

## LA QUASI-STÉRILITÉ MÂLE DE TROIS SOUCHES DE SOURIS COMBINANT UN HAPLOTYPE *t* TOTAL ET UN HAPLOTYPE *t* PARTIEL

J. MOUTSCHEN<sup>1</sup>, M. MOUTSCHEN-DAHMEN<sup>1</sup> et A. DEMOULIN<sup>2</sup>

1. Laboratoire de Génétique générale, Université de Liège, Sart-Tilman B22, B-4000 Liège (Belgique)
2. Département de Gynécologie et Obstétrique, Université de Liège, CHR j36, B-4000 Liège (Belgique)

### QUASI-STERILITY OF THREE STRAINS OF MALE MICE COMBINING A COMPLETE AND A PARTIAL *t*-HAPLOTYPE

Key words : mouse , quasi-sterility, *t*-haplotypes

Mots clés : souris, stérilité, haplotype *t*

#### ABSTRACT

Three mouse strains combining a partial *t*-haplotype and a complete one were obtained from the tailless strain T / *t*<sup>12</sup> (from Columbia University). The derived partial haplotypes namely *t*<sup>Lg7</sup>, *t*<sup>Lg9</sup> and *t*<sup>Lg12</sup> (Lg for Liège) combined with the *t*<sup>12</sup> complete haplotype were tested for male fertility i.e. males bearing *t*-haplotypes were mated with control Q females (from Edinburgh University). The trivial causes of infertility i.e. dyspermatogenesis, sperm abnormalities, sperm number, etc. could be first ruled out so that it can be ascertained that the infertility originates from the *t* complex (chromosome 17).

In the progenies, there was an important proportion of completely sterile males, the remaining males showing a very reduced fertility, the so-called quasi-sterility. The proportion of completely sterile males was shown to be greater for the haplotypes *t*<sup>Lg12</sup>. The fertility was checked in the quasi-sterile group and was found to be of the same order for the three strains (mean number of young per litter: 2.69 against 6.86 in the control). The distribution of the litters differed greatly for the haplotypes and the control, being bell-shaped only in this latter case. Dominant lethal mutations were investigated after mating *t*-haplotypes with the control Q females. Pre-implantation losses were considerably enhanced over the control, so that a part of the sterility can be ascribed to this origin. The significance of the data for the sterility of males bearing *t*-haplotypes is discussed.

Présenté le 19 septembre 1991

## INTRODUCTION

Une propriété très importante des haplotypes *t* (chromosome 17) de la souris réside dans le fait que les mâles qui combinent deux de ces haplotypes montrent une fertilité généralement diminuée. Découverte tout d'abord chez les mâles porteurs de haplotypes *t* complets, cette propriété a pu être étendue à des mâles combinant un haplotype *t* complet et un haplotype *t* partiel (Lyon et Philips, 1959; Lyon, 1960). Les mâles qui portent différentes combinaisons de haplotypes *t* montrent en effet des fécondités variables allant de la stérilité complète jusqu'à une fertilité presque normale quoique cette dernière éventualité soit exceptionnelle.

En dépit de nombreuses recherches, les causes morphologiques et physiologiques n'ont pas encore été élucidées. Cependant, un certain nombre de possibilités ont été écartées (revue dans Silver, 1985).

Récemment, Lyon (1986) a pu apporter des arguments en faveur d'une théorie selon laquelle la stérilité mâle de ces souris est due à l'interaction d'au moins trois facteurs qui présenteraient une relation avec les gènes dits de distorsion de ségrégation respectivement *Tcd1*, *Tcd2* et *Tcd3*. Au cours d'études précédentes, nous avons montré qu'il était possible de restaurer partiellement la fertilité des mâles fertiles (Moutschen, 1985, 1986 et Moutschen *et al.*, 1988). Au cours de ces recherches, seule une fraction de mâles complètement stériles s'est montrée réceptive à l'exclusion des mâles quasi-stériles. En vue de comprendre les relations entre les régions du complexe *t* impliquées dans la stérilité, il nous est apparu d'un intérêt certain d'analyser les données obtenues concernant les mâles quasi-stériles de différentes souches et de comparer nos données avec celles de la littérature.

## MATERIEL ET METHODE

Au cours de cette recherche, trois haplotypes partiels, respectivement  $t^{L87}$ ,  $t^{L89}$  et  $t^{Lg12}$  ont été analysés. L'origine a été décrite en détail (Moutschen, 1985; Moutschen *et al.*, 1988). En résumé, lorsque une femelle normale  $t^{12}/t^{Lg}$  apparaît dans la souche anoure  $T/t^{12}$ , elle sert de femelle fondatrice pour la nouvelle souche. A cet effet, elle est recroisée avec un mâle  $T/t^{12}$  dont on s'est préalablement assuré la fertilité. Les mâles issus de ce croisement combinent donc le nouveau haplotype  $t^{L8}$  et le haplotype  $t^{12}$ .

Afin de tester leur fertilité, ils sont croisés avec un certain nombre (généralement 3) de femelles de la souche Q (Edimbourg) dont on s'est, au préalable, assuré de la fécondité. Nous avons antérieurement montré qu'une durée de croisement de trois mois est nécessaire en vue de s'assurer de la stérilité de ces mâles (Moutschen *et al.*, 1988).

Pendant cette période, on évalue la puissance des mâles en recensant chaque jour, les bouchons vaginaux. En fin de croisement, les mâles sont utilisés en vue de vérifier leur fécondité en comptant le nombre de spermatozoïdes à la cellule de Thoma. Pour l'étude des mutations létales dominantes, des mâles quasi-stériles de 3 à 4 mois sont croisés avec des femelles témoins Q.

Pour les femelles chez lesquelles on a détecté un bouchon vaginal, on note, 14 jours plus tard, la fréquence des jeunes en vie, des jeunes morts tardivement, des déciduomes (qui permettent d'évaluer la mortalité après implantation intra-utérine) et, sur les ovaires, la fréquence des corpora lutea de gestation (qui permet de déduire la mortalité avant implantation intra-utérine).

## RESULTATS

On a tout d'abord recensé la proportion de mâles fertiles et quasi-stériles pendant une période de trois mois. Après cette période, les mâles totalement stériles ont été utilisés dans d'autres expériences. Chez les mâles quasi-stériles, les croisements sont continus pendant une période de neuf mois. Les résultats sont résumés dans le tableau 1 où l'on a rassemblé les données de 15 expériences indépendantes réalisées pendant environ une dizaine d'années.

Souches	Totalement stériles	Quasi-stériles	Total
$t^{Lg7} / t^{12}$	35	36	71
$t^{Lg9} / t^{12}$	122	105	227
$t^{Lg12} / t^{12}$	135	51	186
Total	292	192	484

Tableau 1 - Proportion respective des mâles complètement et quasi-stériles pour 3 souches contenant des combinaisons différentes de haplotypes  $t$ .

On remarque que pour les souches  $t^{Lg7}$  et  $t^{Lg9}$ , il n'y a pas de différence significative entre les proportions de mâles complètement et quasi-stériles: (c = correction de Yates pour la continuité)

$$\chi_c^2 t^{Lg7} / t^{Lg9} = 0,27 \text{ 1 dl } P \approx 0,60$$

Par contre, les différences entre la souche  $t^{Lg12}$  et chacune des autre souches sont hautement significatives.

$$\chi_c^2 t^{Lg7} / t^{Lg12} = 11,43 \text{ 1dl } P < 0,001$$

$$\chi_c^2 t^{Lg9} / t^{Lg12} = 14,61 \text{ 1dl } P < 0,001$$

$$\chi_c^2 t^{Lg9} / t^{Lg7} / t^{Lg12} = 27,82 \text{ 2dl } P < 0,0001$$

On note donc une proportion plus importante de mâles complètement stériles dans la souche  $t^{Lg12}$  qui s'avère par conséquent, plus efficace en vue des expériences de restauration de fertilité au moyen d'extraits.

L'étape suivante de cette recherche était d'évaluer la fertilité relative des mâles du groupe quasi-stérile par la dimension des portées.

Souches	N. mâles analysés	N. fem fécondée	N. fem. sans jeunes	N. portées	N. portées /fem fécond	N. jeunes total	Moy. jeunes $\bar{x}$ / portée	Intervalle de confiance $\pm 0,05\sigma$
<i>t</i> Lg 7 / <i>t</i> 12	23	42	27	62	1,48	178	2,87	0,46
<i>t</i> Lg 9 // <i>t</i> 12	50	95	55	183	1,93	507	2,77	0,24
<i>t</i> Lg 12 // <i>t</i> 12	22	41	25	72	1,76	168	2,33	0,36
Total	95	178	107	317	1,78	853	2,69	0,18
Témoin Q	50	120	25	175	1,46	1200	6,86	0,45

Tableau 2 - Fertilité des mâles quasi-stériles dans chaque souche étudiée.

Les résultats rapportés dans le tableau 2 montrent que dans chacune des souches, il n'existe aucune différence significative entre la proportion de femelles sans portée par rapport à l'ensemble des femelles croisées.

$$\chi^2_c \text{ } t^{Lg7} / t^{Lg9} = 0,11 \quad 1 \text{dl } P \approx 0,70$$

$$\chi^2_c \text{ } t^{Lg12} / t^{Lg7} = 0,002 \quad 1 \text{dl } P \approx 0,85$$

$$\chi^2_c \text{ } t^{Lg9} / t^{Lg12} = 0,03 \quad 1 \text{dl } P \approx 0,85$$

$$\chi^2 \text{ total} = 0,16 \quad 3 \text{dl } P \approx 0,98$$

La différence avec les souches porteuses de haplotypes *t* et le témoin Q est hautement significative.

$$\chi^2 \text{ total} = 14,9 \quad 3 \text{dl } P < 0,01$$

Sur la base de la dimension des portées comme critère de fécondité des mâles quasi-stériles, on ne note pas non plus de différence significative entre la fécondité des 3 souches.

L'analyse de la variance donne:  $31^4_2P = 2,23$ , non significatif au seuil  $P = 0,05$ . La distribution des portées a été étudiée pour les trois souches et comparée à la souche témoin ( fig. 1 ).

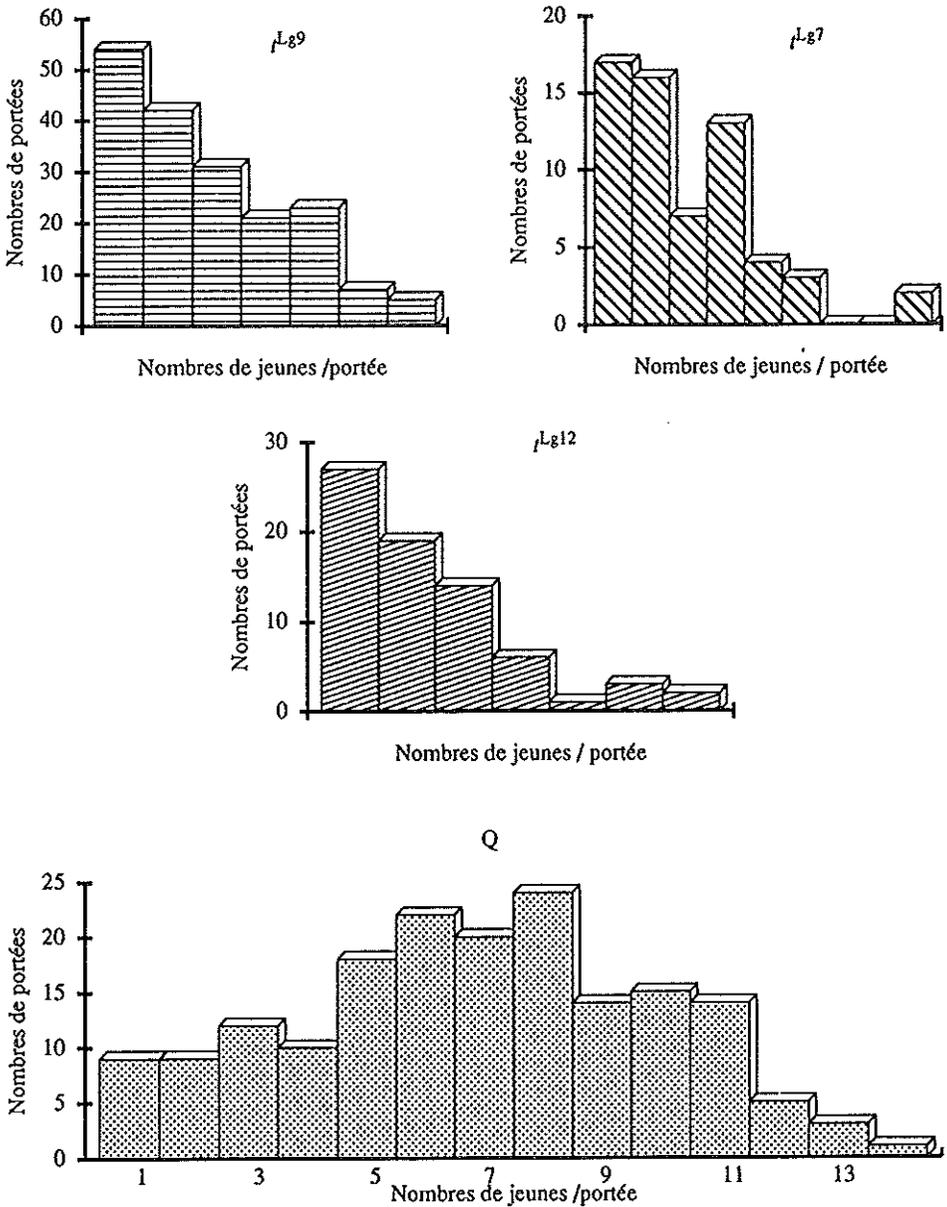


Fig. 1 : Distribution de fréquences des portées dans les trois souches porteuses de haplotypes *t* et dans la souche Q .

On n'a pas tenu compte des femelles qui n'ont donné aucune portée. On voit que la distribution des portées est assez symétrique chez le témoin. Elle est, par contre, nettement asymétrique pour les mâles porteurs de haplotypes *t*.

On s'est posé la question de savoir si les bouchons vaginaux étaient différents pour les groupes de mâles quasi-stériles et entièrement stériles (Tableau 3).

Souches	quasi-stériles		complètement stériles	
	fréquences des bouchons	fréquences des spermatozoïdes $\times 10^3$	fréquences des bouchons	fréquences des spermatozoïdes $\times 10^3$
$t^{L_8 7} / t^{12}$	0,049	8843	0,052	6874
$t^{L_8 9} / t^{12}$	0,046	4456	0,073	5791
$t^{L_8 12} / t^{12}$	0,042	6043	0,069	5178

Tableau 3 - Fréquence des bouchons vaginaux (mâle/ femelle/ jour recencés pendant une période de 3 mois environ) respectivement chez les stériles et les quasi-stériles, et corrélation avec les nombres de spermatozoïdes / déférent  $\times 10^3$  chez les mêmes mâles âgés de 1 an environ.

Il n'existe aucune différence significative entre les deux groupes:

mâles quasi-stériles:  ${}_{27}^2F = 0,83$ .

mâles stériles:  ${}_{27}^2F = 0,38$

Pour les deux groupes:  ${}_{54}^5F = 0,125$

Aucune de ces valeurs n'est significative au seuil  $P = 0,05$

En outre, dans le tableau 3, on compare pour chaque souche, la fréquence des bouchons vaginaux et la fréquence des spermatozoïdes. On observe une hétérogénéité dans le groupe quasi-stérile où l'analyse de la variance donne  ${}_{27}^2F = 7,08$ , valeur significative au niveau  $P = 0,01$ . Dans le groupe stérile, par contre, aucune différence significative n'apparaît:

${}_{12}^1F = 0,63$  non significatif pour  $P = 0,05$ .

Si on ne tient pas compte de la souche  $t^{L_8 9}$ , une certaine hétérogénéité se maintient cependant:

${}_{31}^{26}F = 3,86$ , significatif au seuil  $P = 0,05$

La fréquence des spermatozoïdes estimée pour la race témoin Q pendant la même période était de  $5953 \pm 1236 \times 10^3$ , visiblement du même ordre de grandeur que chez les animaux stériles et quasi-stériles.

Le tableau 4 résume les résultats obtenus concernant les fréquences de mutations létales pour les trois souches et le témoin.

Souches	N. mâles croisés	N. fem. fertiles	Corpora lutea	Jeunes en vie	Déciduomes	Pertes avant implantation	Pertes totales
$t^{Lg7}/t^{12}$	4	8	42	16	1	25	26
$t^{Lg9}/t^{12}$	10	25	99	30	2	67	69
$t^{Lg12}/t^{12}$	6	14	65	30	0	35	35
Total	20	47	206	76	3	127	130
Témoin Q	64	191	1829	1614	70	145	215

Tableau 4 - Relevé des mutations létales dominantes dans la progéniture de mâles quasi-stériles et de femelles Q.

On voit que:

1. Il n'y aucune différence significative entre les proportions de déciduomes (jeunes morts après l'implantation) chez le témoin et les souris porteuses de haplotypes  $t$ :

$$\chi_c^2 = 0,002 \quad 1dl \quad P > 0,99$$

2. Par contre, il existe une différence hautement significative entre les proportions de jeunes morts avant l'implantation:

$$\chi_c^2 \text{ total} = 629 \quad 3dl \quad P \approx 0,001$$

$$\chi_c^2 t^{Lg7} = 132 \quad 1dl \quad P < 0,001$$

$$\chi_c^2 t^{Lg9} = 343 \quad 1dl \quad P < 0,001$$

$$\chi_c^2 t^{Lg12} = 154 \quad 1dl \quad P < 0,001$$

3. La proportion des corpora lutea par femelle fécondée est significativement plus élevée chez le témoin.

Il existe donc deux composantes à la quasi-stérilité à savoir, une diminution des taux d'ovules fécondés et une augmentation de la mortalité embryonnaire avant l'implantation, évaluée par la différence entre les taux de corpora lutea et le nombre de jeunes implantés. La part qui revient à chacune de ces composantes n'a pas encore été évaluée.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'idée qu'il existe plusieurs gènes de stérilité éventuellement séparables par crossing-over a depuis longtemps été défendue (Johnston, 1968; Lyon et Mason, 1977, Hammerberg, 1981, 1982). Au départ, l'existence de 3 facteurs de stérilité: un proximal, un médian et un distal (par rapport au centromère) a été suggérée (*loc. cit.*). De plus, Lyon et Mason (1977) ont postulé une analogie (ou un linkage très étroit) entre les gènes de stérilité et de létalité (ces derniers étant réyéés à l'état homozygote). Plus récemment, Hammerberg 1982; Lyon, 1984, 1986, 1989, 1990 et Lyon et Zenthon, 1987) ont suggéré qu'il existait une identité (ou un linkage très étroit) entre les gènes de stérilité *tcs1*, *tcs2* et *tcs3* (ou *S1*, *S2*, *S3*) et les gènes de distorsion de ségrégation *tcd1*, *tcd2* et *tcd3* (ou *D1*, *D2*, *D3*) dispersés en différents lieux du complexe *t*.

Concernant la correspondance phénoménologique entre ces entités, deux théories voisines ont été élaborées. Pour Lyon (*loc. cit.*), il existe au moins 3 loci de distorsion de ségrégation qui, par l'intermédiaire de facteurs inconnus, exercent un effet délétère sur l'allèle sauvage d'un locus appelé répondeur (*responder*) ou *Tcr*. Selon ce schéma, l'allèle de *Tcr*, *Tcr<sup>+</sup>*, présent dans les spermatozoïdes des mâles porteurs de haplotypes *t* serait plus résistant à l'action des facteurs de distorsion. Il en résulterait que chez les mâles hétérozygotes pour le complexe *t*, la majorité des spermatozoïdes capables de féconder seraient porteurs de *Tcr<sup>+</sup>*. Cependant, lorsque les gènes de distorsion sont homozygotes, les deux allèles du répondeur seraient également sensibles ce qui conduirait à la stérilité mâle. Néanmoins, de nombreuses différences pourraient exister, soit dans le nombre de gènes de distorsion, soit dans leur combinaison en position *cis* ou *trans* (Lyon et Zenthon, 1977). Concernant la stérilité, les expériences suggèrent que la présence du gène *S1* même à l'état homozygote, n'est pas suffisante pour entraîner la stérilité. La présence de *S2* à l'état hétérozygote au moins est requise. Il semble bien que *S3* interagisse avec les deux autres gènes mais la nature de cette interaction n'a pas encore été précisée.

Des résultats récents (Lyon, 1990) suggèrent que des différences intrinsèques puissent exister au niveau des répondeurs probablement dans la séquence de bases de l'ADN. La conception de Hammerberg (1981, 1982) diffère principalement en ce qu'il ne fait pas intervenir de système répondeur. Jusqu'à présent, les bases moléculaires de ces théories génétiques n'ont pas été élucidées. La situation est peut-être plus compliquée.

En effet, Silver et Remis (1987) ont montré que sur 9 régions identifiées sur le complexe *t*, 5 avaient un rapport avec les gènes de distorsion bien qu'aucune relation avec le gène de stérilité n'ait été mise en évidence pour plus de 3 gènes. Comment nos résultats s'insèrent-ils dans ces schémas?

La présente recherche confirme que, dans les souches utilisées au cours des croisements, la stérilité ne peut être imputée à des anomalies méiotiques, conduisant notamment à l'oligospermie, l'asthénospermie ou la tératospermie. Parmi les mâles, il existe deux groupes qui n'ont pas été distingués dans la littérature: ceux qui sont complètement stériles et ceux qui jouissent d'une fertilité réduite. La présente recherche a montré que dans notre souche *t<sup>L812</sup>*, la proportion de mâles complètement stériles était significativement plus élevée. Les différences de propriétés suggèrent que les trois haplotypes dérivés de *t<sup>12</sup>* sont bien différents. Quelle est la nature de ces différences? On admet généralement que l'origine des haplotypes *t* partiels réside dans la formation d'un crossing-over exceptionnel dans une région où celui-ci est normalement inhibé. Dans le cas présent, les haplotypes partiels *t<sup>L8</sup>* doivent provenir du haplotype complet *t<sup>12</sup>* à la suite d'un crossing-over se produisant chez un des parents anoures *T/t<sup>12</sup>*. Ces crossing-overs peuvent se produire, non seulement dans la souche anoure d'origine mais encore chez les descendants femelles combinant les deux haplotypes *t<sup>12</sup>* et *t<sup>L8</sup>* recroisés avec les mâles anoures *T/t<sup>12</sup>*. Ces crossing-overs produiraient donc des combinaisons différentes des gènes de stérilité, à partir du haplotype complet *t<sup>12</sup>* qui, par définition, les contient tous. Suivant les théories énoncées et, soit que l'on fasse intervenir un gène répondeur ou non, les diverses combinaisons de gènes de stérilité et leur état homozygote devraient expliquer les différents gradients de fertilité. Quelle relation cette autre forme de stérilité présente-t-elle avec le complexe *t*?

Il est évident que cette cause de stérilité due aux mutations létales précoces, peut être dépendante de n'importe quelle région du génome . Cependant, des expériences précédentes ont montré qu' elle existait aussi dans les croisements de mâles anoures T/ $t^{12}$  et de femelles Q normales (J. Moutschen,1980).

Or, l'existence d'une forte distorsion de ségrégation en faveur du haplotype complet  $t^{12}$  laisse fortement présumer que le ou les facteur(s) responsable(s) de cette stérilité est ( sont) localisé(s) dans le chromosome 17, sinon dans le complexe  $t$  lui-même.

Peut-être , y a-t-il même une analogie avec un des gènes de stérilité connus. C'est là, une nouvelle hypothèse de travail pour les recherches futures.

D'après l'analyse de la distribution des portées observées pour les trois haplotypes, il n'est pas actuellement possible de discriminer les différentes classes de stérilité.

Dans l'hypothèse d'une analogie entre les gènes de stérilité et ceux de distorsion de ségrégation , il serait opportun de tester les haplotypes  $t^{L5}$  du point de vue de cette dernière propriété.

Dans le contexte de la stérilité, il faut insister sur le fait que nos expériences montrent nettement qu'une partie de celle-ci provient dans nos trois souches, d'une mortalité zygotique avant implantation intra-utérine. On peut penser qu'une certaine proportion de mâles catalogués comme étant complètement stériles a pu éventuellement engendrer 100% de mortalité zygotique avant implantation intra-utérine.Si l'on admet que chaque haplotype  $t$  possède deux inversions, l'une proximale, l'autre distale, qui sont les causes d'inhibition du crossing-over , il devient évident que, dans les combinaisons de haplotypes  $t$ , dans lesquelles ces inversions apparaissent à l'état homozygote, le crossing-over est rétabli (Artzt *et al.*,1982). Cette restitution devrait donc s'effectuer chez les femelles qui combinent le haplotype  $t$  complet et un haplotype  $t$  partiel. Elle expliquerait les proportions de mâles complètement stériles et quasi-stériles obtenues (tableau4) sur la base de l'effet anisodynamique des gènes de stérilité tel qu'il a été postulé dans les théories énoncées (*loc.cit.*).

### Remerciements

La présente recherche a pu être réalisée grâce à l'intervention du F.R.S.M.( Fonds de la Recherche Scientifique Médicale de Belgique) auquel nous avons le plaisir d'exprimer notre gratitude.

### Références

- Artzt K., Shin H. S. et Bennett D. Gene mapping within  $T/t$  complex of the mouse. II Anomalous position of the H-2 complex in  $t$ -haplotypes. *Cell* 28, 471-476, 1982.
- Hammerberg C. The influence of Orl upon male in  $t$ -bearing mice , *Genet. Res.* 37, 71-77, 1981.
- Hammerberg C. The effects of the  $t$ -complex upon male reproduction are due to complex interactions between its several regions. *Genet. Res.* 39, 219-226, 1982.
- Lyon M. et Phillips R. Crossing-over in mice heterozygous for  $t$ -alleles . *Heredity* 13, 23-32 ,1959.
- Lyon M. Effect of X-rays on the mutation of  $t$ -alleles in the mouse. *Heredity* 14, 247-252, 1960.
- Lyon M . Transmission ratio distortion in mouse  $t$ -haplotypes is due to multiple distorter genes acting on a responder locus . *Cell* 37, 621-628, 1984.
- Lyon M. Search for differences among  $t$ -haplotypes in distorter and responder genes. *Genet.Res.* 55, 13-19, 1990.
- Lyon M. The genetic basis of transmission ratio distortion and male sterility due to the  $t$ -complex.

- American Naturalist* 137, 349-358, 1991.
- Lyon M. Male sterility of the mouse *t*-complex is due to homozygosity of the distorter genes. *Cell* 44,357-363,1986.
- Lyon M. et Mason I. Information on the nature of *t*-haplotypes from the interaction of mutant haplotypes in male fertility and segregation ratio. *Genet. Res.* 29, 255-266, 1977.
- Lyon M. et Zenthon J. Differences in or near the responder region of complete and partial mouse *t*-haplotypes. *Genet. Res.* 50, 29-31, 1987.
- Moutschen J. Modification de fréquence des mutations létales dominantes observées chez la souris à la suite de croisements de mâles anoures et de femelles à queue normale. *Arch. Zool. Génér.Exper.* 121, 237-248, 1980.
- Moutschen J. Recouvrement partiel de la fertilité de souris mâles porteuses de haplotypes *t* après injection d'extraits d'organes, Bull. Soc. Roy. Sci. Liège, 54, 305-312, 1988.
- Moutschen J. Fertility recovery of sterile males carriers of *t* loci after injection of organ extracts. *Gen. Res.* 47, 221-222, 1986.
- Moutschen J., M. Moutschen-Dahmen, A. Demoulin, F. Pirson et P. Franchimont. Recouvrement partiel de la stérilité chez les souris mâles porteuses de haplotypes *t* après injections de fractions d'extraits testiculaires de souris. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège* 57, 29-38, 1988.
- Silver L. Mouse *t*-haplotypes. *Ann. Rev. Genet.* 19, 179-208, 1985.
- Silver L.M. and Remis D. Five of the nine genetically defined regions of mouse *t*-haplotypes are involved in transmission ratio distortion. *Genet. Res.* 49, 51-56, 1987.