Traduction par H. Lejeune

altéré. Il se trouve que plusieurs protéines du mécanisme de réparation post-réplication jouent un rôle important et inattendu dans la gamétogenèse, en particulier durant la prophase de méiose et dans le développement post-méiotique des spermatozoïdes. L'une des nombreuses questions concernant le rôle des protéines de réparation post-réplication dans la gamétogenèse est de savoir si ce rôle concerne la réparation elle-même ou d'autres aspects des modifications de la chromatine.

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes impliqués dans la réparation post-réplication de l'ADN font partie de la famille du gène *RAD6*. L'expression du gène *RAD6* de levure est fortement induite par l'exposition aux U.V. et lors de la méiose. Les mutants ayant un gène inactivé ont des phénotypes variés, incluant des déficits de la répression de l'expression des gènes et un déficit de sporulation [6]. Dans les cellules de mammifère, deux gènes homologues de *RAD6*, de séquence hautement conservée, ont été identifiés ; le gène *HR6A* porté par le chromosome X et le gène autosomique *HR6B* [5]. Du fait du haut degré de conservation pendant l'évolution de ces deux gènes homologues, de l'induction de l'expression de *RAD6* pendant la méiose et de son rôle dans la sporulation, il était tentant pour nous de faire l'hypothèse que les protéines *HR6A* et *HR6B* pouvaient être impliquées dans la gamétogenèse. Il est toutefois important de noter que les gènes codant pour ces deux protéines sont exprimés dans pratiquement tous les types cellulaires. Quand des souris ayant les gènes *HR6A* et *HR6B* inactivés ont été générées, il n'a pas été observé d'anomalie phénotypique majeure, ce qui s'explique par des redondances fonctionnelles pour les protéines codées par ces deux gènes dans les cellules somatiques (les protéines ont 96% d'homologie dans la séquence des acides aminés) [5, 9]. La fonction combinée de ces protéines est hautement importante, en effet il a été impossible d'obtenir des animaux ayant la double inactivation *HR6A/HR6B* qui se traduit par une mortalité embryonnaire très précoce. En ce qui concerne le rôle des homologues de *RAD6* des mammifères dans la gamétogenèse, les résultats ont dépassé nos attentes. Il est apparu que les souris ayant le gène *HR6A*

inactivé présentent une infertilité observée chez les femelles (arrêt du développement embryonnaire au stade 2 cellules) avec une fertilité normale des mâles [4, 9, observations non publiées]. Au contraire, les souris ayant le gène *HR6B* inactivé présentent une altération de la spermatogenèse et une infertilité uniquement chez les mâles [9].

Le gène *RAD6* code pour une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2 enzyme), qui intervient dans la modification ou la dégradation des protéines par la voie de l'ubiquitine. Nous avons discuté en détail du rôle de la voie de l'ubiquitine dans la gamétogenèse [2]. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés. Indépendamment de sa petite taille, son importance fonctionnelle est majeure. L'ubiquitine est présente dans toutes les cellules et a un rôle essentiel dans toute une variété de fonctions cellulaires fondamentales. Ce rôle nécessite le couplage covalent de l'ubiquitine à des substrats cellulaires, pour donner lieu, à une mono- ou une poly-ubiquitination, à la suite d'un processus enzymatique complexe. La poly-ubiquitination représente un signal pour la destruction de la protéine alors que la mono-ubiquitination est un signal de modification fonctionnelle. L'ubiquitine et beaucoup des composants du système d'ubiquitination sont exprimés dans tous les types cellulaires. De plus, la mutation du gène humain largement exprimé *USP9Y* (encore appelé *DFFRY*), porté par le chromosome Y, et qui code pour une enzyme qui catalyse la réaction inverse à l'ubiquitination (réaction de déubiquitination), ne donne pas de phénotype somatique particulier mais affecte uniquement la spermatogenèse [10]. Chez la souris, le premier modèle d'inactivation génique d'un composant du système ubiquitine, l'inactivation de *HR6B*, ne donne pas de phénotype particulier sauf en ce qui concerne la stérilité des mâles avec altération de la spermatogenèse [9]. La mutation de *USP9Y* chez l'homme donne lieu à un arrêt partiel de la spermatogenèse au stade de spermatozoïde avec persistance seulement de quelques cellules post-méiotiques [10]. Ce phénotype rappelle celui de l'inactivation de *HR6B* chez la souris, où le développement des cellules germinales est affecté au stade de la méiose et dans la phase post-méiotique, bien que, chez la

souris, l'altération de la spermatogenèse semble prédominer à la phase post-méiotique, pendant la condensation du noyau. Ces observations et d'autres [2] indiquent un rôle très important du système ubiquitine dans la spermatogenèse.

Il est probable que les histones H2A et H2B, ainsi que vraisemblablement d'autres protéines chromosomiques, fassent partie des protéines cibles de l'ubiquitination dépendant de RAD6 [1, 8]. Dans la spermatogenèse des mammifères, HR6B pourrait jouer un rôle dans la transition histone – protamine qui se produit lors de la condensation des spermatides [1]. De plus, l'ubiquitination dépendant de HR6B peut s'exercer sur des protéines impliquées dans le contrôle de l'expression de gènes et les remaniements de la chromatine pendant la prophase de méiose. Les souris dont le gène *HR6B* a été inactivé ont une augmentation de l'apoptose des spermatocytes, par contre il n'est pas observé de blocage de la méiose [1, observations non publiées]. La disparition des cellules germinales survient principalement pendant le développement post-méiotique et, au mieux, un faible nombre de spermatozoïdes très anormaux est présent dans l'épididyme [9].

La protéine *RAD6* de levure forme un complexe stable avec la protéine *RAD18*. Ce complexe possède des activités de conjugaison de l'ubiquitine et de liaison de l'ADN simple brin [3]. Le gène *RAD18* de levure code pour une protéine qui possède un domaine en anneau de doigt de zinc (RING-zinc-finger) et un doigt de zinc classique liant l'ADN. Ces deux domaines sont hautement conservés entre *RAD18* et son homologue de mammifère *mRAD18Sc* récemment cloné [11]. Le domaine en anneau de doigt de zinc se trouve dans les protéines impliquées dans des complexes multiprotéiques, suggérant que ce domaine est impliqué dans des interactions protéines-protéines. En particulier, le domaine en anneau de doigt de zinc a été trouvé dans des protéines ayant une activité enzymatique de liaison de l'ubiquitine (E3 enzymes), et qui sont impliquées dans le contrôle de la spécificité du substrat des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2 enzymes) [7].

L'homologue des mammifères de *RAD18*, *mRAD18Sc* a son plus haut niveau d'expression dans le testicule et en particulier dans les spermatocytes primaires [11]. Ceci nous incite à postuler que pendant la spermatogenèse chez les mammifères, *mRAD18Sc* peut être impliquée dans la fonction d'ubiquitination des protéines par HR6B. Les protéines cibles de HR6B (pouvant être complexées avec *mRAD18Sc*) dans les cellules germinales restent à identifier. On pense que ces protéines cibles peuvent être impliquées dans des aspects généraux des modifications de la chromatine et dans l'expression des gènes pendant la gamétogenèse et non pas seulement dans la réparation post-replication de l'ADN.

Un grand nombre de gènes codant pour des protéines qui prennent part à différents mécanismes de réparation de l'ADN ont une expression prédominante ou spécifique pendant la gamétogenèse. En effet, beaucoup de modèles d'inactivation de l'un de ces gènes chez la souris donnent lieu à une infertilité mâle ou femelle. Pour le futur, il sera important d'établir la relation précise entre la réparation de l'ADN et la dynamique des modifications de la chromatine comme le maintien de la longueur des télomères, l'empreinte génomique et l'instabilité génomique.

RÉFÉRENCES

1. BAARENDS W.M., HOOGERBRUGGE J.W., ROEST H.P. *et al.* : Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 1999, 207 : 322-333.
2. BAARENDS W.M., ROEST H.P., GROOTE-GOED J.A. : The ubiquitin system in gametogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1999, 151: 5-16.
3. BAILLY V., LAMB J., SUNG P., PRAKASH S., PRAKASH L. : Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential mechanism for targeting *RAD6* ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.*, 1994, 8 : 811-820.
4. GROOTE-GOED J.A., BAARENDS W.M., ROEST H.P., HOEIJMAKERS J.H. : Knockout mouse models and gametogenic failure. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1998, 145 : 161-166.
5. KOKEN M.H., REYNOLDS P., JASPERS-

- DEKKER I. *et al.* : Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88 : 8865-8869.
6. LAWRENCE C. : The RAD6 repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *BioAssays*, 1994, 16 : 253-258.
 7. LORICK K.L., JENSEN J.P., FANG S., ONG A.M., HATAKEYAMA S., WEISSMAN A.M. : RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, 96 : 11364-11369.
 8. ROBZYK K., RECHT J., OSLEY M.A. : Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 2000, 287 : 501-504.
 9. ROEST H.P., VAN KLAVEREN J., DE WIT J. *et al.* : Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes a defect in spermatogenesis associated with chromatin modification. *Cell*, 1996, 86 : 799-810.
 10. SUN C., SKALETSKY H., BIRREN B. *et al.* : An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet.*, 1999, 23 : 429-432.
 11. VAN DER LAAN R., ROEST H., HOOGERBRUGGE J. *et al.* : Characterization of mRAD18Sc, a mouse homolog of the yeast post-replication repair gene RAD18. *Genomics*, 2000, 67 : sous presse.
- components of the complex ubiquitin system show remarkable evolutionary conservation, from yeast to mammalian species. Interestingly, during gametogenesis, many specialized and important aspects of the ubiquitin system become apparent. The HR6B gene is a mammalian, autosomal homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* gene RAD6 encoding a ubiquitin-conjugating enzyme. RAD6 in yeast is required for a variety of cellular functions, including sporulation, DNA repair, and mutagenesis. Male infertility in HR6B knockout mice is associated with impairment of spermatogenesis. Components of the ubiquitin system appear to be involved in different steps and processes during gametogenesis, including control of meiosis, and reorganization of chromatin structure.**

Key-words: spermatogenesis, ubiquitin, chromatin, meiosis

ABSTRACT

Molecular aspects of spermatogenesis: post-replication DNA repair and the ubiquitin system.

J.A. GROOTEGOED, R. VAN DER LAAN,
H. P. ROEST, W.M. BAARENDS

Ubiquitin is a ubiquitous and highly conserved protein of 76 amino acid residues, that can be covalently attached to cellular acceptor proteins through a multi-step enzymatic pathway. Mono- or poly-ubiquitination of proteins can lead to protein degradation or modification of protein activity. The ubiquitin system is essential to all eukaryotic cells. Many