



HAL
open science

ETUDE DES REMANIEMENTS ÉPIGÉNÉTIQUES AU MOMENT DE L'EGA CHEZ LE BOVIN À L'AIDE D'APPROCHES CORRÉLATIVES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Martine Letheule, Aurélie Allais-Bonnet, Marie-Christine Deloche, Ludivine Laffont, Hélène Jammes, Véronique Duranthon, Hélène Kiefer, Amélie Bonnet-Garnier

► To cite this version:

Martine Letheule, Aurélie Allais-Bonnet, Marie-Christine Deloche, Ludivine Laffont, Hélène Jammes, et al. ETUDE DES REMANIEMENTS ÉPIGÉNÉTIQUES AU MOMENT DE L'EGA CHEZ LE BOVIN À L'AIDE D'APPROCHES CORRÉLATIVES EN MICROSCOPIE OPTIQUE. 10^{èmes} Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE, Nov 2021, TOURS, France. hal-03517503

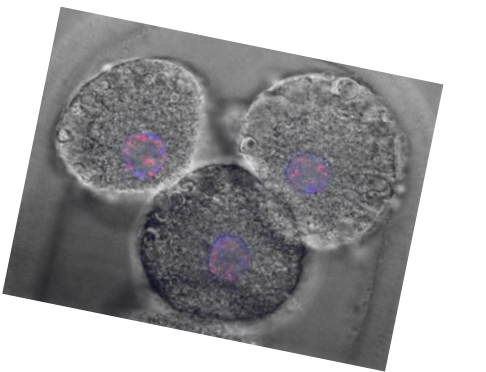
HAL Id: hal-03517503

<https://hal.science/hal-03517503v1>

Submitted on 7 Jan 2022

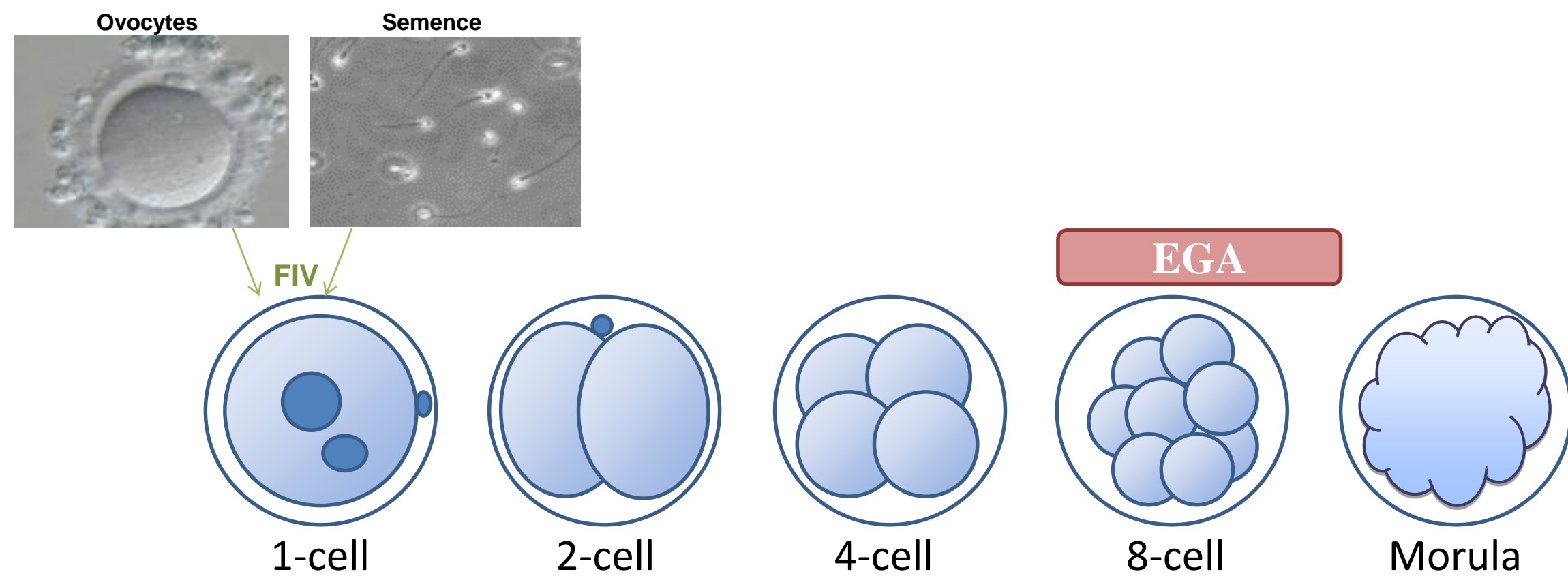
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.



Introduction

Lors de la fécondation, il y a fusion de deux gamètes mâles et femelles hautement spécialisés et différenciés portant des caractéristiques épigénétiques et structurales de la chromatine nécessitant d'être remaniées afin de permettre la mise en route du génome embryonnaire. La distribution des modifications post-traductionnelles d'histones a été largement étudiée chez la souris au cours du développement préimplantatoire (revue dans Beaujean, 2014). Toutefois les données sur d'autres mammifères où l'activation du génome est plus tardive comme le lapin et le bovin sont parcellaires. En effet, chez le bovin, la mise en route du génome se fait entre les stades 8 et 16-cellules. Les marques les plus étudiées chez ces espèces ont été H3K9me3 (Pichugin et al., 2010 ; Reis e Silva et al., 2011) - associée à l'hétérochromatine - ou H3K4me3 (Brero et al., 2009; Popken et al., 2014) - associée à l'euchromatine -.



Objectifs

Analyses des changements d'organisation et/ou répartition des histones H3K9me3 et H3K4me3 chez le bovin :
- Comparaison des niveaux de fluorescence des marques H3K4- et H3K9-me3,
- Visualisation 3D de la répartition de ces modifications dans le noyau,
- Détection conjointe de ces 2 marques pour déterminer leur degré de colocalisation ou association.

Comparaison des embryons produits en utilisant de la semence de taureaux normaux et hypofertiles.

Matériel et Méthodes

- Culture *in vitro* des embryons bovins après FIV (atelier de production d'embryons de ruminants).
- Fixation des embryons aux stades 4 cellules (avant EGA), 8 cellules (au moment de l'EGA) et morula (après l'EGA).
- Immunodétection par fluorescence (IF) des modifications post-traductionnelles d'histones suivantes : H3K9me3 et H3K4me3. L'ADN a été contre-coloré au DAPI.
- Acquisition des images avec un microscope confocal Zeiss LSM700 et un ApoTome Zeiss (plateforme ISC MIMA2).
- Traitement des images avec Fiji (<https://fiji.sc/>) et Imaris.

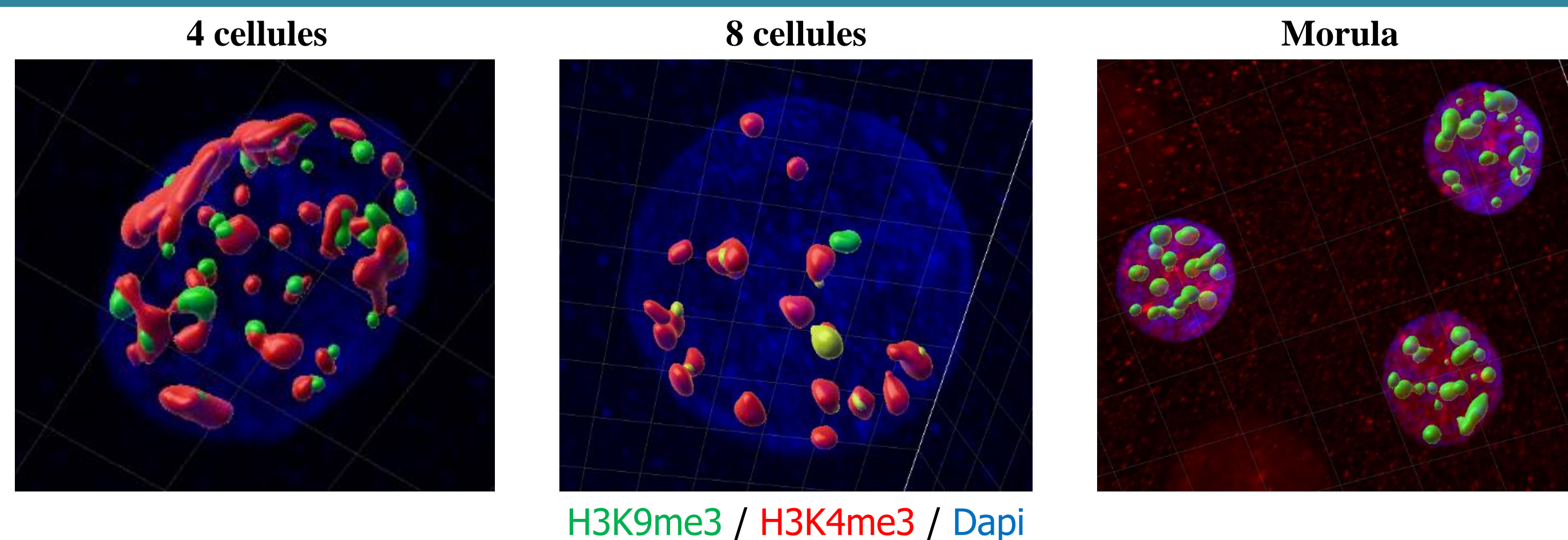


Figure 2: Visualisation 3D de la répartition de H3K4me3 et H3K9me3 autour de l'EGA chez le bovin. Mise en évidence de la colocalisation entre H3K4me3 et H3K9me3 (spot jaune).

Entre le stade 4 cellules et le stade Morula (32 cellules), les marques épigénétiques (H3K4me3 et H3K9me3) ont une distribution sous forme de foci (flèches en Fig. 1). L'utilisation de la fonction plot-profil (ImageJ) met en évidence une superposition des signaux principalement aux stades 4 et 8 cellules.

Une segmentation des signaux avec le logiciel Imaris (Fig. 2), nous permet de mesurer la taille des foci ainsi que leur degré de superposition (8 cellules – foci en jaune Fig. 2).

Toutefois le signal fluorescent de H3K4me3 change en intensité, ce qui nous a conduit à faire des mesures de la quantité de fluorescence entre stades.

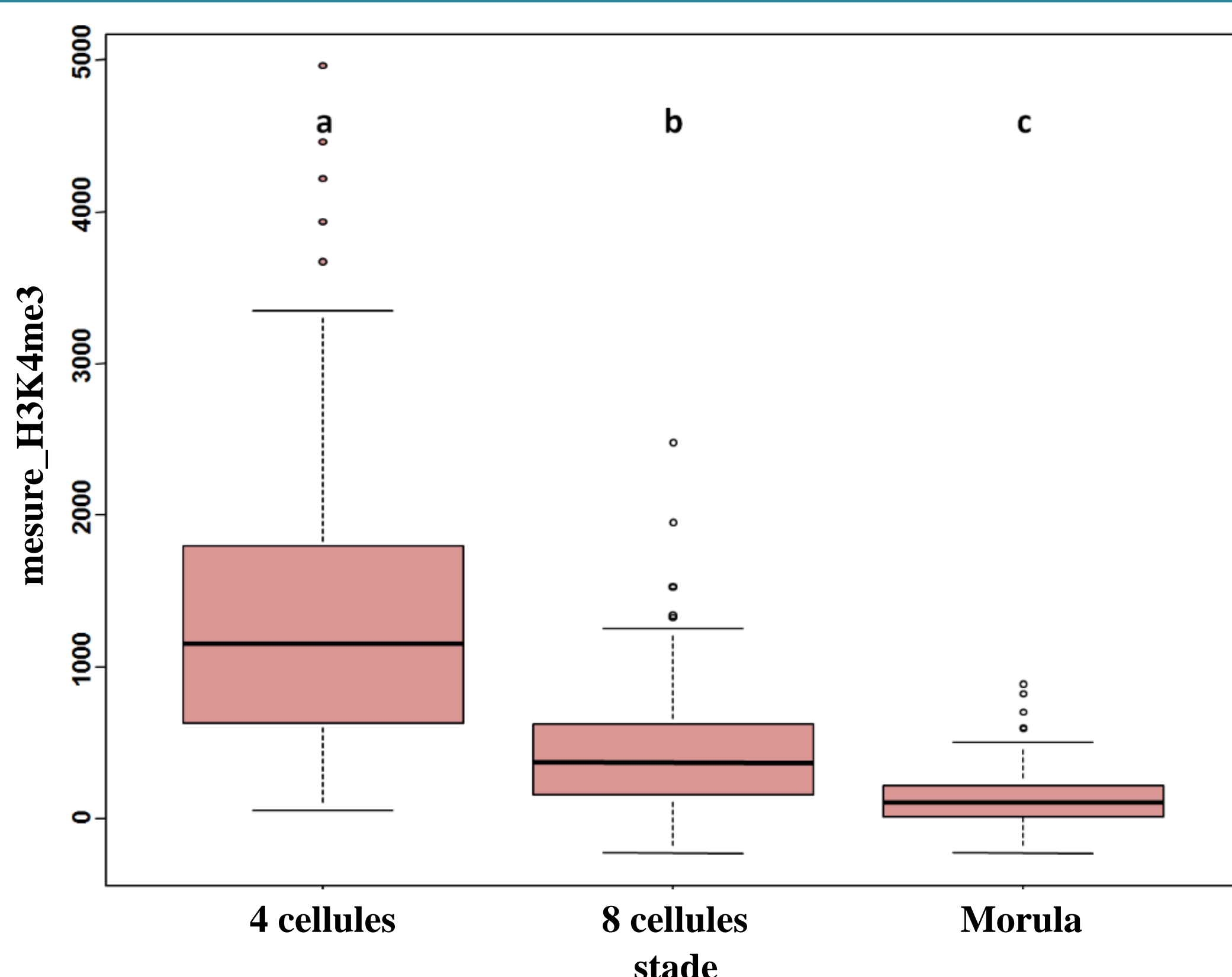


Figure 3: Quantification de H3K4me3 indépendamment de l'origine génétique des taureaux. Analyse quantitative réalisée sur 563 noyaux de 111 embryons différents regroupant les stades 4 cellules à morula. données non publiées de l'équipe

Résultats préliminaires

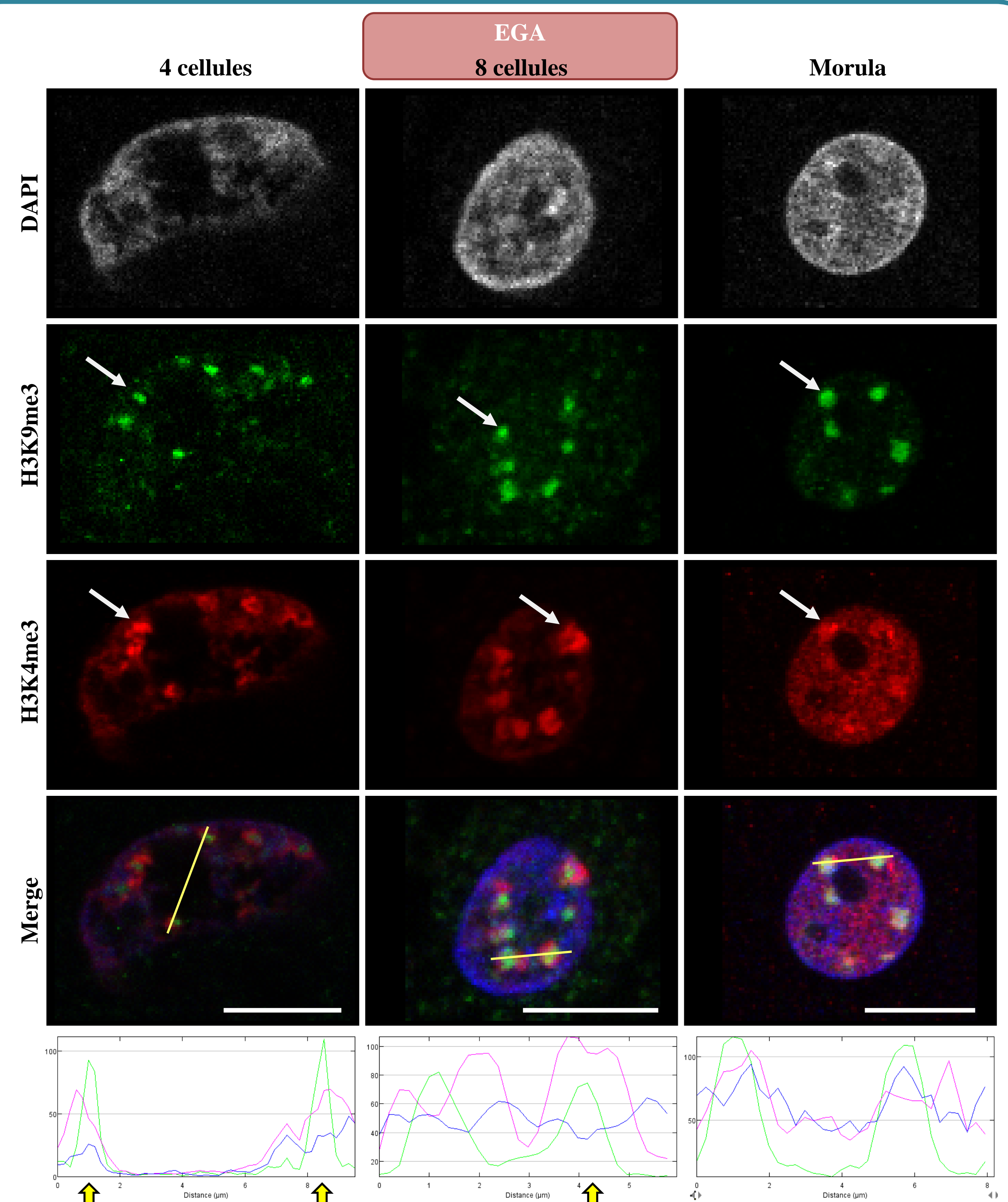


Figure 1: Noyaux représentatifs des stades 4 cellules, 8 cellules (au moment de l'EGA) et Morula pour les marques d'histones H3K4me3 et H3K9me3 associées respectivement à l'euchromatine et à l'hétérochromatine chez le bovin. Plot-profil mettant en évidence de la colocalisation entre H3K4me3 et H3K9me3. Barre d'échelle : 10 µm données non publiées de l'équipe

Nous avons utilisé des images acquises sur un microscope équipé d'un module Apotome pour quantifier l'intensité de fluorescence de H3K4me3 (Fig. 3). Nous avons mis en évidence une diminution progressive et significative de cette quantité de fluorescence des stades 4 cellules à Morula. Au contraire, l'intensité de fluorescence de H3K9me3 reste stable quelque soit le stade (données non montrées).

Conclusion



Ces résultats préliminaires mettent en évidence l'apport de différentes approches pour analyser les images obtenues soit par acquisition sur microscope confocal (pour la segmentation du signal) soit sur microscope équipé d'un module Apotome (pour la quantification de l'intensité de fluorescence). Les analyses sont en cours et il nous reste à estimer le pourcentage de colocalisation entre les deux marques ainsi que la taille des foci H3K9me3 entre stades.