

# UNIVERSITE EVRY-VAL-D'ESSONNE

Année 2015

## THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY-VAL-D'ESSONNE**

Spécialité Reproduction et Développement

Présentée et soutenue publiquement par

**Alix LUANGPRASEUTH-PROSPER**

Le 11 Mai 2015

## ***Topaz1, un gène indispensable à la spermatogenèse***

Directeurs de thèse : Dr. Corinne Cotinot et Dr. Béatrice Mandon-Pépin

### JURY

Dr. Brigitte BOIZET-BONHOURE	Rapporteur
Dr. Norbert GHYSELINCK	Rapporteur
Dr. Joël DREVET	Examineur
Dr. Gabriel LIVERA	Examineur
Pr. Bernard MIGNOTTE	Examineur
Dr. Corinne COTINOT	Directeur de thèse
Dr. Béatrice MANDON-PEPIN	Co-Directeur de thèse

# Merci....

---

Aux Docteurs Brigitte Boizet-Bonhour et Norbert Ghyselincq d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Aux Professeurs Joël Drevet, Gabriel Livera et Bernard Mignotte d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A Corinne pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son unité, de m'avoir encadrée et merci pour ses corrections, ses remarques pertinentes et son regard extérieur au 440 nécessaire.

A Béatrice d'avoir parié sur Topaz et sur moi, mille mercis pour ses idées, ses conseils et pour son soutien face aux petits soucis de la thèse mais pas que.

A Elodie, la meilleure technicienne avec qui une thésarde peut espérer travailler. Merci pour toutes les manipulations que tu as faites, pour les hypothèses farfelues qu'on a échafaudé et merci beaucoup pour ton soutien et ta bonne humeur.

Aux autres brebis brunes de passage : Barbara pour les bouteilles d'eau et pour m'avoir tant fait rire, Diarra, Astrid et les autres pour, entre autre, le génotypage. Fanny, je te confie mes souris !

A Éric et à son groupe, Maëlle, Maeva, Aurélie, Marjolaine, Clara, de m'avoir accueilli dans l'équipe et pour leurs remarques constructives.

Aux lapins, Geneviève, Nathalie et Erwana pour leur gentillesse, le profil qPCR, et leur empressement à aller manger. Merci de leurs conseils, leur encouragement et critiques et pour les pauses café.

Au trichoplax Dominique pour avoir été mon colocataire de bureau, pour les discussions passionnantes (mais parfois peu ragoûtantes) qu'on a partagé.

A Luc pour son expertise sur l'analyse de puce.

Au personnel de l'animalerie rongeurs pour avoir pris soin de mes souris, à Abdel pour son aide souriante en histo, aux plateformes protéique et d'imagerie pour leur aide.

A Émilie et son équipe du CEA pour m'avoir appris la technique d'étalement de chromosomes.

A Adrienne d'avoir trouvé Topaz.

Aux Luang-Bazire et aux Prosper d'être présents

A Thomas avec qui le meilleur reste à venir...

# Sommaire

<b>Abréviations .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des illustrations.....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction bibliographique .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Le testicule .....</b>	<b>7</b>
A. La différenciation des gonades .....	7
1. Sexe génétique .....	7
2. Sexe gonadique .....	8
a) Formation des crêtes génitales .....	8
b) Différenciation de la lignée germinale .....	10
c) Différenciation du testicule.....	12
d) Différenciation de l'ovaire .....	16
e) Les facteurs intracellulaires.....	17
f) La voie Rspo1-WNT4- $\beta$ -caténine .....	19
3. Entrée en méiose des cellules germinales .....	21
4. Différences entre la méiose mâle et femelle .....	25
B. Morphologie du testicule.....	28
1. Les cellules de Sertoli.....	29
2. Les cellules de Leydig.....	31
3. Les cellules péritubulaires myoïdes .....	33
4. Les cellules endothéliales.....	34
5. Les macrophages.....	34
<b>II. La spermatogenèse.....</b>	<b>36</b>
A. Mitoses .....	36
B. Méiose.....	38
1. Pré-leptotène .....	39
2. Leptotène.....	39
3. Zygotène.....	42
4. Pachytène .....	44
5. Diplotène .....	47
6. Diacinèse.....	48
7. La Métaphase 1 .....	49
8. L'Anaphase I.....	50
9. La Télaphase I.....	50
10. La Deuxième division de méiose .....	50
C. Points de contrôle de la méiose .....	50
1. Points de contrôle en prophase I .....	51
2. Transition Prophase I – Métaphase I .....	51
3. Transition Métaphase I – Anaphase I.....	53
D. Spermiogenèse.....	54
1. Remodelage de la chromatine.....	55
2. Elongation du flagelle.....	58
3. Réduction cytoplasmique.....	59
4. Formation de l'acrosome.....	60
5. Spermiation .....	61
E. Maturation post-testiculaire des gamètes mâles.....	62
1. Maturation épидидymaire .....	62
a) Caractéristiques et fonctions de l'épididyme.....	62
b) Modifications des spermatozoïdes .....	63
2. Capacitation.....	64

<b>III. Régulations de la spermatogenèse .....</b>	<b>66</b>
A. Régulations hormonales et paracrines .....	66
1. Régulation hormonale de la différenciation germinale mâle .....	66
2. Régulation hormonale de la spermatogenèse .....	67
3. Régulation paracrine de la spermatogenèse .....	69
B. Piwi interacting RNA .....	71
1. Les éléments transposables à ARN .....	73
2. Contrôle des rétrotransposons .....	74
3. Biogenèse des piARNs .....	77
4. Les autres composants de la voie des Piwi .....	79
a) Arrêt en méiose .....	80
b) Arrêt en spermiogenèse .....	80
<b>Contexte / Objectifs de la thèse .....</b>	<b>82</b>
<b>Article : TOPAZ1, a germ cell specific for male meiotic progression .....</b>	<b>85</b>
<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>86</b>
<b>Résultats complémentaires de l'article sur Topaz1 .....</b>	<b>86</b>
<b>Analyse transcriptionnelle au cours du développement gonadique de gènes impliqués dans la répression des rétrotransposons et les mécanismes épigénétiques survenant dans la lignée germinale : comparaison souris-mouton .....</b>	<b>90</b>
<b>Matériel &amp; Méthodes .....</b>	<b>103</b>
<b>Discussion Générale .....</b>	<b>105</b>
<b>I. Expression de TOPAZ1 dans les cellules germinales mâles .....</b>	<b>105</b>
A. Données chez l'homme et le rat .....	105
B. Profils d'expression chez le mouton et le lapin .....	105
<b>II. Rôle de Topaz1 dans la spermatogenèse .....</b>	<b>107</b>
A. Comparaison avec des modèles murins présentant un phénotype similaire .....	107
1. Stérilité liée à la régulation des ARNs .....	107
2. Stérilité liée à la perturbation du MPF .....	108
3. Stérilité liée au désappariement des chromosomes .....	109
B. Domaines fonctionnels .....	110
C. Gènes cibles de Topaz1 .....	110
<b>III. Perspectives .....</b>	<b>113</b>
A. La protéine TOPAZ1 .....	113
B. Sauvetage du phénotype des souris Topaz1 <sup>-/-</sup> et surexpression de Topaz1 .....	114
C. Test <i>in vitro</i> de liaison de Topaz1 aux lncRNAs ou à l'ADN .....	114
<b>Conclusion .....</b>	<b>116</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>117</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>142</b>
<b>Article : TOPAZ1, a novel germ cell-specific expressed gene conserved during evolution across vertebrates .....</b>	<b>143</b>
<b>Communications scientifiques .....</b>	<b>144</b>

## Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMH	Hormone anti-Mullerienne
AMPC	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	ARN messenger
ARKO	KO du récepteur aux androgènes
Azh	Abnormal spermatozoa head
BMP	Bone Morphogenic protein
BPES	Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus
CGP	Cellule Germinale Primordiale
ChIP	Immuno-Précipitation de la chromatine
Corps P	Processing bodies
CSS	Cellule Souche Spermatogoniale
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FSHRKO	KO du récepteur à la FSH
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HMG	High-Mobility Group
Hpg	Hypoganded mouse
ICSI	Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde
<i>Jpc</i>	jour <i>post-coitum</i>
<i>Jpp</i>	Jour <i>post-partum</i>
KL	Kit ligand
KO	Knock Out
LH	Hormone Lutéinisante
LINE	Long interspersed element
lncRNA	ARN long non-codant
LTR	Long Terminal repeat
miARN	Micro ARN
MPF	Metaphase promoting factor
MSCI	Sex Chromosome Inactivation
MSUC	Meiotic Silencing Unsynapsed Chromatin
MTOC	Microtubule Organizing center
ncRNA	ARN non-codant
nls	Nuclear localization signal
Ods	Odd Sex

ORF	Open Reading Frame
PAR	Région pseudo-autosomale
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
piARN	piwi-interacting RNA
piRNA	piRNA-like
PIS	Polled Intersex Syndrome
PSCR	Post-meiotic sex chromosome repression
PTM-KO	KO du récepteur aux androgènes dans les cellules péritubulaires
RARE	Retinoic Acid Response Element
RISC	Rna induced silencing complex
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RT	Reverse Transcription
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCARKO	KO du récepteur aux androgènes dans les cellules de Sertoli
SCP	Synaptonemal Complex Protein
SE	Spécialisations Ectoplasmiques
siARN	Small interfering ARN
SINE	Short Interspersed element
sncRNA	small non-coding RNA
SMC	Structural maintenance of chromosome
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
SSH	Suppressive Subtractive Hybridization
TBC	Complexe Tubulo-bulbaire
TDF	Testis Determining Factor
TDY	Testis Determining Y-gene
TGF	Transforming growth factor
Tex	Testis Expressed gene
Tfm	Testicular feminised mouse
Topaz1	Testis and Ovary-specific PAZ domain gene 1
WT	Wild-type

## Liste des illustrations

**Figure 1** : Représentation schématique de l'émergence des cellules germinales primordiales (PGC) dans l'embryon de souris (Saitou and Yamaji, 2010)

**Figure 2** : Représentation schématique de la migration des cellules germinales primordiales dans l'embryon humain (Tiré de Reproduction par Johnson et Everitt, De Boeck Université)

**Figure 3** : Evolution des différents modèles de déterminisme du sexe (D'après Liu *et al.*, 2010)

**Figure 4** : Représentation schématique d'un testicule et d'un tube séminifère, en coupe transversale (De Boeck Université, 2007)

**Figure 5** : Schéma des 12 stades de l'épithélium séminifère chez la souris (Russell *et al.*, 1990)

**Figure 6** : Illustration schématique de la spermatogenèse (Rato *et al.*, 2012)

**Figure 7** : Schéma de la spermatogenèse

**Figure 8** : Schéma de la formation du complexe synaptonémal, chez la souris (Morelli and Cohen, 2005)

**Figure 9** : Modèle du comportement des chromosomes X et Y pendant la méiose (Kauppi *et al.*, 2012)

**Figure 10** : Représentation schématique du MSCI (Turner *et al.*, 2007)

**Figure 11** : Modèle classique du cycle cellulaire mitotique (Wolgemuth *et al.*, 2013)

**Figure 12** : Ultrastructure du spermatozoïde humain (Tiré de La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, Ellipses, Editions INRA)

**Figure 13** : Représentation schématique des gènes clés impliqués dans les changements morphologiques et cytoplasmiques des spermatides murins au cours de la spermiogenèse (Jan *et al.*, 2012)

**Figure 14** : Schéma de la spermiation (O'Donnell *et al.*, 2011)

**Figure 15** : Les différents types d'éléments transposables

**Figure 16** : Les différentes protéines Piwi chez la souris et leurs orthologues humains et bovins

**Figure 17** : Modèle théorique de la biogenèse primaire des piARNs et de l'amplification par cycle ping-pong (Muller *et al.*, 2013)

**Figure 18** : Rôle des piARNs dans l'inactivation des rétrotransposons chez la souris (Muller *et al.*, 2013)

**Figure 19** : Profils d'expression des gènes *LacZ* (a.), et *Topaz1* (b.) au cours du développement dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> et *Topaz1*<sup>+/+</sup>

**Figure 20** : Analyse par RT-qPCR du gène *Topaz1* dans les gonades murines (a.), lapines (b.) et ovines (c.) mâles et femelles (a.) au cours du développement

**Figure 21** : Analyse par RT-qPCR du gène *Miwi* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL1* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement

**Figure 22** : Analyse par RT-qPCR du gène *Mili* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL2* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement

**Figure 23** : Analyse par RT-qPCR du gène *Miwi2* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL4* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement

**Figure 24** : Schéma de l'évolution des gènes *Piwi* au cours de l'évolution animale (Lim *et al.*,2013)

**Figure 25** : Analyse par RT-qPCR *PIWIL3* dans les gonades ovines au cours du développement

**Figure 26** : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt1* dans les gonades murines (a.) et *DNMT1* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 27** : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3a* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3a* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 28** : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3b* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3b* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 29** : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3L* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3L* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 30** : Analyse par RT-qPCR du gène *Mov10L1* dans les gonades murines (a.) et *MOV10L1* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 31** : Analyse par RT-qPCR du gène *Mvh* dans les gonades murines (a.) et *VASA* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement

**Figure 32** : Analyse par RT-qPCR du gène *GASZ* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement

**Figure 33** : Analyse par RT-qPCR du gène *MAELSTROM* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement

**Figure 34** : Analyse par RT-qPCR du gène *TDRD1* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement

**Figure 35** : Profils d'expression des gènes *TET1* (a.), *TET2* (b.) et *TET3* (c.) au cours du développement gonadique ovin, par RT-qPCR

**Figure 36** : Schémas récapitulatifs de l'expression des gènes étudiés au cours du développement gonadique mâle et femelle, dans l'espèce ovine

**Figure 37** : Modèle schématique résumant la potentielle implication de l'ARN non codant long *4930463o16Rik* dans la spermatogenèse

**Tableau 1** : Protéines différenciellement exprimées dans les testicules *Topaz1*<sup>+/+</sup> (WT) et *Topaz1*<sup>-/-</sup> (KO).

**Tableau 2** : Primers utilisés en RT-qPCR.

# Introduction

## Introduction bibliographique

### I. Le testicule

L'appareil reproducteur mâle est constitué des testicules, des conduits excréteurs (*Rete Testis*, canaux efférents, épидидymes, canaux déférents et urètre) et des glandes annexes (vésicules séminales, prostate, glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cooper et glandes préputiales).

#### A. La différenciation des gonades

La différenciation sexuelle est un processus séquentiel, ordonné et en cascade qui se fait en trois étapes chronologiques. Le sexe génétique est défini dès la fécondation par les chromosomes sexuels (XX ou XY chez les mammifères). Le sexe gonadique, ovaire ou testicule, est défini pendant la vie foetale sous contrôle du sexe génétique. Enfin, le sexe phénotypique (ou somatique) correspond aux caractères sexuels primaires et secondaires. Les caractères sexuels primaires désignent l'ensemble des organes génitaux : gonades, tractus génital, organes génitaux externes et éléments du système nerveux central. Les caractères sexuels secondaires (pilosité, modifications de la morphologie corporelle et du volume des organes génitaux chez l'humain) eux n'apparaissent qu'à partir de la puberté, sous l'action des hormones.

##### 1. Sexe génétique

Chez les mammifères, le sexe génétique est défini au moment de la fécondation selon que l'embryon hérite de son père d'un chromosome X ou d'un chromosome Y.

A la fin des années 50, l'analyse des caryotypes d'individus mâles XXY (Syndrome de Klinefelter) ou XXXY a permis de mettre en évidence l'importance du chromosome Y dans le déterminisme du sexe (Jacob and Strong, 1959). De plus, le syndrome de Turner XO, sans chromosome Y, donne des individus de phénotype féminin. Ce syndrome apporte une preuve supplémentaire que, quel que soit le nombre de chromosomes X présents, le chromosome Y est nécessaire et suffisant pour induire un phénotype mâle.

Jacobs et Ross en 1966 ont analysé des anomalies de structure du chromosome Y chez l'Homme et ont montré que l'information nécessaire pour initier le développement testiculaire était portée sur le bras court du chromosome Y. Ces données ont lancé la recherche du TDF (*Testis Determining Factor*) porté par le Y chez l'homme ou TDY (*Testis Determining Y-gene*) chez la souris. Grâce à des études génétiques réalisées sur des patients présentant une discordance entre leur caryotype et leur phénotype (dysgénésie gonadique : Homme XX ou femme XY), le facteur TDF a été localisé chez l'homme dans la partie télomérique du chromosome Y.

Il y a maintenant près d'un quart de siècle que le gène mammalien de détermination testiculaire a été découvert chez l'homme (Sinclair *et al.*, 1990 ; Berta *et al.*, 1990) et la souris (Koopman *et al.*, 1990). Il s'agit du gène SRY (Sex-determining Region of Y). La preuve du rôle de SRY à induire le phénotype mâle a été confirmée par des expériences de transgénèse chez la souris. En effet, des souris XX portant le gène *Sry* présentent un développement testiculaire (Koopman *et al.* 1991). A l'inverse, une mutation ou délétion dans le gène *Sry* conduit à un développement de type femelle chez des souris XY (Gubbay *et al.*, 1992, Hawkins *et al.*, 1992).

Les études de patients atteints d'inversion sexuelle non explicable par la présence ou l'absence du gène *Sry* ont amené McElreavey, Goodfellow & Lovell-Badge à formuler l'hypothèse qu'il existerait un gène clé pour la détermination du sexe femelle. Ce facteur « Z » serait produit par la gonade XX, il activerait la différenciation ovarienne et inhiberait dans un même temps la différenciation mâle. Le gène mâle *Sry*, et certaines de ces cibles, serait capable d'inhiber le facteur Z et la cascade moléculaire qui en découle. Il existerait donc, dans chaque sexe, des facteurs spécifiques du mâle et de la femelle qui contrôlèrent la différenciation gonadique vers une voie tout en réprimant l'autre voie.

Puis, avec les nouvelles techniques de génétique, il est devenu clair que la différenciation ovarienne est un processus activement contrôlé par plusieurs gènes et à toutes les étapes de la différenciation (Uhlenhaut *et al.*, 2009).

## 2. Sexe gonadique

La différenciation gonadique est un processus complexe faisant intervenir, dès la différenciation des crêtes génitales, de nombreux gènes spécifiques communs aux deux sexes, puis des gènes spécifiques de la différenciation ovarienne ou de la différenciation testiculaire. Le premier indice de la différenciation sexuelle d'un point de vue morphologique chez le mâle est la mise en place des cordons séminifères dans la gonade dite indifférenciée (12.5jpc (jours *post-coitum*) chez la souris) tandis que chez la femelle, le premier indice est soit l'entrée en méiose des cellules germinales chez les rongeurs, soit la formation de cordons ovigères chez d'autres espèces comme les ruminants et l'humain.

### a) Formation des crêtes génitales

Chez les mammifères, les crêtes génitales se forment très précocement pendant la vie fœtale (dès 9jpc chez la souris, 23-24 jours chez l'ovine et dès 4 semaines chez l'humain). La fonction de reproduction est l'une des premières à se mettre en place mais c'est la dernière à être fonctionnelle (seulement à la puberté). Chez la souris, la gonadogenèse commence par la formation du système uro-génital à partir du mésoderme intermédiaire. Vers 10.5jpc, le système uro-génital remplit la

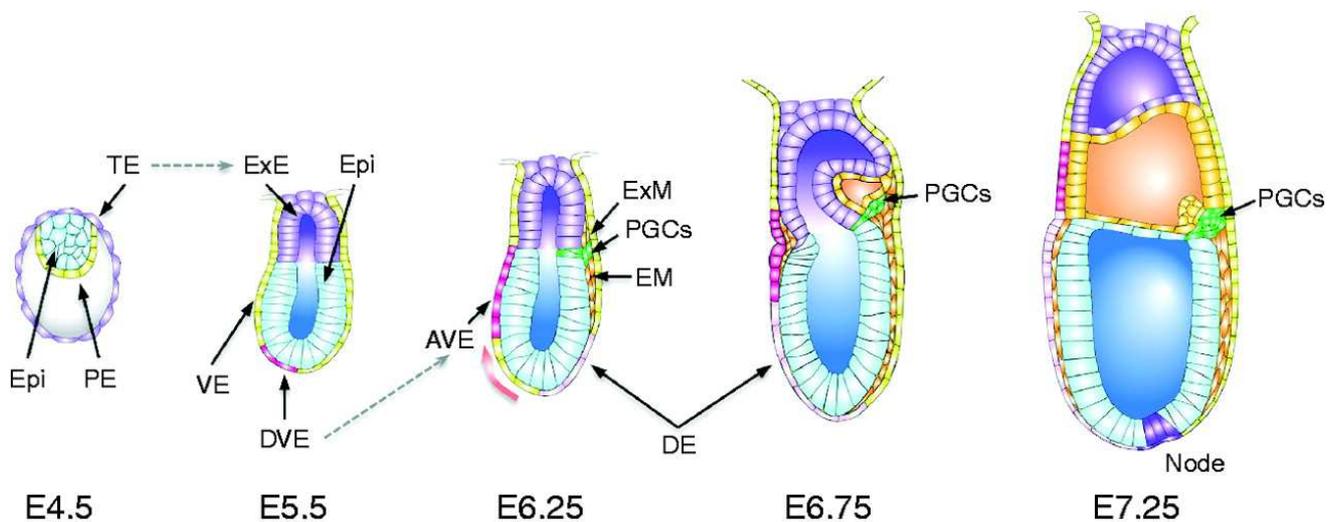
majorité de la cavité coelomique. Il est alors composé de trois segments, du plus antérieur au plus postérieur : le pronéphros, le mésonéphros (le rein embryonnaire transitoire) et le métanéphros (futur rein définitif).

Les crêtes génitales apparaissent sous la forme d'un renflement longitudinal provoqué par la prolifération de l'épithélium coelomique et l'épaississement du mésenchyme sous-jacent, situé sur la face médio-ventrale du mésonéphros. Les gènes à homéobox *Lhx9* (*Lim Homeobox9*), *Lim1* (*Lim Homeobox1*) et *Emx2* (*Empty spiracles homeobox gene 2*) ont été décrits comme ayant un rôle dans la formation des crêtes génitales. Leur invalidation se traduit par une agénésie (absence de formation) des crêtes génitales.

Dès que les crêtes génitales sont formées, les cellules germinales primordiales (CGP) colonisent ces crêtes (10,5jpc chez la souris) que l'on appelle alors ébauches gonadiques indifférenciées puisqu'elles ont le même aspect dans les deux sexes. Ces ébauches gonadiques évoluent alors en gonades bipotentielles via l'implication de plusieurs facteurs dont *WT1* (*Wilm's tumor suppressor 1*) et *SF1* (*Steroidogenic factor 1*).

Le gène *WT1* est exprimé dès 9jpc chez la souris dans les crêtes génitales et son expression est maintenue après la différenciation sexuelle dans les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa. L'invalidation de *WT1* ne perturbe pas la formation des crêtes génitales mais conduit à une absence de développement des gonades par dégénérescence des crêtes à 11,5jpc (Kreidberg *et al.*, 1993). La protéine *WT1*, de par ses nombreuses isoformes, peut avoir des rôles différents, l'isoforme (+KTS) est impliquée dans la différenciation des crêtes génitales tandis que l'isoforme (-KTS) est impliquée dans la différenciation testiculaire (Hammes *et al.*, 2001).

Le gène *SF1* code pour un récepteur nucléaire orphelin exprimé dans le tractus uro-génital et dans le complexe hypothalamo-hypophysaire. Chez la souris, *Sf1* est exprimé jusqu'à 12jpc dans les gonades mâles et femelles, puis son expression devient sexe-dimorphique. Chez le mâle, les cellules somatiques continuent à l'exprimer jusqu'à 18jpc tandis que chez la femelle l'expression de *Sf1* ne reprend qu'à partir de 18jpc. L'invalidation de *Sf1* chez la souris est létale quelques jours après la naissance et les mutants présentent un phénotype gonadique comparable à la mutation de *Wt1*, c'est à dire une agénésie gonadique (Luo *et al.*, 1994). Chez la souris, *Sf1* a également un rôle de cofacteur pour activer l'expression de *Sox9* et de l'*AMH*, *Sf1* est donc impliqué dans la détermination sexuelle mâle des gonades. Par ailleurs, *Sf1* a également un rôle dans la différenciation ovarienne en activant l'expression de *Wnt4* et *FoxL2* (Combes *et al.*, 2010).



**Figure 1 : Représentation schématique de l'émergence des cellules germinales primordiales (PGC) dans l'embryon de souris (Saitou and Yamaji, 2010)**

A 4.5jpc, au moment de l'implantation, trois feuillets constituent le blastocyste : le trophoctoderme (TE) qui formera le futur placenta, l'épiblaste (Epi) qui formera les annexes embryonnaires et les cellules de l'embryon et l'endoderme primitif (PE) qui donnera une partie du sac vitellin. Les cellules de trophoctoderme qui sont en contact direct avec celles de l'épiblaste se multiplient et constituent une couche cellulaire appelée l'ectoderme extra-embryonnaire (ExE) qui entourent une cavité centrale, la cavité pro-amniotique. A 5.5jpc, les cellules de l'épiblaste forment également une cavité, ces cellules sont compétentes pour se différencier en tous les types de cellules somatiques ainsi qu'en cellules germinales. Dès 6.25jpc, les cellules germinales primordiales (PGCs) se spécifient à partir de cellules de l'épiblaste grâce à des molécules de signalisation sécrétées par l'ectoderme extra-embryonnaire et l'endoderme viscéral (VE).

DVE : Endoderme viscéral distale; AVE : Endoderme viscéral antérieur; ExM : Mésoderme extra embryonnaire; EM : Mésoderme embryonnaire; DE : Endoderme définitif.

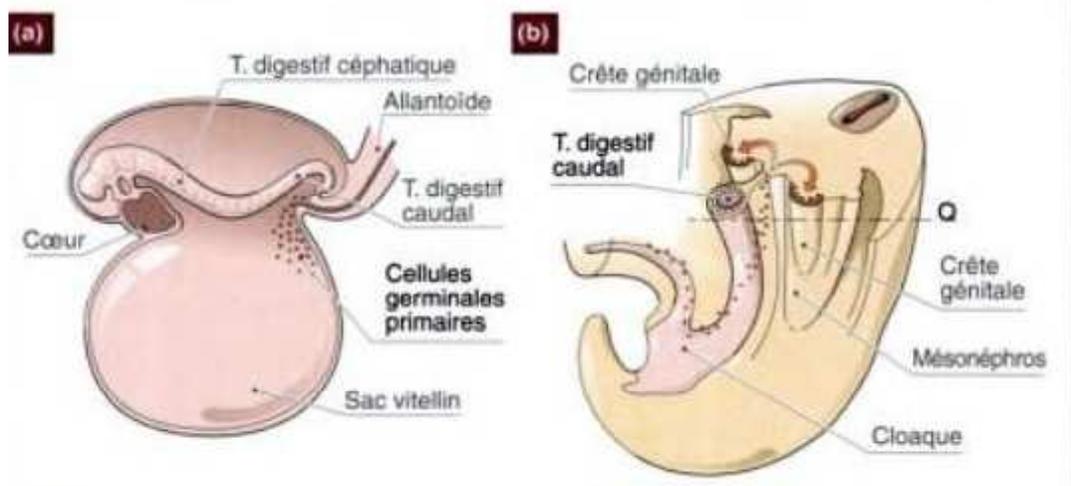
Les gonades dites indifférenciées sont composées de deux lignées cellulaires différentes, en plus des cellules germinales. Chaque lignée présente un double potentiel de différenciation, à savoir qu'elle peut s'engager dans une voie femelle ou dans une voie mâle selon la direction donnée par les gènes impliqués dans la détermination du sexe. Ces deux lignées sont : (i) les cellules de soutien qui donneront les cellules de Sertoli dans un testicule ou les cellules folliculaires (ou de la granulosa) dans un ovaire et (ii) les cellules stéroïdogènes qui donneront les cellules de Leydig chez le mâle ou les cellules de la thèque chez la femelle.

### b) Différenciation de la lignée germinale

La différenciation de la lignée germinale correspond à l'ensemble des grandes étapes aboutissant à la mise en place du stock de cellules germinales. La mise en place correcte de ce stock est décisive pour la quantité de gamètes disponible à l'âge adulte et pour toute la vie reproductive. Cette différenciation de la lignée germinale est composée de plusieurs étapes cruciales : la spécification des cellules germinales, la migration et enfin la différenciation sexuelle de ces cellules.

Dès 6,5jpc chez la souris, l'ectoderme extra-embryonnaire sécrète la protéine BMP4 (*Bone Morphogenic protein*, de la famille des TGF $\beta$ ). L'inactivation de *Bmp4* dans l'embryon de souris se traduit par l'absence totale de cellules germinales (Lawson *et al.*, 1999). BMP4 constitue le signal qui va induire la différenciation des cellules de l'épiblaste (couche épithéliale supérieure du disque embryonnaire) en précurseurs des cellules germinales primordiales (CGP) (**Figure 1**). La spécialisation des CGPs implique la suppression de l'expression des gènes somatiques et l'activation des gènes de pluripotence comme *Pou5f1* (*POU domain, class 5, transcription factor 1*), *Nanog* (*Nanog homeobox*) et *Sox2* (*SRY-box containing gene 2*). Après la reprogrammation, les précurseurs des CGPs expriment *Stella* (*developmental pluripotency-associated 3*) (Saitou *et al.*, 2002). Les CGP sont donc dérivées de l'épiblaste alors que les futures cellules somatiques de la gonade ont une origine mésenchymateuse. L'inactivation de *Bmp2*, *Bmp8b* ou d'un récepteur des BMPs *Alk2* empêche l'apparition des CGP dans l'embryon de souris (Ying *et al.*, 2000 ; Ying *et al.*, 2001 ; de Sousa Lopes *et al.*, 2004). La voie de signalisation de ces BMP se fait via des effecteurs intracellulaires, Smad1 et Smad5, qui pénètrent dans le noyau avec Smad4 afin de stimuler l'expression de *fragilis* (*IFITM3, interferon-induced transmembrane protein 3*) dans les précurseurs des CGP, ce qui induit le transit de CGP du mésoderme dans l'endoderme (Tanaka *et al.*, 2005).

En plus de ces facteurs extrinsèques, des signaux intrinsèques sont requis pour l'acquisition du destin germinal. L'inactivation de *Prdm1* (ou *Blimp1*), un facteur de transcription présent dans les cellules de l'épiblaste, dans l'embryon de souris provoque une diminution drastique du nombre de CGP et les



**Figure 2 : Représentation schématique de la migration des cellules germinales primordiales dans l'embryon humain (Tiré de Reproduction par Johnson et Everitt, De Boeck Université)**

- (a) Origine des cellules germinales primordiales.
- (b) Migration des cellules germinales primordiales.

rare CGP restantes présentent un profil d'expression génique aberrant suggérant que *Prdm1* est indispensable à la spécification des CGP (Ohinata *et al.*, 2005).

Les CGP peuvent être détectées à la racine de l'allantoïde dès 7.5jpc chez la souris par un marquage à la phosphatase alcaline.

Lors de la gastrulation, à partir de la région postérieure de la ligne primitive, les CGP pénètrent dans l'endoderme situé près du pédicule allantoïdien et du sac vitellin (**Figure 2, a**). Elles migrent ensuite pour venir coloniser le territoire mésodermique et former l'ébauche gonadique indifférenciée dans les crêtes génitales. Pendant toute la migration, les CGP se multiplient activement et subissent des changements morphologiques et biochimiques tels que des pseudopodes (extension cytoplasmiques sans organelle) visibles vers 9.5jpc par microscopie électronique (Clark and Eddy, 1975).

La première partie de la migration se fait de façon passive, l'endoderme viscéral se replie et se referme pour former l'ébauche du tube digestif. Les cellules précurseurs des CGP se retrouvent emprisonnées dans l'endoderme viscéral et sont passivement emmenées à travers le tube digestif grâce aux mouvements des tissus (**Figure 2, b**).

Puis, pour aller jusqu'aux ébauches gonadiques indifférenciées, la migration devient active par un mécanisme de chimiotactisme : les crêtes génitales sécrètent des molécules telles que SDF-1 (*Stromal derived factor 1* ou CXCL12/Chemokine (C-X-C motif) ligand 12) tandis que les CGP présentent à leur surface son récepteur CXCR4 (CXC chemokine Receptor 4, couplé aux protéines G). L'inactivation de *Sdf-1* ou de *Cxcr4* ne perturbe pas les premières étapes de la migration mais provoque une diminution du nombre de CGP dans les crêtes génitales tandis que l'expression ectopique de *Sdf-1* entraîne l'accumulation des CGP à l'extérieur des crêtes génitales (Ara *et al.*, 2003 ; Molyneaux *et al.*, 2003). Cette voie de signalisation SDF1-CXCR4 est donc indispensable pour une localisation normale des CGP dans les crêtes génitales.

Durant la migration pour rejoindre les crêtes génitales, les CGP suivent des « rails » d'actine associés au système c-kit/Kit ligand. La protéine KIT, un récepteur à activité tyrosine kinase, est exprimée par les CGP durant la migration, tandis que son ligand : Kit Ligand (KitL = *Stem Cell Factor*) est exprimé fortement sur la voie de migration des CGP jusqu'à 10,5jpc (Keshet *et al.*, 1991). L'inactivation des gènes codants pour *Kit* ou *KL* est létale à la naissance et s'accompagne d'une absence de CGP dans les gonades (Bernex *et al.*, 1996). Vers 10,5jpc, l'expression de KL diminue spécifiquement au niveau de la ligne médiane et les CGP encore présentes dans cette partie de l'embryon entrent en apoptose (Runyan *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que les facteurs KIT et KL sont impliqués dans la prolifération, la migration et la survie des CGP.

Certains gènes de pluripotence sont également indispensables au maintien des CGP pendant la migration. L'inactivation de *Nanos3* chez la souris provoque une diminution du nombre de CGP pendant la migration, ce qui se traduit par une absence de cellules germinales dans les gonades à l'âge adulte (Tsuda *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2008). L'absence d'expression de *Pou5f* chez la souris cause également une diminution du nombre de CGP avec une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Kehler *et al.*, 2004).

A leur arrivée dans les crêtes génitales (à 10,5jpc chez la souris), les CGP perdent leur mobilité et leur polarité. Chez les femelles, les CGP vont devenir des ovogonies tandis que chez les mâles, les CGP seront appelées pro-spermatogonies. Cependant, à cette période précoce, les cellules germinales demeurent bipotentiels. En effet, des cellules germinales XY de 11,5jpc entrent en méiose, caractéristique femelle, si elles sont cultivées avec des cellules de crêtes génitales XX (Adams and McLaren, 2002). Réciproquement, des cellules germinales XX de 11,5jpc sont capables de se développer en pro-spermatogonies lorsqu'elles sont cultivées en présence de tissu somatique XY. Ces expériences de culture *in vitro* suggèrent que le déterminisme sexuel des cellules germinales dépend davantage de l'environnement somatique dans lequel elles se trouvent, plutôt que de leur sexe génétique.

### c) Différenciation du testicule

A partir de 10,5jpc chez la souris, après la colonisation par les cellules germinales primordiales, une partie des cellules somatiques des crêtes génitales XY expriment SRY qui va initier la différenciation testiculaire. Le gène *Sry* n'est composé que d'un seul exon et code pour une protéine à domaine de liaison à l'ADN qui se lie à une séquence promotrice activatrice spécifique du testicule (TESCO) en amont du gène *Sox9* (SRY-like HMG box 9) et, avec SF1, active la transcription de *Sox9* (Sekido et Lovell-Badge, 2008). SRY est une protéine à *high-mobility group* (HMG) qui lie et courbe l'ADN. La période d'expression de SRY est courte chez la souris (6-8h) et à un niveau faible mais suffisant pour stimuler l'expression de *Sox9* dans les gonades XY « bipotentiels ». L'expression de SRY est plus longue dans d'autres espèces, comme la chèvre (Montazer-Torbati *et al.*, 2010).

Le facteur de transcription SOX9, exprimé dans les mêmes cellules somatiques des crêtes génitales que SRY, possède une HMG box avec un signal de localisation nucléaire et un signal d'export nucléaire. Chez la souris, *Sox9* est détecté dans les gonades XX et XY autour de 11jpc. Chez les individus XX, SOX9 reste cytoplasmique tandis que chez les individus XY, l'expression de SRY active la translocation de SOX9 dans le noyau, en coopération avec SF1. L'expression de *Sox9* est alors augmentée spécifiquement dans les gonades XY à 11,5jpc. SOX9 est donc le premier marqueur des cellules de Sertoli en différenciation. L'inactivation de *Sox9* chez la souris cause une inversion du sexe

chez les XY dû à un échec de différenciation des cellules de Sertoli (Chaboissier *et al.*, 2004). La mutation hétérozygote de *Sox9* chez l'homme cause un syndrome de dysplasie campomélique causant une létalité périnatale avec, entre autre, un développement osseux anormal (Houston *et al.*, 1983). Les patients présentant une mutation hétérozygote de *Sox9* présentent également un défaut de la différenciation testiculaire ou une inversion complète du sexe.

La différenciation des cellules de Sertoli à partir des précurseurs des cellules de soutien marque le début de la différenciation testiculaire. Le nombre de cellules précurseurs de Sertoli est un critère majeur de la différenciation des testicules puisque les cellules de Sertoli sont les chefs d'orchestre de la différenciation testiculaire.

On distingue trois boucles de régulation qui augmentent le nombre de cellules exprimant le gène *Sox9*. La première boucle implique des interactions moléculaires entre *Sox9* et *Fgf9* (*Fibroblast growth factor 9*). SOX9 stimule l'expression de *Fgf9*. La protéine FGF9, via son récepteur FGFR2 nucléaire (le récepteur de FGF9 dans les gonades) va maintenir l'expression de *Sox9*. FGF9 envoie également un signal paracrine à d'autres cellules de pré-Sertoli afin de recruter davantage de cellules de soutien qui expriment *SRY* et/ou *Sox9* pour se différencier en cellules de Sertoli. L'inactivation du gène *Fgf9* ou de son récepteur FGFR2 induit une diminution de l'expression de *Sox9* provoquant une inversion sexuelle de type femelle XY (Colvin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Bagheri-Fam *et al.*, 2008). De plus, les souris mutantes *Odd Sex (Ods)*, qui expriment de façon ectopique *Sox9* à partir de 11,5jpc dans la gonade embryonnaire femelle, présentent une inversion du sexe complète c'est-à-dire la formation d'un testicule plutôt que d'un ovaire (Bishop *et al.*, 2000). *Sox9* a un rôle supplémentaire antagoniste des gènes de détermination ovarienne (FoxL2, Wnt4 et  $\beta$ -caténine).

La deuxième boucle d'amplification implique la prostaglandine 2 (PGD2). SOX9 active le promoteur du gène de la lipocalin prostaglandine D synthase (PTGDS spécifique du testicule) ce qui conduit à la production de PGD2 (Wilhelm *et al.*, 2007). La protéine PGD2 va induire un signal paracrine, via l'activation de l'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique) et de la PKA (Proteine Kinase A) entraînant la phosphorylation de SOX9. La liaison de l'importine à SOX9 phosphorylée va permettre la translocation de SOX9 au noyau, favorisant ainsi la différenciation de nouvelles cellules de Sertoli. En absence de PTGDS chez la souris, l'expression de *Sox9* est diminuée et sa translocation nucléaire semble être plus tardive comparée aux gonades XY contrôles (Moniot *et al.*, 2009).

Ces deux boucles de régulations impliquant les gènes *PTGDS* et *Fgf9* semblent donc fonctionner en parallèle afin d'amplifier et de maintenir l'expression de *Sox9*. Un autre mécanisme qui augmente le nombre de cellules positives pour *Sox9* est la prolifération des cellules exprimant *SRY*. En effet, l'expression de *SRY* augmente la division cellulaire de ces cellules (Schmahl *et al.*, 2000), ce qui

permettrait d'augmenter le nombre de cellules positives pour *Sox9* par rapport aux cellules de soutien n'exprimant pas *Sox9*. Par ailleurs, SOX9 active FGF9 qui va conduire à la masculinisation des cellules germinales comme décrit précédemment. SOX9 active également *Desert Hedgehog* (DHH) qui induira, via son récepteur Patched 1 (PTCH1), la spécification des cellules stéroïdogènes, les cellules de Leydig, à partir de 12.5jpc chez la souris.

*Sox9* est suffisant et nécessaire pour permettre un développement testiculaire mais il ne semble pas indispensable après 14,5jpc pour le développement des cellules somatiques testiculaires chez la souris (Barrionuevo *et al.*, 2009). En effet, on peut supposer la présence de protéines avec des rôles redondants à SOX9 telles que SOX8.

Comme SOX9, SOX8 est un facteur de transcription exprimé dans les cellules de Sertoli embryonnaires et post-natales du testicule murin. Les souris mâles *Sox8*<sup>-/-</sup> présentent un développement testiculaire embryonnaire normal (Sock *et al.*, 2001), ces animaux sont fertiles dans leur 1<sup>er</sup> mois mais ils développent au cours du développement post-natal une défaillance progressive des tubes séminifères et une infertilité à 5 mois (O'Bryan *et al.*, 2008). De la même façon, l'inactivation conditionnelle de *Sox9* dans les cellules de Sertoli à partir de 14jpc (sous le contrôle du promoteur de l'*AMH*) se traduit par un développement testiculaire embryonnaire normal et les souris mâles sont initialement fertiles mais deviennent stériles autour de 5 mois à cause d'une spermatogenèse non-fonctionnelle (Barrionuevo *et al.*, 2009).

Pour comprendre si *Sox8* est capable de compenser *Sox9* au cours de la différenciation testiculaire dans l'embryon de souris, des expériences de doubles mutants *Sox9, Sox8* ont été réalisées chez la souris (Barrionuevo *et al.*, 2009). Chez ces doubles mutants, en l'absence d'un seul allèle *Sox8*, les cordons testiculaires arrêtent de se différencier après 6jpp (jours *post-partum*) et les animaux mâles sont stériles. En cas d'absence des deux allèles de *Sox8*, la différenciation des cordons testiculaires s'arrête dès 0jpp et s'accompagne d'une stérilité primaire complète. De plus, les testicules doublement invalidés *Sox9, Sox8* total présentent une augmentation de l'expression de marqueurs ovariens précoces (*Wnt4* et *Rspo1*) et une diminution des jonctions intercellulaires des cellules de Sertoli à 15,5jpc. Le développement des cordons testiculaires, tout comme le maintien de la fonction testiculaire, nécessite la coopération de *Sox8* et *Sox9*.

Par ailleurs, il a été décrit que DMRT1 (*Double sex and mab-3 related transcription factor 1*) est essentiel au maintien de la détermination gonadique de type testiculaire, chez les mammifères. En effet, la délétion de *Dmrt1*, au cours du développement fœtal chez des souris mâles XY induit une féminisation post-natale du testicule (Matson *et al.*, 2011) ; une délétion de *Dmrt1* au stade adulte

conduit à une reprogrammation des cellules de Sertoli différenciées en cellules granulosa-like exprimant *FoxL2* et d'autres gènes ovariens (Minkina *et al.*, 2014).

Les cellules de Sertoli sont donc les premières cellules somatiques à se différencier, vers 12jpc chez la souris. Les cellules de Sertoli entourent les CGP pour former les cordons testiculaires, les futurs tubes séminifères. La différenciation des autres lignées cellulaires somatiques du testicule ne se font pas indépendamment mais dépendent de la différenciation des cellules de Sertoli. Ce sont ces dernières qui orchestrent la différenciation des autres types cellulaires, par leur rôle central dans la signalisation de la différenciation testiculaire.

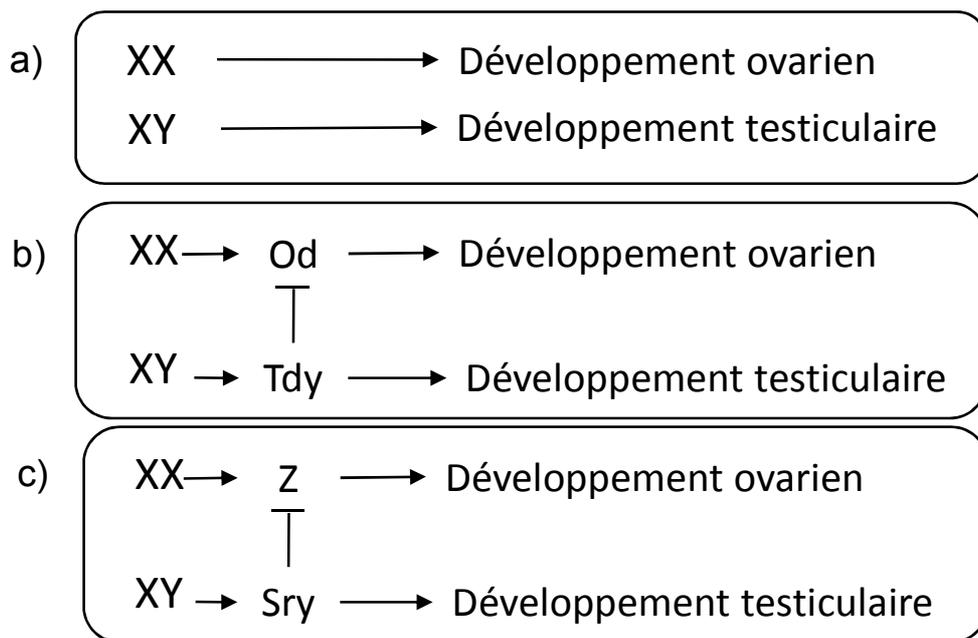
Vers 11.5jpc, les cellules endothéliales migrent dans la gonade pour mettre en place une vascularisation artérielle primitive. Elles formeront également la vascularisation ramifiée entre les tubes séminifères.

Vers 13jpc, les cellules myoïdes péritubulaires entourent et délimitent les cordons séminifères. L'origine développementale des précurseurs des cellules péritubulaires dans la gonade XY demeure encore obscure par manque de marqueur spécifique. De plus, contrairement aux cellules de Leydig ou de Sertoli, les cellules péritubulaires n'ont pas d'homologues dans l'ovaire. La différenciation des cellules péritubulaires est contrôlée par DHH, produit par les cellules de Sertoli, qui agit via son récepteur PTCH1 à la surface des cellules péritubulaires. Chez les souris invalidées pour le gène *Dhh*, les cellules péritubulaires sont absentes des tubes ou présentent une morphologie épaissie sans le cytosquelette d'actine caractéristique, ce qui suggère que le signal DHH des cellules de Sertoli induit la différenciation des cellules péritubulaires (Clark *et al.*, 2000).

De plus, les cellules de Sertoli expriment *Dax1*, un signal requis pour la différenciation des cellules péritubulaires myoïdes, même si sa voie de signalisation est encore peu connue. L'invalidation de *Dax1* chez la souris se traduit par une dysgénésie testiculaire primaire. Dans les testicules déficients en *Dax1*, le nombre de cellules péritubulaires est réduit et la lame basale, produite par ces cellules péritubulaires, est perturbée ce qui conduit à la formation de cordons testiculaires mal formés se traduisant par une infertilité chez la souris adulte (Meeks *et al.*, 2003).

A partir de 13.5jpc, les cellules péritubulaires myoïdes apparaissent comme une seule couche de cellules en périphérie des cordons séminifères et présentent une morphologie plate caractéristique.

La région interstitielle, extérieure aux cordons, est composée de cellules de Leydig, de fibroblastes et de cellules endothéliales.



**Figure 3 : Evolution des différents modèles de déterminisme du sexe (D'après Liu *et al.*, 2010)**

(a) Hypothèse de Jost en 1972.

(b) Hypothèse du *Od* de 1983.

(c) Hypothèse du *Z* de 1993.

Les cellules de Leydig sécrètent de la testostérone responsable du maintien des canaux de Wolff. Ce sont les canaux de Wolff qui donneront les canaux efférents, l'épididyme, les canaux déférents et les vésicules séminales.

Les cellules de Sertoli sécrètent l'AMH (Hormone anti-müllérienne) à l'origine de la régression du canal de Müller. C'est SF1 en interaction avec SOX9 qui active le promoteur de l'AMH, un membre de la famille des TGF $\beta$ . Ainsi, l'AMH est exprimé dans les gonades mâles à partir de 12,5jpc chez la souris et 8 semaines chez l'homme. En cas de délétion du gène de l'AMH, les testicules sont correctement développés mais les souris sont infertiles à cause de la persistance des canaux de Müller perturbant ainsi le transport du sperme (Behringer *et al.*, 1994).

Les gonocytes continuent de proliférer jusqu'à leur entrée en quiescence vers 15,5jpc chez la souris. La PGD2 (Prostaglandine D2), produite par les cellules somatiques et germinales testiculaires, active via son récepteur PTGDR2 l'expression de *Cip1* (CDK inhibiteur p21) et sa localisation dans le noyau et réprime également des marqueurs de pluripotence ce qui conduit à l'arrêt des mitoses des cellules germinales (Moniot *et al.*, 2014).

Après la naissance, les gonocytes se déplacent vers la membrane basale des cordons séminifères grâce au complexe KIT/KitL et ils recommencent à proliférer.

#### d) Différenciation de l'ovaire

Les premières observations portant sur la différenciation gonadique ont montré que le développement femelle était une voie par défaut, dans les espèces mammaliennes au déterminisme génétique de type XX-XY. Cette hypothèse est basée sur les expériences de castration réalisées par Jost, en 1953. En castrant des animaux avant la détermination du sexe, quel que soit le sexe chromosomique de l'embryon, l'animal développait un phénotype externe femelle.

Quelques années plus tard, Jost émet l'hypothèse de l'existence d'un élément organisateur mâle forçant le développement d'un testicule et empêchant le développement ovarien (**Figure 3, a**). Puis, Eicher et Washburn observent une souche de souris XY présentant une inversion du sexe. Ils proposent alors un modèle avec un gène de détermination ovarienne « *Od* », localisé sur un autosome ou sur le chromosome X, qui initierait la différenciation ovarienne, et un gène *Tdy* de détermination testiculaire, sur le chromosome Y, qui inhiberait la différenciation de l'ovaire et dont la fonction serait en amont du gène *Od* (**Figure 3, b**).

Le déterminant clé de la différenciation testiculaire *Sry* a ensuite été découvert ainsi que des cas d'hommes XX et de chèvres XX PIS (*Polled Intersex Syndrome*) présentant des testicules chez des femelles XX sans *SRY*, ni aucun fragment du chromosome Y (Pailhoux *et al.*, 2001). Ces données ont

permis de proposer un nouveau modèle pouvant expliquer le mécanisme de différenciation ovarienne. Mc Elreavey propose une nouvelle hypothèse : dans les gonades XX normales, le gène Z inhibe le programme testiculaire. Une perte de fonction du gène Z dans la gonade XX induit la formation d'un testicule ; tandis que, dans les gonades XY, le gène *SRY* a une fonction opposée à celle du gène Z, ce qui permet une progression du programme testiculaire (**Figure 3, c**).

Chez la femelle, une fois les crêtes génitales colonisées par les cellules germinales, ces cellules germinales s'organisent en clusters avec les cellules somatiques pour former des cordons (ou nids) ovigères, à 13,5jpc chez la souris. Ces structures ne sont visibles que par immunomarquage, alors que dans le testicule, au stade comparable, les cordons séminifères et le vaisseau coelomique sont déjà visibles. L'ovaire reste, d'un point de vue morphologique, plus longtemps indifférencié comparé au testicule. Le premier signe de différenciation ovarienne est l'entrée en méiose des ovogonies jusqu'à leur blocage en diplotène de prophase I, à 14,5jpc chez la souris.

Autour de la naissance, les nids ovigères se dissocient et les cellules somatiques entourent les cellules germinales de façon individuelle afin de former les follicules primordiaux. La formation de ces follicules primordiaux est cruciale chez les Mammifères car ce sont eux qui constituent la réserve ovarienne en cellules germinales disponible pendant toute la vie reproductive de la femelle.

L'ovaire présente une organisation compartimentée avec les follicules comme unité fonctionnelle. Un follicule est constitué d'une cellule germinale, l'ovogonie, entourée de cellules somatiques : les cellules de la granulosa et de la thèque. Les follicules subissent une maturation appelée folliculogenèse, un petit nombre sera ovulé à partir de la puberté tandis que la majorité disparaîtra par atrophie au cours de la vie, chez l'animal adulte.

Par des analyses fonctionnelles, plusieurs gènes somatiques spécifiques de l'ovaire ont été identifiés. Parmi eux, on distingue des facteurs intracellulaires comme *Dax1* (*Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region on the X chromosome gene 1*) et *FoxL2* (*Forkhead box family L number 2*) ; et des facteurs extracellulaires tels que *Rspo1* (*R-spondin1 homolog*) et *Wnt4* (*Wingless-related MMTV integration site 4*).

#### e) Les facteurs intracellulaires

*FoxL2* et *Dax1* sont les premiers gènes candidats pour l'organogenèse ovarienne et l'établissement de la lignée des cellules de la granulosa.

Le gène *FoxL2* est un facteur de transcription avec un seul exon, de la famille des gènes à *forkhead box*, conservé au cours de l'évolution.

Chez la souris, *FoxL2* est exprimé au moment du déterminisme gonadique, vers 12jpc. C'est également l'un des premiers gènes à être surexprimé dans l'ovaire en développement, ce qui suggère une fonction importante dans la différenciation ovarienne précoce.

Chez la chèvre, la transcription de *FoxL2* débute dans une sous-population de cellules somatiques localisée dans la médulla de la gonade XX, entre 34 et 36jpc. Ce stade de développement coïncide avec le déterminisme du sexe mâle avec augmentation de l'expression de *Sox9* dans la gonade XY.

L'inactivation de *FoxL2* chez la souris n'induit pas d'inversion du sexe mais les femelles sont stériles (Uda *et al.*, 2004 ; Schmidt *et al.*, 2004). Les ovaires *FoxL2*<sup>-/-</sup> sont petits, désorganisés et dégénèrent par apoptose. A l'inverse, une surexpression du gène *FoxL2* dans les cellules de Sertoli, chez la souris, provoque une désorganisation des tubes séminifères et un développement gonadique de type *ovotestis* (Ottolenghi *et al.*, 2007).

Chez la souris, *FoxL2* semble impliqué dans le maintien de l'ovaire post-natal en réprimant les gènes impliqués dans la différenciation testiculaire. En effet, l'inactivation conditionnelle de *FoxL2* dans les cellules de la granulosa matures chez la souris se traduit par l'expression de *Sox9*, un gène de la voie mâle, et cause un développement de caractères testiculaires dans l'ovaire avec une transdifférenciation des cellules de la granulosa et de la thèque en cellules de Sertoli et de Leydig, respectivement. Les gonades de ces souris XX ressemblent à des testicules avec des tubes séminifères à la place des structures folliculaires. Des études précises de cinétiques d'expression montrent que *FoxL2* et *Sox9* sont exprimés de façon mutuellement exclusive (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que *FoxL2* est requis chez la souris pour inhiber la voie testiculaire et maintenir l'ovaire, au cours du développement embryonnaire et pendant la vie adulte.

Chez la chèvre, il existe une délétion naturelle à l'état hétérozygote du locus PIS se traduisant par une absence de cornes dans les deux sexes. Cette mutation responsable du syndrome PIS correspond à une délétion d'une région régulatrice de 11.7kb en amont du gène *FoxL2* (Pailhoux *et al.*, 2001) et cause une perte d'expression de *FoxL2* ainsi qu'un arrêt de la transcription de trois ARNs longs non-codant (lncRNAs) (PISRT1, PISRT2 et PFOXic). A l'état homozygote, cette délétion induit en plus une inversion sexuelle de type mâle XX (Pailhoux *et al.*, 2001). Cette inversion sexuelle s'accompagne de l'absence d'expression de *FoxL2* dans la gonade XX en développement, avec une augmentation de l'expression du gène *Sox9*, ce qui conduit à une différenciation des cellules somatiques en cellules testiculaires, avec un délai de 4-5 jours comparé à un développement testiculaire normal. Ces résultats suggèrent que *FoxL2* et/ou les lncRNAs pourraient être des gènes du déterminisme du développement ovarien, chez la chèvre.

A l'inverse de la souris, la perte de fonction du gène *FoxL2*, sans perte de fonction des lncRNAs, chez la chèvre est suffisante pour entraîner une inversion du sexe de type mâle XX (Boulanger *et al.*, 2014). La gonade XX présente également une surexpression du gène *Sox9* conduisant à une masculinisation par la différenciation de cellules de Sertoli. On observe également dans ces gonades mutées une expression d'AMH qui provoque la régression des canaux de Müller (Pailhoux *et al.*, 2002). On note donc une masculinisation des gonades et du tractus génital externe chez les chèvres XX mutées pour le gène *FoxL2*.

Chez l'humain, une délétion à l'état hétérozygote de *FOXL2* cause chez les femmes un syndrome PBES (*Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus*) de type 1, associé à une insuffisance ovarienne précoce aboutissant à une infertilité (Crisponi *et al.*, 2001), sans caractéristiques d'inversion sexuelle.

*Dax1* code pour un membre de la famille des récepteurs nucléaires. DAX1 peut agir comme protéine de liaison à l'ADN pour réprimer la transcription (Lalli *et al.*, 2000). Le patron d'expression du gène *Dax1* correspond à un rôle dans la détermination du sexe. En effet, il est exprimé dans les gonades des deux sexes à 11,5jpc chez la souris (Swain *et al.*, 1996). A 12,5jpc, après le pic d'expression de *Sry*, *Dax1* n'est plus exprimé dans la gonade mâle alors que son expression persiste dans la gonade femelle ce qui suggère un rôle du gène *Dax1* dans la formation de l'ovaire. L'inactivation de *Dax1* dans l'embryon de souris se traduit par un défaut de spermatogenèse mais sans inversion du sexe ni perturbation du développement ovarien (Yu *et al.*, 1998). Chez l'homme XY, une duplication d'une portion du chromosome X contenant le gène *Dax1* se traduit par une inversion du sexe, du testicule vers l'ovaire (Zanaria *et al.*, 1994). De la même façon, les souris portant des copies supplémentaires de *Dax1* présentent une inversion sexuelle de type femelle XY (Swain *et al.*, 1998). *Dax1* aurait donc une fonction antagoniste à l'action de *Sry* et aurait un rôle dose-dépendant anti-testiculaire et possiblement pro-ovarien, chez l'homme et la souris.

#### f) La voie *Rspo1*-WNT4- $\beta$ -caténine

Les gènes *Wnt4* et *Rspo1* ont un rôle crucial dans le développement de l'ovaire. Ces deux gènes sont exprimés dans la gonade bipotentielle des deux sexes, puis, au moment de la détermination du sexe, à 11,5jpc chez la souris, leur expression devient spécifique de la gonade femelle, dans les cellules somatiques. L'inactivation de *Rspo1* et *Wnt4*, dans l'embryon femelle de souris, provoque des défauts ovariens similaires : Perte de cellules germinales, apparition de cellules produisant des androgènes, formation d'une vascularisation de type testiculaire (Vainio *et al.*, 1999). Comme les ovaires invalidés pour *Rspo1* et *Wnt4* partagent le même phénotype, on peut penser que ces deux facteurs sont impliqués dans la même voie de régulation de la différenciation ovarienne.

Dans les gonades de souris XX invalidées pour le gène *Wnt4*, l'expression du gène *Rspo1* n'est pas perturbée. A l'inverse, dans les gonades de souris XX invalidées pour le gène *Rspo1*, *Wnt4* n'est plus exprimé (Chassot *et al.*, 2008). L'expression de *Wnt4* est donc sous le contrôle de *Rspo1*. Ces deux gènes sont localisés sur la même région chromosomique. Une duplication de cette zone chez un patient XY cause une inversion sexuelle de type mâle vers femelle (Jordan *et al.*, 2001).

WNT4 et *Rspo1* agissent via l'activation de la  $\beta$ -caténine (protéine Ctnnb1). La voie de signalisation intracellulaire WNT4/  $\beta$ -caténine est très conservée au cours de l'évolution puisqu'elle est retrouvée du nématode à l'homme. La voie  $\beta$ -caténine est une voie canonique décrite pour réguler des phénomènes de prolifération et de différenciation.

L'invalidation de la  $\beta$ -caténine dans les précurseurs des cellules de la granulosa (cellules SF1+) se traduit par un phénotype ovarien similaire à celui obtenu chez les animaux invalidés pour *Rspo1* et *Wnt4* (Liu *et al.*, 2009 ; Manuylov *et al.*, 2008).

L'expression de *Wnt4* et *Rspo1* n'est pas affectée lors de l'invalidation de *FoxL2*, et réciproquement, ce qui suggère que la voie *Wnt4/Rspo1* est indépendant de celle de *FoxL2* (Chassot *et al.*, 2008 ; Ottolenghi *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les gonades XX *Wnt4*<sup>-/-</sup> n'expriment plus le gène de la follistatine et les ovocytes entrent en apoptose avant la naissance (Yao *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que la follistatine est la cible de WNT4. Chez les sauvages, la follistatine est connue pour inhiber la formation du vaisseau cœlomique dans les gonades XX murines.

De plus, il a été montré que l'invalidation de *Wnt4* dans les gonades murines XX était suffisante pour induire une augmentation de l'expression de *Fgf9* et *Sox9*, en absence de *Sry* (Kim *et al.*, 2006). Il existe donc un antagonisme entre *Wnt4* et FGF9/FGFR2 qui contrôle le destin de la gonade. Ainsi, WNT4 interfère indirectement dans le maintien de l'expression du gène *Sox9* et donc sur la différenciation mâle. Des patients XX avec une perte de fonction de *Wnt4* présentent une inversion du sexe de type femelle vers mâle (Bernard and Harley 2007 ; Biason-Lauder *et al.*, 2004).

Dans l'ovaire, la boucle d'amplification de *Sox9* et *Fgf9* est bloquée par WNT4, possiblement via l'activation de la  $\beta$ -caténine.

Durant la différenciation ovarienne, l'activation de la voie  $\beta$ -caténine canonique provoque la dégradation de SOX9 empêchant ainsi la mise en place de sa boucle d'auto-amplification ainsi que l'activation des autres gènes pro-testiculaires, tel que *Fgf9* (Maatouk *et al.*, 2008).

*Rspo1* et *Wnt4* joueraient donc un rôle décisif dans la détermination du sexe féminin et dans la différenciation des gonades en ovaires grâce à un niveau suffisant de  $\beta$ -caténine dans les cellules somatiques ovariennes. L'invalidation de l'un de ces gènes induit une masculinisation de la gonade XX ; ils sont donc indispensables pour une différenciation ovarienne.

Par ailleurs, les souris XX double mutant pour *Rspo1* et *Sox9* présentent une différenciation gonadique de type testiculaire. Ce qui suggère que *Sry* et *Sox9* ne sont pas indispensables pour une inversion du sexe de type mâle XX, les gènes *Sox8* et *Sox10* compenseraient l'absence de *Sox9* pour induire une différenciation gonadique vers la voie mâle. Les souris XY double mutant pour *Rspo1* et *Sox9* présentent également un développement de type mâle. *Rspo1* est donc un gène essentiel pour le développement ovarien, en conditions normales ainsi qu'en condition d'inversion sexuelle (en absence de *Sox9*) (Lavery *et al.*, 2012).

En conclusion, alors que le déterminisme testiculaire fait intervenir deux gènes clés, *Sry* et *Sox9*, le développement ovarien possède plusieurs gènes essentiels : *Rspo1*, *FoxL2*, *Wnt4* et  $\beta$ -caténine. Les voies génétiques de la différenciation femelle et mâle sont donc actives et indépendantes.

### **3. Entrée en méiose des cellules germinales**

L'entrée en méiose n'est pas une fonction intrinsèque aux cellules germinales, elle ne dépend pas seulement du sexe chromosomique (XY mâle et XX femelle). Elle résulte de l'exposition à des signaux venants des cellules somatiques entourant les cellules germinales dans la gonade.

Chez la femelle, les cellules germinales stoppent leur prolifération par mitoses et entrent en prophase I de méiose à 13,5jpc chez la souris, 50-55jpc chez la brebis et 9-14 semaines de grossesse chez la femme. Les ovogonies qui entrent en méiose sont alors appelées ovocytes I. Les cellules germinales se bloquent ensuite au stade diplotène de méiose, cet arrêt est spécifique des femelles. La diacynèse ne reprendra qu'à la puberté et la méiose se poursuivra à l'ovulation. Chez le mâle, la méiose ne débute qu'après la naissance, vers 8 mois chez le bélier et 10 jours chez la souris.

Un des premiers facteurs impliqués dans l'entrée des cellules germinales dans le processus de méiose est *Dazl* (*Deleted in azoospermia-like*). DAZL est une protéine de liaison à l'ARN, exprimée à partir de 11,5jpc par les cellules germinales mâles et femelles chez la souris.

L'invalidation du gène *Dazl* se traduit par une infertilité des souris des deux sexes avec une absence d'expression des gènes impliqués en début de prophase I, dont le gène *Stra8* (*Stimulated by Retinoic Acid*) par exemple (Lin *et al.*, 2008).

*Dazl* est exprimé précocement, en amont du gène *Stra8*, responsable de l'initiation de la prophase I de méiose. DAZL rend donc les cellules germinales compétentes pour entrer en méiose.

Chez la souris femelle, l'entrée en méiose des cellules germinales semble dépendre de l'acide rétinoïque (AR) (Bowles *et al.*, 2006). L'AR est un métabolite actif de la vitamine A synthétisé par le mésonéphros dans les deux sexes par les actions successives de la rétinol-déshydrogénase et de la rétinol-déshydrogénase. Cette induction de la méiose par l'acide rétinoïque a également été décrite chez l'homme (Le Bouffant *et al.*, 2010). L'AR est également essentiel pour le développement de nombreux organes.

Chez la souris, l'AR est synthétisé par le mésonéphros des deux sexes et diffuserait vers la gonade adjacente (Bowles *et al.*, 2006). Une concentration élevée d'AR est responsable de l'induction de la méiose dans les ovaires fœtaux en développement (Koubova *et al.*, 2006). L'inhibition chimique des récepteurs à l'AR (RAR de type  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) dans des cultures *ex vivo* de gonades fœtales murines femelles cause une inhibition de *Stra8* et une inhibition de l'entrée en méiose (Koubova *et al.*, 2006). L'AR se fixe sur son récepteur RAR, l'ensemble récepteur-ligand va activer ses gènes cibles, dont *Stra8*, en se fixant sur des éléments régulateurs de type RARE (*Retinoic Acid Response Element*) (Oulad-Abdelgnami *et al.*, 1996). *Stra8* code pour un facteur de transcription riche en acide glutamique. L'inactivation du gène *Stra8* chez la souris empêche l'entrée en méiose des cellules germinales dans l'ovaire fœtal ainsi que dans le testicule post-natal (Baltus *et al.*, 2006).

Dans l'ovaire fœtal, les cellules germinales répondent à leur environnement somatique et donc à la présence d'AR. *Stra8* est exprimé et provoque l'entrée en méiose des cellules germinales. Ce phénomène s'accompagne de la diminution de l'expression de gènes de pluripotence comme *Pou5f1* et de l'augmentation de l'expression de gènes clés intervenant ensuite dans la méiose comme *Sycp3* et *Dmc1* (Menke *et al.*, 2003 ; Bullejos and Koopman, 2004 ; Yao *et al.*, 2003). L'augmentation d'expression de *Stra8* provoque l'expression de *Sycp3* et *Rec8* dont les protéines vont se localiser le long des chromosomes. Ceci atteste d'une préparation des cellules germinales pour l'appariement et la recombinaison des chromosomes (Lee *et al.*, 2003).

De plus, une étude portant sur les souris invalidées pour *Aldh1a2* apporte un bémol au rôle de l'AR provenant du mésonéphros et induisant la méiose dans l'ovaire fœtal murin. Les souris invalidées pour *Aldh1a2* sont dépourvues d'AR endogène mais leur alimentation est supplémentée en AR pour éviter la mort des souriceaux. Les ovaires fœtaux de ces souris présentent une expression de *Stra8* non modifiée par rapport aux ovaires WT (Kumar *et al.*, 2011). L'ovaire fœtal de souris pourrait donc produire de l'AR en quantité suffisante pour induire *Stra8*. Les auteurs de cette étude suggèrent que

l'AR synthétisé par le mésonéphros dans un embryon de souris normal ne diffuserait pas en quantité suffisante pour stimuler l'expression de *Stra8* dans l'ovaire fœtal.

Cependant, la régulation de l'initiation de la méiose par l'AR pourrait varier selon l'espèce étudiée. Dans l'ovaire fœtal humain, l'expression d'ALDH1A1 (*Aldehyde dehydrogenase family 1 ; subfamily A1*), permettant la synthèse d'AR, est augmentée lorsque la méiose débute. L'expression de CYP26b1 n'est, par contre, pas modifiée. Par ailleurs, le niveau d'expression de *Cyp26b1* est plus élevé dans l'ovaire comparé au testicule (Le Bouffant *et al.*, 2010). Dans l'ovaire fœtal murin, au moment de la méiose, l'expression de l'ALDH1 est inchangée mais celle de *Cyp26b1* diminue ce qui empêche la dégradation de l'AR. Deux hypothèses ont été émises : l'ALDH1 contrôlerait le niveau d'AR dans l'ovaire fœtal humain (Le Bouffant *et al.*, 2010) ou l'ovaire fœtal humain serait capable de réaliser la synthèse intrinsèque de l'AR (Childs *et al.*, 2011).

Un autre gène a été décrit comme étant impliqué dans l'entrée en méiose, le gène *Dmrt1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*). Le gène *DMRT1* appartient à la famille des gènes à domaine DM, montrée comme ayant un rôle dans le développement spécifique du sexe chez plusieurs espèces sans *Sry* comme certains poissons et les oiseaux où *DMRT1* agit comme gène du déterminisme primaire du sexe. *DMRT1* est aussi lié à des cas de tumeurs des cellules germinales testiculaires chez l'humain, un phénotype qui rappelle celui des souris invalidées pour *Dmrt1* (en fond 129Sv). Ces souris présentent un cycle cellulaire anormal incluant une mauvaise régulation de l'entrée en méiose, ce qui contribue à la formation des tumeurs (Krentz *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'invalidation de *Dmrt1* chez la souris en fond pur C57BL6 montre que l'expression de *Stra8* est diminuée dans les ovaires fœtaux et qu'en conséquence le nombre de follicules dans l'ovaire mature est également diminué (Krentz *et al.*, 2011). L'implication de *Dmrt1* dans la régulation de la méiose semble être différente selon le sexe. En effet, l'invalidation conditionnelle de *Dmrt1* dans le testicule post-natal se traduit par une augmentation de l'expression de *Stra8* (Matson *et al.*, 2010). Des études de ChIP (Immuno-précipitation de la chromatine) ont montré que *DMRT1* était capable de se lier sur la même région promotrice proximale du gène *Stra8* dans le testicule postnatal (Matson *et al.*, 2010) et dans l'ovaire fœtal (Krentz *et al.*, 2011). Si la fixation de *DMRT1* à la même région régulatrice peut donner deux effets opposés sur l'expression de *Stra8* entre un mâle et une femelle, cela suggère qu'il doit y avoir d'autres facteurs impliqués pour entraîner un rôle de *Dmrt1* dans la régulation de la méiose.

Les facteurs de transcription à homéodomaine *Msx* (ou *Hox*, *Muscle segment homeobox-like*) ont été décrits comme ayant un rôle important dans le développement fœtal, en particulier pour la structuration dorso-ventrale de l'embryon (Yamamoto *et al.*, 2001). *Msx1* et *Msx2* chez la souris

(*MSX1* et *MSX2* chez l'humain) sont exprimés dans l'ovaire foetal murin avec un pic d'expression à 13,5jpc, ce qui correspond à l'initiation de la méiose. Leur expression est plus importante dans l'ovaire que dans le testicule où elle reste très faible, même pendant l'initiation de la méiose mâle entre 5 et 15jpc. De la même façon, dans l'ovaire foetal humain, *MSX1* et *MSX2* sont fortement exprimés pendant l'initiation de la méiose à 14,5 semaines après la fécondation. *Msx1* et *Msx2* sont exprimés majoritairement dans les cellules germinales ovariennes et leur expression est stimulée par l'AR et BMP4. La double invalidation de *Msx1* et *Msx2* chez la souris est létale avec une diminution de l'entrée des cellules germinales en méiose à 14,5jpc (Le Bouffant *et al.*, 2011). Les ovaires invalidés pour *Msx1* et *Msx2* présentent une diminution de l'expression de *Stra8* s'expliquant par la liaison de *MSX1* sur le promoteur de *Stra8*. *Msx1* et *Msx2* semblent donc stimuler l'expression de *Stra8*, nécessaire pour l'initiation de la méiose et sa progression dans l'ovaire foetal.

Dans la gonade mâle, les cellules de Sertoli protègent les cellules germinales de l'effet de l'AR en exprimant le gène *Cyp26b1*. En effet, ce gène code pour une enzyme, CYP26B1, qui inhibe l'entrée en méiose des cellules germinales en dégradant l'AR. CYP26B1 crée un déficit en AR spécifique du testicule. Il n'y a ainsi pas induction de *Stra8*, ni d'entrée en méiose des cellules germinales avant la puberté chez le mâle.

Puis à partir de 13,5jpc, l'expression de *Cyp26b1* par les cellules de Sertoli diminue et le gène *Nanos2* prend le relais. A ce stade, *Nanos2* est exprimé par les cellules germinales mâles et bloque l'expression de *Stra8* inhibant ainsi l'entrée en méiose des cellules germinales (Suzuki et Saga, 2008). La surexpression de *Nanos2* dans les cellules germinales mâles est induite par FGF9 (Barrios *et al.*, 2010), également impliqué dans la différenciation du testicule.

Dans le testicule foetal, la voie de signalisation de l'AR est donc réprimée par une combinaison de dégradation active par CYP26B1 et par l'action antagoniste de FGF9. Les cellules germinales XY maintiennent l'expression des gènes de pluripotence et continuent à proliférer. Elles entrent ensuite en quiescence, en G0/G1 du cycle cellulaire, de façon asynchrone entre 12,5-14,5jpc et se différencient en prospermatogonies. Elles resteront à ce stade jusqu'à la puberté. A ce moment-là, l'AR sécrété par les cellules de Sertoli, en balance avec FGF9, régulera le niveau d'expression de *Nanos2*. Les spermatogonies positives pour *Nanos2* resteront indifférenciées tandis que les spermatogonies positives pour *Stra8* entreront en différenciation. L'expression de *Stra8* constitue le premier signe visible montrant la décision de la cellule germinale à entrer en méiose.

#### 4. *Différences entre la méiose mâle et femelle*

Chez le mâle, la méiose aboutit à la formation de quatre gamètes haploïdes. Chez la femelle, la moitié des chromosomes issus de la première division méiotique est empaquetée dans une structure cellulaire séparée que l'on appelle globule polaire. En méiose II, un deuxième globule polaire se forme contenant la moitié du produit de la deuxième division de méiose. La méiose femelle conduit donc à la formation d'un ovocyte avec un noyau haploïde et de deux globules polaires, bien que l'ovocyte ne soit jamais vraiment haploïde puisque le spermatozoïde a déjà pénétré dans le cytoplasme de l'ovocyte avant l'accomplissement de la méiose II (Revue : Morelli and Cohen, 2005).

La méiose présente un fort dimorphisme sexuel. En effet, contrairement au mâle où la méiose est se déroule après la naissance, chez la femelle, la prophase I de méiose a lieu pendant la vie fœtale tandis que la métaphase I et les étapes suivantes se déroulent après la puberté.

Tandis que la méiose mâle se déroule sans interruption, la méiose femelle présente deux arrêts. Le premier, au stade diplotène et pendant la vie fœtale, c'est ce qu'on appelle l'arrêt dictyate. Les cellules germinales femelles restent quiescentes jusqu'à la maturité sexuelle. Après la puberté, à chaque ovulation, un ovocyte reprend la méiose et achève la première division de méiose, expulsant le premier globule polaire. Le deuxième arrêt a lieu en métaphase II. A la fécondation où la deuxième division méiotique se termine, le second globule polaire est alors expulsé.

Par ailleurs, chez la souris femelle, durant le développement embryonnaire, la population entière d'ovocytes entre de façon semi-synchronisée en méiose, jusqu'au stade diplotène où elle s'arrête et reste en quiescence. A la puberté, un nombre sélectionné d'ovocytes est recruté à chaque cycle d'œstrus pour poursuivre la méiose I et II. A l'inverse, chez le mâle, la spermatogenèse se fait par vagues tout au long de la vie adulte. La prolifération des spermatogonies par mitose apporte une nouvelle population de spermatocytes à chaque vague.

Même s'il existe d'importantes différences entre les méioses mâle et femelle (temporelle, en nombre de gamètes...), les processus de recombinaison et d'appariement chromosomiques semblent largement conservés entre les deux sexes. Cependant, on observe une différence importante dans le taux de succès de la méiose entre mâle et femelle. En particulier chez l'homme où le taux d'aneuploïdie représente jusqu'à 25% dans l'ovocyte contre seulement 2% dans le spermatozoïde (Hassold and Hunt, 2001). L'aneuploïdie est principalement due à une non-disjonction des chromosomes. On pense que les mécanismes régulant et contrôlant la prophase I pendant la méiose chez les mammifères seraient plus drastiques chez le mâle que chez la femelle. L'échec des points de

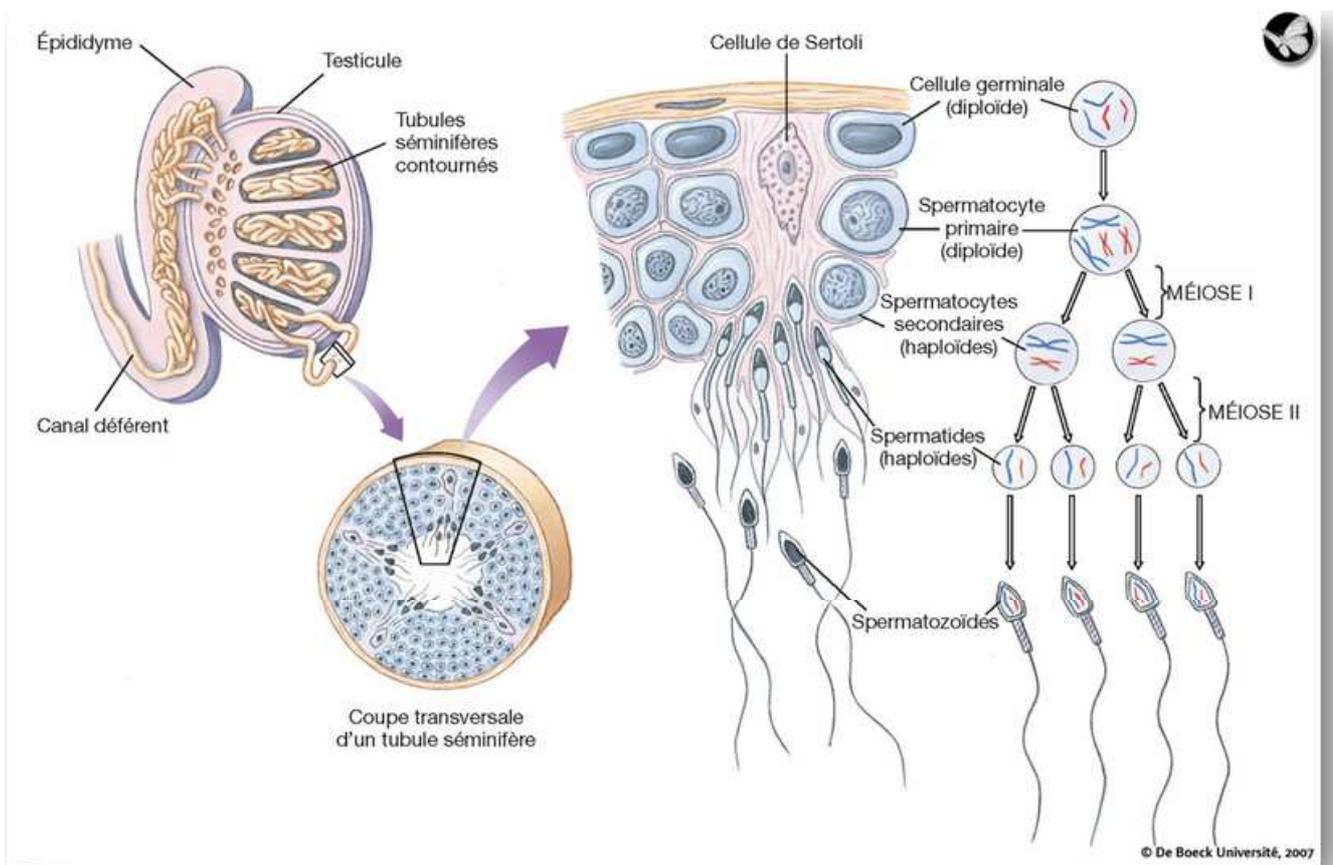
contrôle chez la femelle serait responsable de l'augmentation du taux de non-disjonction en méiose I.

Cette différence dans le contrôle de la méiose est retrouvée dans plusieurs modèles de souris portant des mutations responsables d'un mauvais appariement des chromosomes homologues et/ou d'une recombinaison incorrecte. Chez le mâle, ce genre de mutations provoque souvent un arrêt de la méiose. Les cellules germinales ne progressent pas au-delà des stades zygotène ou pachytène, ce qui aboutit à une apoptose généralisée des spermatocytes et par conséquent une infertilité due à une absence de spermatozoïdes matures. Chez la femelle, le même type de mutations conduit également à un défaut de l'appariement chromosomique mais entraîne des phénotypes plus variés comme une fertilité réduite, une perte embryonnaire (probablement causé par des embryons aneuploïdes), une infertilité complète ou une dysgénésie ovarienne.

D'autre part, l'un des éléments clé de la prophase I de méiose est la mise en place du complexe synaptonémal, indispensable pour l'appariement des chromosomes. Bien que ce complexe soit présent pendant la méiose mâle et femelle, il existe des différences entre les deux sexes. Ainsi, le complexe synaptonémal est environ deux fois plus long dans des ovocytes humains comparé aux spermatocytes, augmentant aussi le nombre de crossing-over (Tease and Hulten, 2004).

On observe également, chez la souris, une rétention des protéines du complexe synaptonémal au niveau des centromères jusqu'en anaphase de deuxième division de méiose chez le mâle alors que le complexe synaptonémal disparaît avant la première division de méiose chez la femelle (Hodges *et al.*, 2001). Ce résultat suggère une différence liée au sexe qui expliquerait la plus forte proportion d'erreur lors de la méiose femelle.

On distingue aussi des différences entre le mâle et la femelle concernant la formation des cassures double brin pendant la méiose. L'inactivation du gène *Spo11*, codant pour l'enzyme responsable de la formation des cassures double brin, illustre bien cette différence. Les mâles *Spo11*<sup>-/-</sup> sont stériles car leurs cellules germinales présentent de sévères défauts d'appariement et sont incapables de progresser au-delà du stade zygotène de prophase I de méiose. Les femelles *Spo11*<sup>-/-</sup> sont également stériles mais un défaut ovocytaire apparaît dès 15jpc. Malgré cela, certains ovocytes progressent jusqu'au stade dyctiate même si on observe, après la naissance, une déplétion ovocytaire et une dysgénésie ovarienne (Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Ces résultats montrent que les cassures double brin sont essentielles à la recombinaison méiotique dans les deux sexes mais que l'absence de ces cassures provoque une perte draconienne des spermatocytes en pachytène alors que les ovocytes sont capables de progresser au-delà de ce stade (pour rencontrer des effets délétères un peu plus tard).



**Figure 4 : Représentation schématique d'un testicule et d'un tube séminifère, en coupe transversale (De Boeck Université, 2007)**

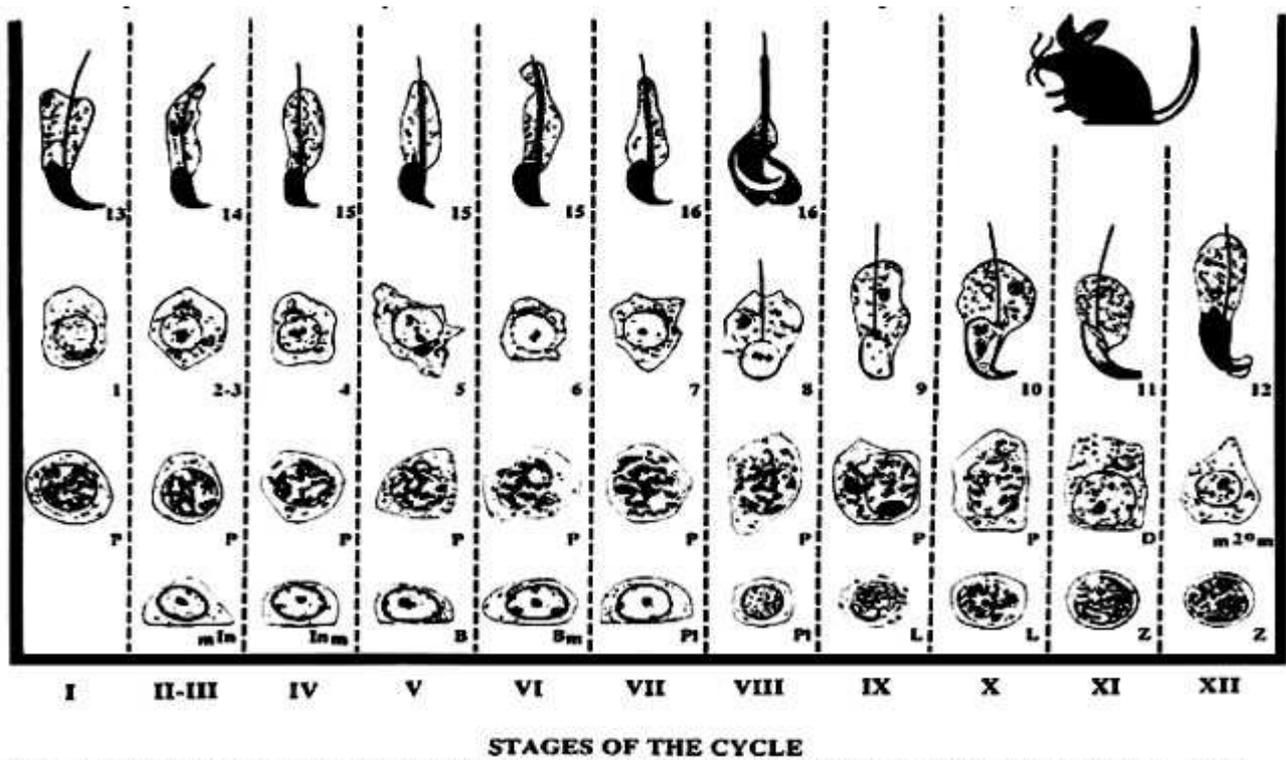
Le testicule renferme les tubes séminifères qui se rejoignent et aboutissent à l'épididyme, lui-même finissant dans le canal déférent. En coupe transversale, le tube séminifère présente un épithélium séminifère constitué de cellules de Sertoli entourant les cellules germinales en méiose.

Chez l'humain et la souris, les femelles présentent davantage de recombinaisons que les mâles, et ces recombinaisons sont préférentiellement localisées dans les régions distales des chromosomes chez le mâle (Revue : Hassold *et al.*, 2000 ; Tease et Hulten, 2004). Le nombre de cassures double brin est comparable entre le mâle et la femelle mais, au final, il y a davantage de chiasma chez la femelle.

Chez les mammifères et plus particulièrement l'homme, les femelles présentent plus de crossing-over que les mâles et ces crossing-over sont distribués de façon plus uniforme le long des chromosomes (Hassold *et al.*, 2000). Le nombre de foci de MLH1 (marqueur des crossing-over) s'élève à environ 60 (entre 42 à 95 selon les études) chez la femme (Lenzi *et al.*, 2005, Morelli and Cohen, 2005) contre seulement 20-50 chez l'homme (Lynn *et al.*, 2002).

D'un autre côté, le point de contrôle du fuseau méiotique, le SAC (*Spindle assembly checkpoint*) semble être moins drastique chez les mammifères femelles comparés aux mâles. En effet, les ovocytes poursuivent la première division de méiose malgré des perturbations éventuelles du fuseau ou de l'alignement des chromosomes, alors que les spermatocytes présentant des défauts similaires entrent en apoptose dès la métaphase I. L'invalidation des gènes codant pour MLH1 et MLH3 illustre ce dimorphisme sexuel. Dans les spermatocytes invalidés pour ces gènes, les chromosomes ne restent pas attachés au stade diplotène ce qui cause l'entrée en apoptose des cellules germinales en métaphase I. A l'inverse, certains ovocytes sont capables de progresser suffisamment pour expulser un globule polaire (Eaker *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les mâles et les femelles présentent des caractéristiques spécifiques à leur sexe, ce qui nécessite des mécanismes adaptés. Les cellules germinales mâles ont besoin d'assurer la ségrégation correcte des chromosomes X et Y qui ne s'apparient pas totalement. De plus, l'environnement testiculaire étant situé 5 à 7°C en dessous de la température corporelle, le testicule doit avoir une réponse spécifique aux fluctuations de température. De son côté, la femelle doit initier, maintenir et sortir de l'arrêt dictyate.



**Figure 5 : Schéma des 12 stades de l'épithélium séminifère chez la souris (Russell et al., 1990)**

Chaque stades de l'épithélium séminifère est constitué de plusieurs types de cellules germinales à différents stade de différenciation.

Les chiffres de 1 à 16 correspondent aux différents stades de la différenciation des spermatozoïdes, au cours de la spermiogénèse.

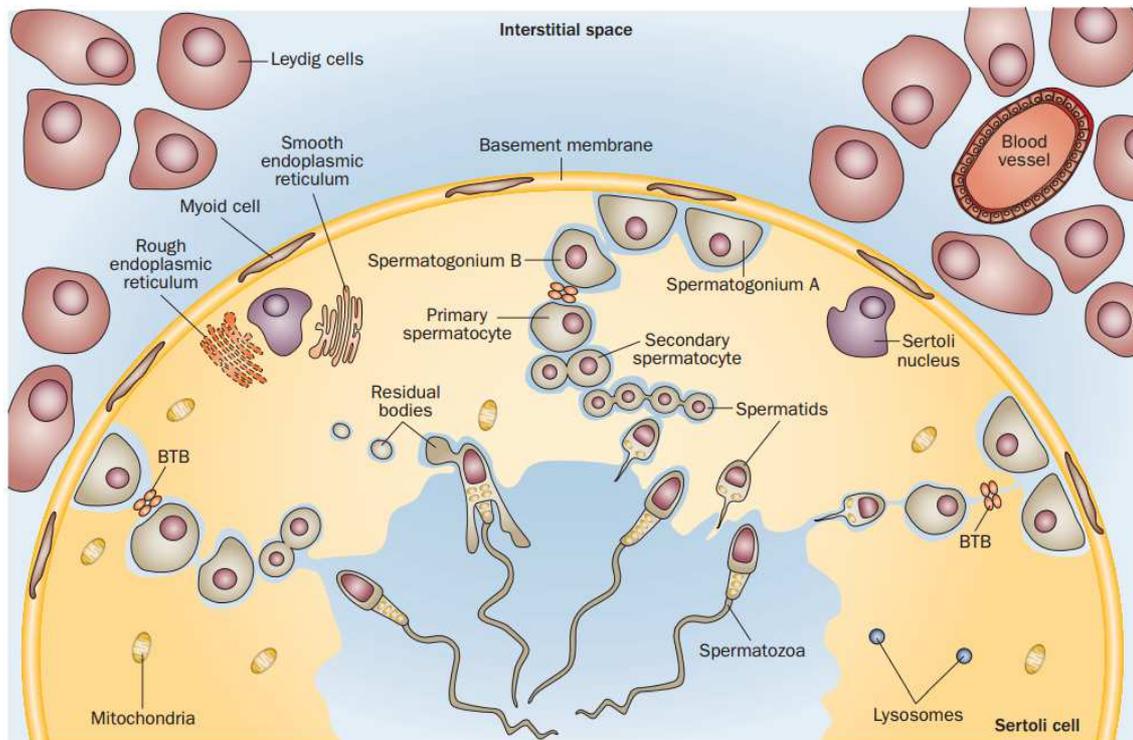
## B. Morphologie du testicule

Le testicule est un organe à fonction exocrine (production de spermatozoïdes) et endocrine (production d'androgènes), enveloppé d'une capsule conjonctive, l'albuginée. Le testicule est constitué de lobules contenant les tubes séminifères, où a lieu la spermatogenèse. Le testicule est une structure fibreuse, riche en vaisseaux sanguins, contenant de nombreuses fibres de muscles lisses et de collagène permettant des contractions rythmiques afin d'expulser les fluides intratesticulaires et les spermatozoïdes vers l'épididyme.

Dans le testicule, les tubes séminifères se rejoignent pour former un réseau lacunaire, le *Rete Testis*. Cinq canaux efférents émergent du *Rete Testis* et se rejoignent pour former un canal unique : le canal épидидymaire (**Figure 4**).

On distingue deux compartiments distincts dans le testicule : le tissu interstitiel, minoritaire, et les tubes séminifères. Le tissu interstitiel est composé des cellules de Leydig qui produisent des facteurs de croissance et les androgènes, de macrophages, de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les tubes séminifères sont constitués de cellules germinales enfermées par une couche de cellules de Sertoli dont l'ensemble est entouré par les cellules myoïdes pérítubulaires. Ces cellules vont entrer dans un processus continu de différenciation cellulaire : la spermatogenèse.

L'examen histologique des tubes séminifères en coupe transversale montre qu'ils présentent toujours la même association de cellules germinales à différents niveaux de différenciation en couches superposées. Cette organisation s'explique par l'évolution régulière et coordonnée des différentes générations de cellules germinales. Les cellules germinales les moins différenciées se trouvent le long de la membrane basale du tube tandis que les cellules les plus différenciées sont près de la lumière. Les différentes générations de cellules germinales composent un certain nombre d'associations cellulaires de composition constante. Ces associations cellulaires constituent ce que l'on appelle les stades de l'épithélium séminifère (**Figure 5**). Chaque stade présente une longueur bien définie ainsi qu'une durée précise et constante, spécifique de chaque espèce. La répétition de ces stades constitue le cycle de l'épithélium séminifère. En 1901, Regaud définit que « la vague spermatogénique est dans l'espace, ce que le cycle de l'épithélium est dans le temps ».



**Figure 6 : Illustration schématique de la spermatogenèse (Rato *et al.*, 2012)**

L'épithélium séminifère se compose des cellules de Sertoli et de cellules germinales en développement, à différents stades. Les cellules de Leydig et les vaisseaux sanguins se localisent dans l'espace interstitiel.

Les spermatogonies de type A se divisent et se développent en spermatogonies de type B, qui se différencient à leur tour en spermatozytes primaires. Ces cellules entament la méiose I afin de séparer les chromosomes homologues et former ainsi les spermatozytes secondaires haploïdes. Ces derniers entrent alors en méiose II, ce qui aboutit à la séparation des chromatides sœurs pour donner naissance aux spermatides. Les spermatides débutent leur différenciation en spermatozoïdes qui seront libérés dans la lumière du tube séminifère.

BTB : Barrière Hémato-Testiculaire.

## 1. *Les cellules de Sertoli*

La cellule de Sertoli accompagne les cellules germinales pendant tous leurs stades de différenciation. C'est une grande cellule au noyau pyramidale qui repose sur la lame basale du tube séminifère et qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Ses faces latérales sont en contact étroit avec les cellules germinales ainsi qu'avec les cellules de Sertoli voisines (**Figure 6**).

La prolifération des cellules de Sertoli s'arrête précocement, au moment de la mise en place de jonctions serrées entre elles, ce qui aboutit à la formation de la lumière du tube séminifère. D'autres types de jonctions permettent des contacts entre deux cellules de Sertoli : les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires (Mital *et al.*, 2011).

L'arrêt de la multiplication coïncide avec des modifications morphologiques et fonctionnelles, c'est la maturation des cellules de Sertoli. Ces cellules sont polarisées et présentent une activité de sécrétion.

Les jonctions (serrées, communicantes, desmosomes et spécialisations ectoplasmiques) au pôle basal des cellules de Sertoli constituent la barrière sertolienne et forment ainsi deux compartiments : le compartiment basal contenant les spermatogonies et les spermatocytes en pré-leptotène et le compartiment adluminal qui contient les spermatocytes et les spermatides (Cheng and Mruk, 2004).

Les spécialisations ectoplasmiques sont des structures jonctionnelles spécifiques du testicule, formées par les cellules de Sertoli, qui sont composées de la membrane plasmique, de faisceaux d'actine et qui sont attachées au réticulum endoplasmique (Cheng and Mruk, 2002).

Cette barrière est indispensable à la différenciation des cellules germinales, que ce soit avant ou après la méiose. Les cellules germinales haploïdes sont isolées dans un environnement contrôlé par les cellules de Sertoli indispensable à la méiose. En effet, la barrière sertolienne sélectionne des ions et maintient la polarité des cellules de Sertoli et la cytoarchitecture du tube séminifère. Elle a également un rôle de barrière immunitaire en protégeant les cellules haploïdes du stress et des infections virales par exemple. La fermeture et l'ouverture des jonctions serrées pour laisser passer les spermatocytes vers le compartiment adluminal se font en coordination avec le développement des cellules germinales (Cheng and Mruk, 2012).

Chez les rongeurs, l'ensemble barrière sertolienne, vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques et cellules péritubulaires constitue la barrière hémato-testiculaire (Dym et Fawcett, 1970). Cette barrière isole les cellules germinales post-méiotiques de l'environnement externe du testicule et particulièrement des cellules immunitaires circulantes et de leurs produits humoraux. Il est en effet vital pour la fertilité masculine de protéger les cellules germinales du système immunitaire. 5 à 10%

des infertilités mâles sont causées par une auto-immunité aux antigènes testiculaires (McLachlan *et al.*, 2002). Cependant, la barrière hémato-testiculaire est en changement continu car elle doit permettre le passage des cellules germinales lorsqu'elles se développent pour se déplacer vers la lumière du tubule (Franca *et al.*, 2012)

En plus de compartimenter le tube séminifère, les cellules de Sertoli sont en lien étroit avec les cellules germinales par, entre autres, des jonctions serrées ou des jonctions communicantes. Le nombre de cellules germinales est corrélé au nombre de cellules de Sertoli (une trentaine de cellules germinales par cellule de Sertoli) (Orth *et al.*, 1988). Les cellules de Sertoli soutiennent et nourrissent les cellules germinales durant tout leur développement. Les cellules de Sertoli produisent de nombreuses protéines importantes pour la spermatogenèse : des glycoprotéines qui facilitent le transport des ions et des hormones ou qui ont une fonction de protection comme la transferrine, l'ABP (*androgen binding-protein*) et la cérulosplasmine ; des protéases et des inhibiteurs des protéases impliqués dans le processus de remodelage tissulaire afin de permettre la spermiation ou le passage des spermatozytes dans le compartiment adluminal du tube séminifère ; des composants de structure de la membrane basale localisée entre les cellules de Sertoli et les cellules périlitubulaires (Grisworld *et al.*, 1998 ; Sofikitis *et al.*, 2008). Les cellules de Sertoli sécrètent en particulier le fluide testiculaire permettant le transport des spermatozoïdes vers l'épididyme.

L'une des premières protéines sécrétées par les cellules de Sertoli est l'AMH, elle est exprimée dès le début de l'assemblage des cordons testiculaires, dès 6 semaines chez l'homme. L'AMH est un membre de la famille des cytokines incluant les TGF $\beta$  (*Transforming growth factor*), les activines, les inhibines et les BMP. L'AMH est le seul ligand du récepteur à l'AMH de type II (Mishina *et al.*, 1996). L'expression de l'AMH diminue en période périnatale, puis elle est maintenue à haut niveau jusqu'à la puberté où elle diminue lorsque les cellules de Sertoli arrivent à maturation. Dans le fœtus mâle, l'AMH induit la régression des canaux de Müller. L'AMH est impliqué dans la régulation de la stéroïdogénèse par les cellules de Leydig, la maturation des gonocytes en spermatogonies de type A dans le testicule périnatal et la spermatogenèse dans le testicule adulte.

## 2. Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont les cellules stéroïdogènes du testicule, elles sont en dehors des tubes séminifères et organisées en îlots à proximité des capillaires sanguins.

Deux populations de cellules de Leydig peuvent être décrites au cours du développement : les cellules de Leydig fœtales, présentent dans l'interstitium à partir de 12.5jpc jusqu'après la naissance chez la souris, et les cellules de Leydig adultes qui apparaissent à la puberté. Ces deux populations présentent des différences en terme d'origine et de fonction (Shima *et al.*, 2013). La synthèse de testostérone nécessite quatre enzymes, CYP11A1 (*P450 side chain cleavage*), HSD3B (*3-beta-hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase*), CYP17A1 (*cytochrome P450 17-hydroxylase*) et 17 $\beta$ HSDIII (*17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*), qui sont de bons marqueurs des cellules de Leydig. Les cellules de Leydig fœtales peuvent produire de l'androstenedione mais pas la testostérone car elles n'expriment pas la 17 $\beta$ HSDIII. Les cellules de Sertoli fœtales convertissent l'androstenedione en testostérone car elles expriment la 17 $\beta$ HSDIII (Shima *et al.*, 2013).

Dans le testicule fœtal, les cellules de Sertoli expriment dès 11.5jpc chez la souris le morphogène DHH (Bitgood et McMahon, 1995) tandis que la majorité des cellules interstitielles, dont les futures cellules de Leydig, expriment son récepteur PTCH1 à 12,5jpc chez la souris. La voie de signalisation DHH induit la spécification des cellules de Leydig.

Après la spécification, la population de cellules de Leydig fœtale est multipliée par deux pendant l'embryogenèse, ce phénomène ne serait pas dû à une prolifération des cellules de Leydig différenciées mais à une différenciation de cellules souches (Orth *et al.*, 1982).

De plus, dès 12.5jpc chez la souris, les cellules interstitielles expriment des éléments de la voie de signalisation Notch : le récepteur NOTCH3 et l'effecteur Hes1. La mutation de *Hes1* se traduit par une augmentation du nombre de cellules de Leydig différenciées. A l'inverse, une surexpression de la voie Notch dans les cellules somatiques à 11,5jpc conduit à une diminution du nombre de cellules de Leydig associée à une augmentation du nombre de progéniteurs somatiques (Tang *et al.*, 2008). La voie Notch maintient donc la population de progéniteurs et restreint leur différenciation en cellules de Leydig.

Les cellules de Sertoli expriment, à 12.5jpc chez la souris, le PDGFA (*Platelet-derived growth factor A*) qui stimule la différenciation des cellules de Leydig via son récepteur PDGFRA. Les gonades XY invalidées pour *Pdgfra* présentent une réduction de la prolifération des cellules de Sertoli et de la différenciation des cellules de Leydig fœtales (Brennan *et al.*, 2003). Néanmoins, le défaut de différenciation des cellules de Leydig pourrait découler du phénotype sertolien.

Les cellules de Sertoli expriment également DAX1 qui a un rôle dans la survie des cellules de Leydig.

Les cellules de Leydig fœtales produisent, en partenariat avec les cellules de Sertoli, la testostérone, à partir de 12.5-13jpc chez la souris, avec un pic avant la naissance (Wainwright and Wilhelm, 2010, Chapter Six). Les androgènes stimulent la différenciation des organes génitaux internes (épididymes, canaux déférents et vésicules séminales) à partir des canaux de Wolff.

Le développement des cellules de Leydig post-natales comporte plusieurs étapes successives : il débute par la prolifération de cellules précurseurs qui se différencient en cellules progénitrices de cellules de Leydig qui donneront elles-mêmes les cellules de Leydig adultes nouvellement formées. Ces cellules de Leydig nouvellement formées se différencient en cellules de Leydig adultes immatures puis en cellules de Leydig matures (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001).

Des cellules mésenchymateuses de l'interstitium du testicule se différencient pendant la gestation pour donner les cellules de Leydig fœtales. D'autres cellules mésenchymateuses conservent leurs caractéristiques indifférenciées pour donner, en post-natal, les cellules précurseurs des cellules de Leydig adultes. Chez le rat, les précurseurs des cellules de Leydig adultes correspondent aux cellules mésenchymateuses périvitubulaires (Ariyaratne *et al.*, 2000).

Les cellules précurseurs se différencient ensuite en cellules progénitrices des cellules de Leydig adultes. Les cellules progénitrices sont morphologiquement indifférenciables des cellules précurseurs puisque ces deux types cellulaires sont fusiformes et en position périvitubulaires. Mais les cellules progénitrices expriment des enzymes stéroïdogéniques, elles sont capables de produire des androgènes, et présentent des récepteurs de LH (Hormone Lutéinisante). Les cellules progénitrices subissent ensuite un changement de forme pour devenir rondes et se déplacent pour migrer au centre de l'interstitium. Elles sont alors appelées cellules de Leydig adultes nouvellement formées. Ces cellules de Leydig sont bien identifiables morphologiquement, elles sont petites et polygonales, leur contenu cytoplasmique est clairsemé et ne présente pas ou peu de gouttelettes lipidiques. Les cellules de Leydig nouvellement formées augmentent ensuite de taille et deviennent des cellules de Leydig adultes immatures qui présentent davantage de lipides cytoplasmiques et de récepteurs de LH. Ces cellules de Leydig immatures produisent principalement des androgènes 5 $\alpha$ -réduits plutôt que de la testostérone (Revue : Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001).

La transition de cellules de Leydig adultes immatures à matures correspond à une augmentation de la taille des cellules associée à la disparition des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. La capacité de sécrétion de testostérone est augmentée dans ces cellules matures à cause d'une hausse du nombre de récepteur de LH (Shan et Hardy, 1992). De plus, les organelles responsables de l'activité

stéroïdogénique, comme le réticulum endoplasmique lisse, augmentent de volume. A l'accomplissement de la transition vers les cellules de Leydig adultes matures, la puberté est réalisée.

La différenciation post-natale des cellules de Leydig est régulée par plusieurs facteurs dont la LH comme régulateur clé. En plus d'induire la prolifération des cellules de Leydig immatures, l'IGF-1 (*Insuline-like growth factor 1*) stimule la différenciation des cellules de Leydig immatures en cellules matures adultes (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). Les TGFA et TGFB (*Transforming growth factor*) ont été décrits comme stimulant les mitoses des cellules de Leydig en présence de LH. Le PDGFA est également un facteur essentiel à la différenciation des cellules de Leydig adultes. Enfin, certaines cytokines, sécrétées par les macrophages testiculaires, ont aussi un effet mitogénique sur les cellules de Leydig. Les androgènes régulent la différenciation des cellules de Leydig de façon différente selon l'étape, l'étape la plus sensible aux androgènes étant la différenciation des cellules de Leydig adultes immatures en cellules matures.

### 3. *Les cellules péritubulaires myoïdes*

Les cellules péritubulaires myoïdes sont des cellules très allongées et plates qui entourent les cellules de Sertoli au sein des tubes séminifères dans leur partie la plus externe et leur apporte un soutien structurel.

Lors du développement fœtal, les cellules péritubulaires myoïdes contribuent à la formation et à l'architecture des cordons testiculaires. Cependant, elles ne sont pas impliquées dans le regroupement initial des cellules de Sertoli et des cellules germinales (Combes *et al.*, 2009). Les cellules péritubulaires établissent l'architecture des cordons séminifères en interagissant avec les cellules de Sertoli pour former et organiser la membrane basale. Les cellules péritubulaires produisent de la fibronectine, du collagène de type I et IV et des protéoglycanes qui sont des composants de la matrice extracellulaire (Skinner *et al.*, 1985 ; Richardson *et al.*, 1995). La membrane basale ainsi formée constitue une compartimentation physique entre les cordons et l'interstitium dans la gonade XY.

En période post-natale, les cellules péritubulaires myoïdes ont un phénotype de cellule de muscle lisse et elles sont responsables de la contraction des tubes séminifères afin d'évacuer les spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère.

Pour ce faire, des substances sont produites localement dans la gonade : l'arginine-vasopressine (AVP, ADH), une hormone hypophysaire synthétisée par les cellules de Leydig (Ivell *et al.*, 1992), l'endothéline, un peptide vasoactif produit par les cellules de Sertoli (Fantoni *et al.*, 1993) et la prostaglandine F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGDF<sub>2</sub>A), synthétisée par l'épithélium séminifère et le compartiment interstitiel

(Tripiciano *et al.*, 1998). Ces trois produits agissent sur les cellules péritubulaires myoïdes pour stimuler la contraction des tubes séminifères.

#### 4. *Les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales constituent la vascularisation testiculaire et permettent un lien entre le testicule et la circulation générale. Chez la souris, jusqu'à 11.5jpc, la vascularisation primaire est identique dans les crêtes génitales XX et XY. A partir de 12.5jpc, chez les XY, une vascularisation distincte se développe, complètement absente chez les XX. Une fois engagée dans le développement testiculaire, la gonade XY recrute un grand nombre de cellules endothéliales provenant du mésonéphros. Les cellules endothéliales migrent du mésonéphros à la gonade où elles forment le vaisseau cœlomique qui bifurque dans l'interstitium entre les cordons testiculaires. Les cellules endothéliales contribuent à former un système de type artériel puisqu'elles expriment l'ephrinB2, un marqueur des vaisseaux artériels (Brennan *et al.*, 2003). Ce modèle de flux sanguin ainsi constitué dans la gonade XY aurait un rôle important dans l'export de la testostérone permettant la masculinisation de l'embryon XY.

#### 5. *Les macrophages*

Les macrophages sont de puissants régulateurs des réponses immunitaires et inflammatoires. Les macrophages testiculaires ont une morphologie identique à celle des macrophages résidents dans les autres tissus de l'organisme. Ils expriment majoritairement les mêmes marqueurs histochimiques, immunologiques et fonctionnels et présentent une activité de phagocytose, et une capacité cytotoxique et bactéricide. Ils expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ce qui leur permettent de présenter l'antigène aux lymphocytes T. Cela indique que les macrophages sont issus de la lignée des cellules myéloïdes (Revue : Hedger, 2002).

Les macrophages sont présents en petit nombre dans le testicule avant la puberté. Ils peuplent largement l'interstitium testiculaire au début de la spermatogenèse (Ariyaratne *et al.*, 2000). Chez le rat adulte, une déplétion totale en macrophages testiculaires, causée par un traitement avec une cytotoxine encapsulée dans des liposomes, est suivie par une repopulation en macrophages (Bergh *et al.*, 1993). Ces cellules peuvent donc se multiplier par divisions mitotiques.

Au cours du développement testiculaire, l'augmentation du nombre de macrophages suit de près celle du nombre de cellules de Leydig adultes (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000). Par ailleurs, en 1994, Wang a montré qu'une déplétion transitoire des cellules de Leydig adultes s'accompagnait d'une déplétion progressive en macrophages résidents. On observe une récupération du nombre de macrophages lorsque les cellules de Leydig repeuplent le testicule. A

l'inverse, une déplétion complète en cellules germinales n'a pas d'effet sur le nombre de macrophages dans le testicule (Minhardt *et al.*, 1998). Le recrutement et la maintenance des macrophages résidents sont donc sous le contrôle des cellules de Leydig. A l'inverse, les souris déficientes pour M-CSF (*Macrophages-Colony Stimulating Factor 1*), et donc totalement déplétées en macrophages, présentent des cellules de Leydig avec des fonctions perturbées (Pollard *et al.*, 1997).

On trouve également dans le testicule des cellules présentant une morphologie de cellules dendritiques ainsi que des marqueurs de ce type cellulaire. Ces cellules représentent une petite proportion de la population totale de cellules myéloïdes dans le testicule. Le tissu interstitiel de testicule de souris contient également un nombre important de lymphocytes T CD4+, CD8+ et des lymphocytes *Natural Killer*. Ces cellules sont également retrouvées chez l'homme (Revue : Hedger, 2002). Quelques espèces, comme le mouton, ne présentent que relativement peu de macrophages testiculaires résidents (Pöllänen et Maddocks, 1988).

La barrière hémato-testiculaire isole les cellules germinales post-méiotiques de l'environnement externe du testicule et, plus important, des cellules immunitaires circulantes ainsi que leur produits humoraux. La barrière hémato-testiculaire change continuellement au cours du développement des cellules germinales pour leur permettre de se déplacer vers la lumière du tubule. Son bon fonctionnement est indispensable pour éviter une infertilité masculine par auto-immunité aux antigènes testiculaires (Revue : McLachlan, 2002).

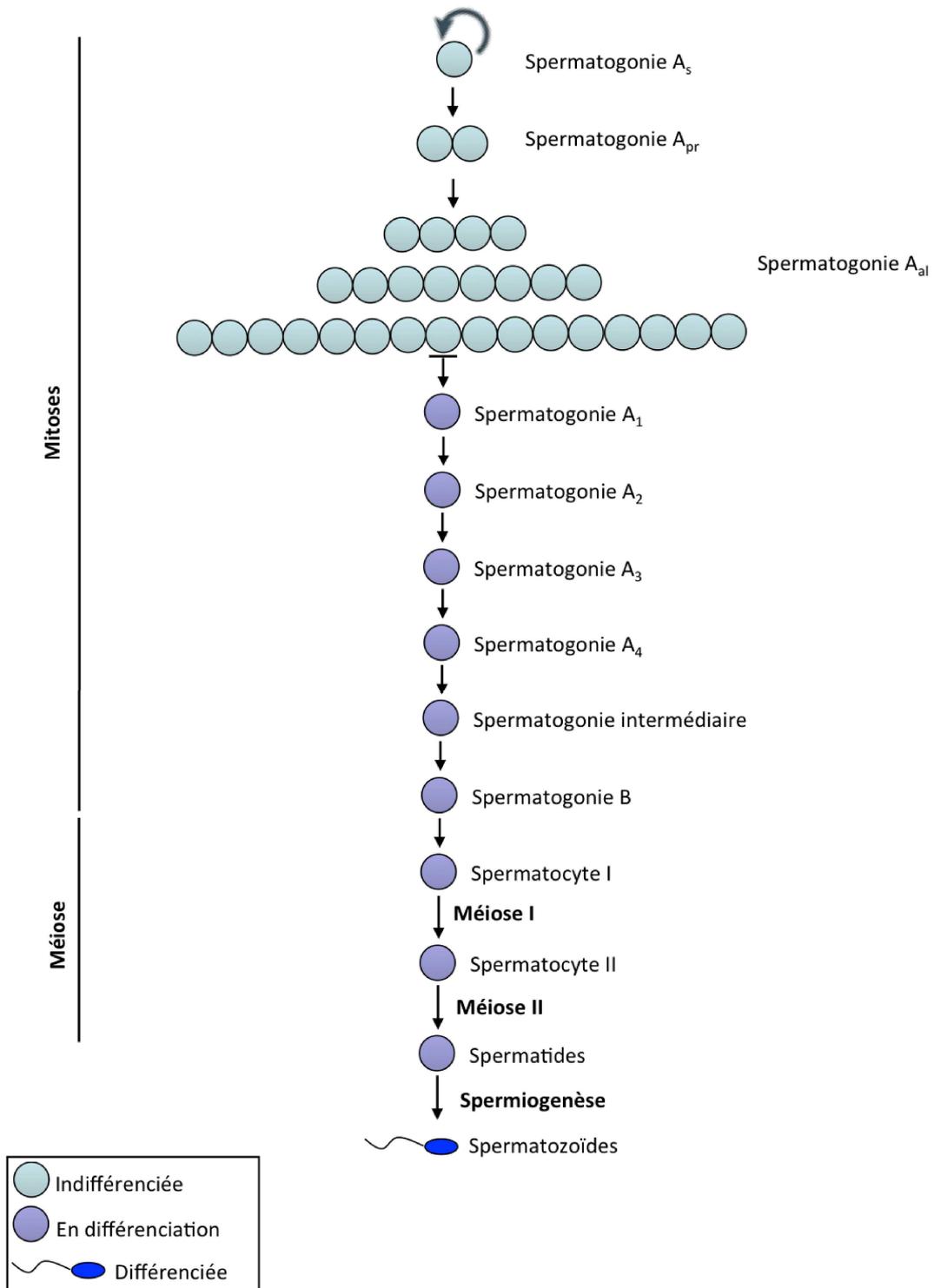


Figure 7 : Schéma de la spermatogénèse

## II. La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe de différenciation des cellules souches spermatogoniales en spermatozoïdes, le gamète mâle. On peut diviser la spermatogenèse en 3 phases : une phase mitotique, une phase méiotique et enfin une phase de différenciation terminale appelée spermiogenèse (**Figure 7**). La spermatogenèse se fait de façon centripète dans le tube séminifère sous le contrôle de deux hormones gonadotrophines : LH et FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). La durée de la spermatogénèse est constante pour une espèce donnée et chaque étape à une durée constante. Cette durée est indépendante de toute action hormonale. Chez l'Homme, il faut 74 jours pour aboutir à un spermatozoïde mature à partir d'une spermatogonie, chez la souris 35 jours sont nécessaires.

### A. Mitoses

La majorité des mammifères mâles en période de reproduction produisent des millions de spermatozoïdes. Ce sont les spermatogonies qui constituent la population cellulaire capable de produire ce grand nombre de cellules germinales différenciées. Elles subissent dans un premier temps des divisions asymétriques donnant naissance à une cellule fille souche permettant le renouvellement du stock de cellules souches et à une cellule fille qui va entrer dans le processus de spermatogenèse (Revue : De Rooij, 1998).

A l'observation par simple coloration de coupe testiculaire, les spermatogonies souches apparaissent isolées ou par paire, contre la membrane basale du tube séminifère, on les appelle également spermatogonies Asingle (As). Les spermatogonies As sont considérées comme des cellules souches spermatogoniales (CSS), elles prolifèrent par mitoses dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies As expriment ID4 (*Inhibitor of DNA binding 4*), un inhibiteur de la synthèse d'ADN. La perte d'expression de ce gène provoque une perte progressive de cellules germinales aboutissant à une stérilité mâle chez la souris (Oatley *et al.*, 2011).

A partir de 4jpp chez la souris, la division des spermatogonies As donne des spermatogonies Apaired (Ap) qui entrent à leur tour aussitôt en multiplication. Les spermatogonies Ap sont appelées ainsi car elles subissent une cytokinèse incomplète et restent donc liées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Elles se présentent sous forme de chaînes de cellules pouvant aller jusqu'à 32 spermatogonies A alignées (alors appelées Aal) (Revue : Jan *et al.*, 2012).

Il est indispensable pour le maintien d'une spermatogenèse tout au long de la vie, de conserver une balance finement régulée entre le renouvellement et la différenciation cellulaire. Si la balance penche trop du côté du renouvellement cellulaire, cela entraîne une accumulation excessive de cellules souches et une diminution du nombre de cellules germinales en différenciation. A l'inverse,

si la balance penche en faveur de la différenciation, le stock de cellules germinales souches va s'épuiser. Cette balance est contrôlée par différents gènes exprimés dans les différents types de spermatogonies A tels que *Nanos2* (Sada *et al.*, 2009), *Zbtb16* (*Zinc finger and BTB domain-containing protein 16*) (Costaya *et al.*, 2004) ou encore *Id4* (Oatley *et al.*, 2011). Les spermatogonies As et Ap expriment NANOS2, une protéine de liaison à l'ARN. Chez la souris, une délétion post-natale de *Nanos2* cause un épuisement des spermatogonies indifférenciées tandis qu'une surexpression de *Nanos2* provoque une accumulation de spermatogonies indifférenciées (Sada *et al.*, 2009). De même, l'inactivation de *Zbtb16* (codant pour Plzf), exprimé par les spermatogonies As jusqu'au stade Aal, provoque une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées avec une augmentation du pourcentage de spermatogonies différenciées indiquant que ZBTB16 favorise le renouvellement des cellules germinales souches (Costoya *et al.*, 2004).

Chez la souris, la protéine BNC2, à doigt de zinc, présente une expression restreinte aux prospermatogonies et aux spermatogonies indifférenciées. L'inactivation de *Bnc2* se traduit par une multiplication excessive des spermatogonies à 14,5jpc et une entrée en méiose anormale des cellules germinales qui commencent à synthétiser un marqueur de méiose (SYCP3) dès 17,5jpc. Cette protéine BNC2 est donc un régulateur majeur des cellules souches germinales mâles, indispensable à la répression des mitoses des spermatogonies et à l'entrée en méiose de ces cellules (Vanhoutteghem *et al.*, 2014).

Chez le rat et la souris, les spermatogonies Aal se différencient, sans divisions mitotiques, en spermatogonies A1. En cas de carence en vitamine A, les spermatogonies Aal échouent à se différencier en spermatogonies A1 (van Pelt et De Rooij, 1990 ; van Pelt, De Rooij 1991, Gaemers *et al.*, 1996, Gaemers *et al.*, 1998), suggérant que cette étape est dépendante de l'acide rétinoïque.

Par ailleurs, le récepteur KIT voit son expression induite lors de la différenciation des spermatogonies Aal en A1. La mutation à l'état hétérozygote du gène du récepteur *kitL* ou la mutation de son ligant KL provoque un blocage de la différenciation au-delà du stade spermatogonies Aal (Koshimizu *et al.*, 1991).

De même, l'expression de la Cycline D2 est induite pendant la transition Aal-A1 et est maintenue jusqu'au stade spermatocytes, ce qui suggère une action de cette protéine également pendant la méiose (Beumer *et al.*, 2000). Cependant, tous les gènes impliqués dans cette transition Aal-A1 ne sont pas encore connus.

Les spermatogonies A1 entament ensuite des divisions mitotiques successives pour générer des chaînes de spermatogonies A2, A3 et A4. Chez l'homme, on ne distingue que deux types de

spermatogonies A : les spermatogonies A pale (ou Ap) car elles présentent un noyau clair et rond, et les spermatogonies A dark (ou Ad) qui présentent un noyau plus foncé et légèrement allongé (Dym *et al.*, 2009). Ces deux types de spermatogonies apparaissent simultanément à 3 mois de gestation.

Les spermatogonies A poursuivent les divisions mitotiques pour donner successivement des spermatogonies intermédiaires puis finalement des spermatogonies B, vers 9jpp chez la souris. Ces deux types de spermatogonies sont morphologiquement différents, les spermatogonies intermédiaires présentent un amas de chromatine le long de la membrane nucléaire qui devient plus prononcé dans les spermatogonies B (Russell *et al.*, 1990). Il n'y a pas de spermatogonies intermédiaires chez l'homme mais des spermatogonies B reconnaissables à leurs amas de chromatine accolés le long de la membrane nucléaire et qui apparaissent postérieurement vers 4 ans chez l'Homme (Paniagua et Ni, 1984). Les spermatogonies B sont les spermatogonies les plus différenciées, elles se divisent une dernière fois pour donner les spermatocytes primaires, les cellules qui entreront en méiose.

Le gène *Dmrt6* (*Dmrtb1*, *Doublesex-related gene*) a été décrit comme ayant un rôle crucial dans l'orientation des cellules germinales durant la transition passant des mitoses et de la différenciation des spermatogonies à la méiose et au développement des spermatocytes (Zhang *et al.*, 2014). Ce gène est exprimé dans les derniers stades de spermatogonies en mitose, son invalidation chez la souris (C57BL/6) se traduit par une perturbation de la différenciation spermatogonale associée à une expression inadaptée de facteurs de différenciation spermatogonale (dont DMRT1) et du facteur d'initiation de la méiose STRA8, ce qui provoque l'entrée en apoptose des spermatogonies (Zhang *et al.*, 2014).

## **B. Méiose**

La méiose permet de passer d'une cellule diploïde (2n) à une cellule haploïde (n) en plusieurs étapes : une répllication pré-méiotique suivie de deux divisions, sans synthèse d'ADN entre les deux. La première division méiotique, aussi appelée division I réductionnelle, mène à la séparation des chromosomes homologues appariés d'origine maternelle et paternelle.

La deuxième division, ou division II équationnelle, conduit à la séparation de chaque chromatide sœur afin d'obtenir deux cellules filles haploïdes : les spermatides rondes chez le mâle.

Comme pour toutes divisions mitotiques, chacune des deux divisions méiotiques peut être divisées en quatre étapes majeures : prophase, métaphase, anaphase et télophase.

La prophase de première division méiotique (appelée prophase I) est une étape très longue, elle aboutit à un réarrangement de la structure des chromosomes (condensation et appariement) suivi

par une recombinaison. On peut subdiviser cette prophase 1 en quatre phases : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. Durant la métaphase I et l'anaphase I, les chromosomes appariés sont séparés par un mécanisme impliquant des microtubules attachés aux centrioles et aux kinétochores. Enfin, durant la télophase I, les chromosomes gagnent les pôles de la cellule et la membrane cellulaire se pince pour former deux cellules séparées. Les phases de la deuxième division méiotique sont similaires à celles de la première division mais elle n'est pas précédée d'une réplication de l'ADN et il n'y a pas de recombinaison homologue pendant la prophase II (La reproduction animale et humaine, Chapitre 3, Mézard, Macaine et Grelon, 2014).

A partir de chaque cellule germinale parentale, la méiose donne naissance à quatre cellules portant chacune la moitié du matériel génétique de la cellule de départ.

### 1. *Pré-leptotène*

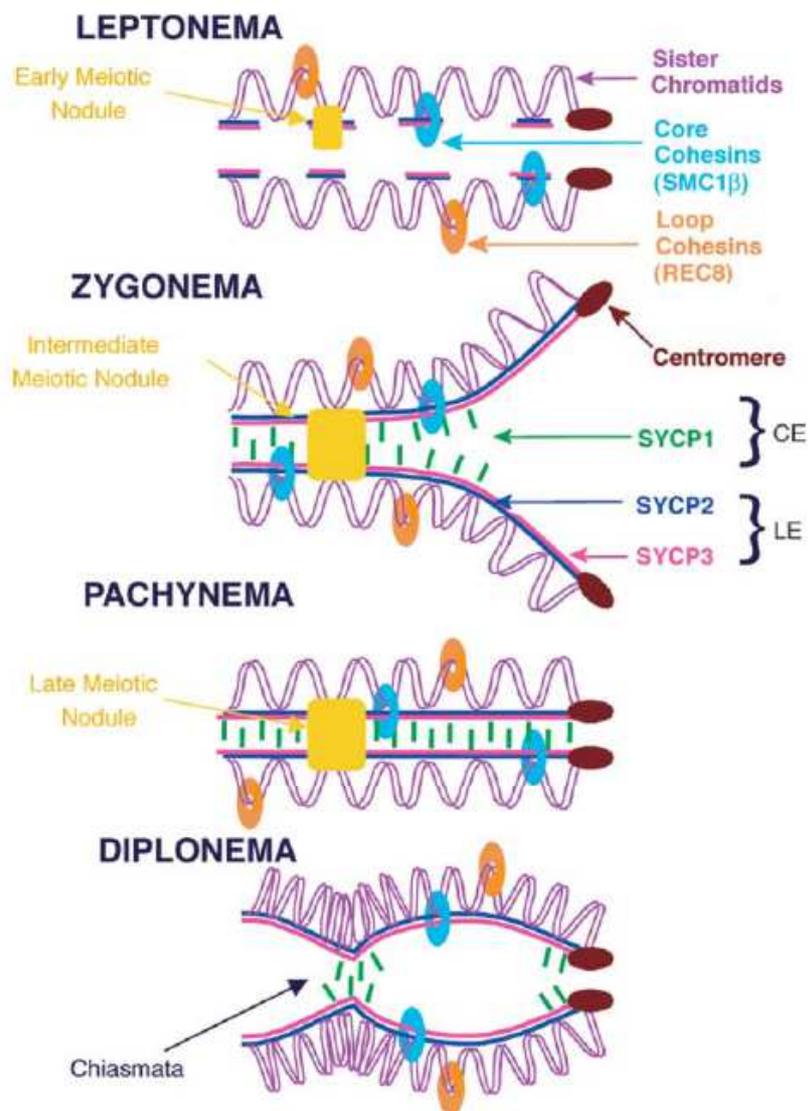
Au stade pré-leptotène, la méiose débute par une réplication de l'ADN. Ce sont les seules et dernières cellules qui auront une phase S durant la spermatogenèse. Issus des spermatogonies B, les spermatocytes primaires ont une morphologie proche bien qu'ils soient un peu plus petits et qu'ils présentent moins de chromatine collée le long de la membrane nucléaire.

Pendant la prophase 1 de méiose, les chromatides sœurs sont maintenues ensemble par un complexe protéique de cohésines spécifiques de la méiose. Ce complexe est composé de SMC1 $\beta$  (*Structural maintenance of chromosome-1b*) (Revenkova *et al.*, 2001), RAD21L (*RAD21-like*) (Ishiguro *et al.*, 2011), REC8 (*recombinase-8*) (Watanabe et Nurse, 1999) et STAG3 (*Stromal antigen 3*) (Prieto *et al.*, 2007) qui constituent une structure dans le noyau maintenant les chromatides sœurs ensemble.

### 2. *Leptotène*

Les spermatocytes passent ensuite au stade leptotène de prophase 1 qui correspond à l'entrée en méiose I. Cette initiation de la méiose est dépendante de DAZL, une protéine de liaison à l'ARN, qui permet aux cellules germinales de répondre à l'acide rétinoïque. En conséquence, l'acide rétinoïque induit l'expression de *Stra8* qui initie l'entrée en méiose (Lin *et al.*, 2008, Anderson *et al.*, 2008). En effet, chez les souris *Stra8*<sup>-/-</sup>, on observe un nombre correct de spermatogonies ainsi que de spermatocytes en pré-leptotène mais il y a une absence de spermatides et de spermatocytes après le stade leptotène suggérant que *Stra8* est requis pour initier la prophase 1 (Anderson *et al.*, 2008).

Au stade leptotène, le noyau augmente de volume tandis que les chromosomes se condensent progressivement afin de permettre l'individualisation des chromosomes. On assiste également toujours en leptotène à l'initiation de la mise en place d'un gros complexe protéique en forme de



**Figure 8 : Schéma de la formation du complexe synaptonémal, chez la souris (Morelli and Cohen, 2005)**

Les nodules méiotiques commencent à s'accumuler en début de leptotène et leurs composants constitutifs changent au cours de la progression en prophase I, comme indiqué par « early », « intermediate » et « late ». Il existe deux types de complexes de cohésines : un complexe de cohésines de base incluant SMC1β qui se localise sur l'axe des chromosomes durant la prophase I (Jessberger *et al.*, 2002), tandis que la boucle de cohésines incluant REC8 est localisée sur la boucle de chromatine durant la prophase I (Jessberger *et al.*, 2002).

CE : Élément central, LE : Élément latéral.

fermeture éclair appelé complexe synaptonémal qui permettra l'appariement des chromosomes homologues.

Le complexe synaptonémal commence à se former dès le stade leptotène mais ne sera complètement formé qu'au stade plus tardif de pachytène. Ce complexe se compose d'éléments axiaux constitués des protéines SCP2 (*Synaptonemal complex protein 2*) et SCP3 en association avec des cohésines (SMC1, STAG3 et REC8) liées à des éléments centraux SYCE1, SYCE2 et Tex12 par l'intermédiaire d'éléments transversaux (SCP1) (**Figure 8**) (Morelli et Cohen, 2005). L'assemblage incorrect de ce complexe conduit à la mort de la cellule, à une recombinaison méiotique perturbée et à la formation de cellules germinales aneuploïdes.

Pendant le stade leptotène, les éléments axiaux du complexe synaptonémal se mettent en place: SCP2 et SCP3 se positionnent tout le long des chromosomes homologues. Chez la souris, l'inactivation du gène *SCP3* provoque une stérilité mâle alors que les femelles sont fertiles bien que présentant un fort taux de cellules aneuploïdes dans les ovaires (Yuan *et al.*, 2002).

De plus, il a été montré que la protéine Tex11, exprimée uniquement dans les cellules germinales, interagit avec SCP2. L'inactivation de *Tex11* chez la souris induit une infertilité mâle avec un arrêt de la méiose au stade pachytène, par non-appariement des chromosomes homologues, ce qui entraîne la dégénérescence des cellules germinales par apoptose. Les femelles *Tex11*<sup>-/-</sup> sont, quant à elles, fertiles bien que présentant un nombre de petits par portée réduit comparé aux souris WT (Yang *et al.*, 2008).

C'est pendant le stade leptotène qu'apparaissent les cassures double-brins qui constituent le premier évènement de recombinaison. La recombinaison méiotique correspond à la formation de cassures double brin puis la réparation de ces cassures double brin par recombinaison homologue en utilisant une chromatide sœur du chromosome homologue. Pour cela, des recombinases se lient à l'ADN simple brin pour former un filament nucléoprotéique capable « d'envahir » une molécule d'ADN double brin homologue intacte. Le double brin intact sert de modèle pour réparer le brin cassé.

Ce mécanisme est légèrement différent de celui existant au cours de la mitose qui utilise la chromatide sœur pour réparer les cassures double brin. Chez les mammifères, la protéine qui porte l'activité de cassure de l'ADN est SPO11 (*SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB homolog*) (Shannon *et al.*, 1999), une topoisomérase découverte chez la levure. Chez la souris, l'inactivation du gène *Spo11* conduit à une absence de cassures double brin. Chez ces mutants, les cassures double brin ne sont pas visibles car les protéines RAD51 (*DNA repair protein-51*, exprimée dans les cellules en mitose et en méiose) et DMC1 (spécifique de la méiose), normalement fixées au niveau des

cassures, ne sont pas détectées. Les souris mutantes *Spo11*<sup>-/-</sup> des deux sexes sont infertiles avec chez les mâles un arrêt de méiose avant le stade pachytène (Romanienko et Camerini-Otero, 2000).

Pour induire les cassures double brin, SPO11 se lie de façon covalente via une protéine à l'extrémité 5' de l'ADN sur une tyrosine (de Massy *et al.*, 2013). REC102, 104 et 114 sont indispensables au recrutement de SPO11 sur l'ADN (Sasanuma *et al.*, 2007). De plus, MEI1 (*Meiosis inhibitor-1*) et MEI4 sont, comme SPO11, requis pour la formation de cassures double brin pendant la méiose (Libby *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006). L'inactivation du gène *Mei1* chez la souris conduit à un arrêt de la méiose au stade zygotène à la fois chez le mâle et la femelle (Libby *et al.*, 2002). MEI4 est localisée sur les axes de chromosomes, de façon corrélée à la formation de cassures double brin. La localisation correcte de MEI4 implique MEI1, REC8, RAD21L et HORMAD1. Si MEI4 n'est pas correctement localisée le long des chromosomes, la formation de cassures double brin est perturbée (Kumar *et al.*, 2015).

Les cassures double brin induites par SPO11 provoquent la phosphorylation de l'histone H2AX (*Histone family member X*) au niveau de la serine-139 pour former  $\gamma$ -H2AX qui va recruter la machinerie de réparation de l'ADN au niveau des lésions de l'ADN (Mahadevaiah *et al.*, 2001). Le complexe protéique Rad51-NBS1-MRE11 va alors se fixer à  $\gamma$ -H2AX phosphorylé et, grâce à l'activité nucléase de MRE11, va dégrader l'ADN au niveau des cassures ce qui génère de l'ADN simple brin (Gerton et Hawley, 2005). Alors les recombinaisons RAD51 et DMC1 vont se fixer au niveau des points de cassures de l'ADN simple brin (Tarsounas *et al.*, 1999) et interviendront plus spécifiquement au stade suivant.

La protéine TEX15 intervient dans la localisation des protéines RAD51 et DMC1 sur les points de cassures. Chez la souris, l'inactivation de *Tex15* (*Testis expressed gene-15*) entraîne une stérilité chez le mâle causée par l'absence des éléments axiaux du complexe synaptonémal entraînant un défaut d'appariement des chromosomes. Cependant, l'inactivation de ce gène n'a pas d'effet sur la fertilité des femelles (Yang *et al.*, 2008).

RAD51 et DMC1 vont également interagir avec SCP3 pour rapprocher physiquement les chromosomes homologues (Tarsounas *et al.*, 1999).

A peu près au même moment, les télomères se fixent à l'enveloppe nucléaire afin de former un cluster de télomères destiné à favoriser l'appariement des chromosomes homologues.

### 3. Zygotène

Vient ensuite le stade zygotène avec la mise en place de l'élément central du complexe synaptonémal et la formation d'intermédiaires de recombinaison.

Les éléments axiaux, désormais appelés éléments latéraux, sont reliés par des filaments transversaux qui interagissent avec l'élément central. L'élément transversal du complexe synaptonémal est composé de SCP1 (Hamer *et al.*, 2006). SCP1 est indispensable au recrutement des protéines de l'élément central et donc à l'appariement des chromosomes. Cette protéine est très importante pour le déroulement de la méiose puisque l'inactivation de son gène *Sycp1* chez la souris induit une stérilité mâle et femelle causée par l'absence de formation du complexe synaptonémal et l'entrée en apoptose des cellules germinales au stade pachytène (deVries *et al.*, 2005).

L'élément central, la région dense au milieu du complexe synaptonémal, est composé des protéines SYCE1 et SYCE2 qui interagissent avec TEX12 (Hamer *et al.*, 2006). Chez la souris, l'inactivation du gène *Syce2* provoque une stérilité mâle tandis que les femelles sont fertiles bien que présentant un nombre de descendants réduit comparé aux animaux contrôles. Les souris des deux sexes invalidées pour *Syce2* présentent une absence de formation du complexe synaptonémal (Bolcun-Filas *et al.*, 2007).

Chez la souris, la protéine TEX12, spécifique de la méiose, est l'un des composants de l'élément central du complexe synaptonémal. TEX12 est en interaction directe avec SYCE2, sa localisation correcte nécessite la protéine du filament transversal : SYCP1. TEX12 pourrait ancrer les protéines de l'élément central aux filaments transversaux du complexe synaptonémal (Hamer *et al.*, 2006).

La poursuite de l'appariement des chromosomes et la réparation des cassures double brin est dépendante de l'élément central. Les protéines DMC1 et RAD51 sont impliquées dans l'assemblage du complexe synaptonémal. En effet, chez la levure, lorsque DMC1 est absent, le complexe synaptonémal ne se forme pas sur toute la longueur des chromosomes (Bishop *et al.*, 1992).

Pendant la progression de la méiose, la majorité des cassures double brin de l'ADN sont réparées sans échange de chromatine. Une petite partie des cassures double brin mûrent en crossing-over ce qui implique un échange réciproque entre les chromosomes homologues. Les levures doubles mutants pour *Rad51* et *Dmc1* présentent une absence de réparation des cassures de l'ADN ainsi qu'une absence de formation du complexe synaptonémal (Richardson *et al.*, 2004). Chez la souris, l'inactivation de *Rad51* est létale (Tsuzuki *et al.*, 1996) tandis que la mutation de *Dmc1* est viable mais conduit à un arrêt de la méiose avec une perte des cellules germinales par apoptose. Les animaux mâles et femelles invalidés pour *Dmc1* sont infertiles, le complexe synaptonémal ne se met pas en place à cause de l'absence de SCP1 et les intermédiaires de recombinaisons sont absents (Pittman *et al.*, 1998).

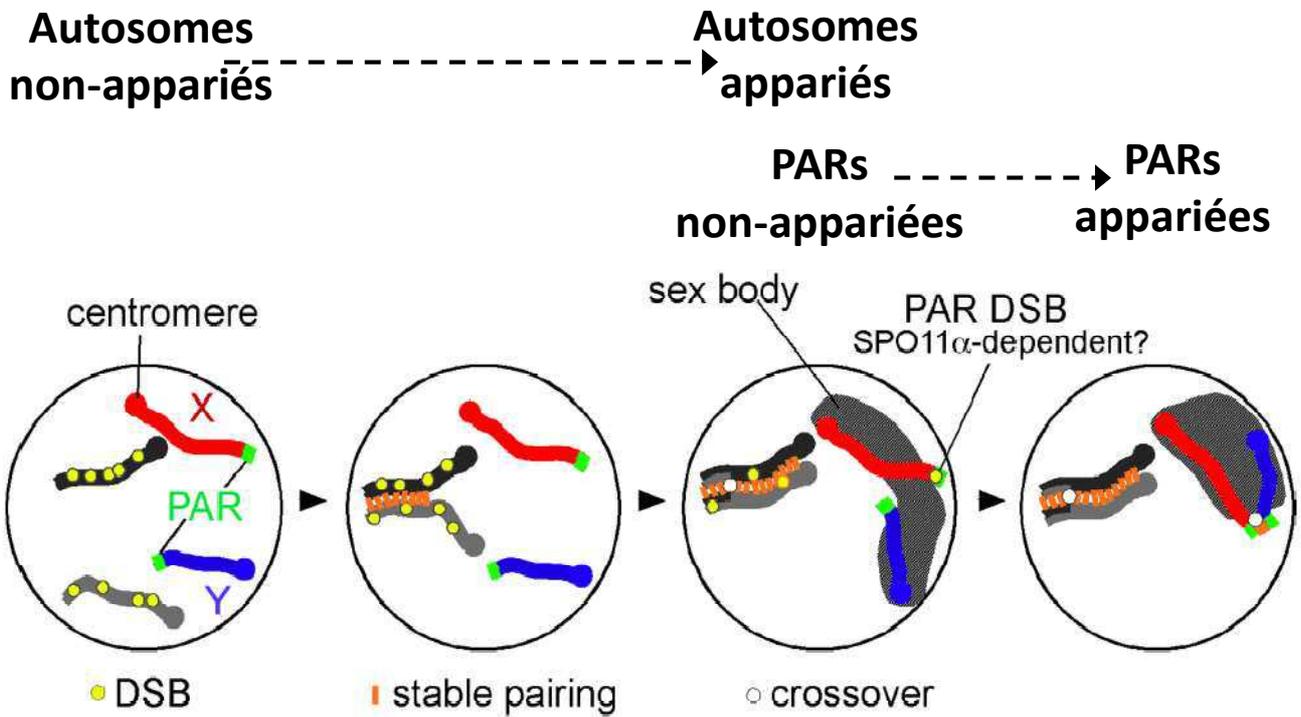
Pendant la réparation des cassures double brin, certaines de ces cassures sont traitées pour former des liaisons entre le brin paternel et maternel, appelées chiasma. Ces chiasmas auront un rôle crucial dans la ségrégation des chromosomes.

En parallèle de la formation du complexe synaptonémal, les protéines MSH4, MSH5 et PMS2 permettent le bon appariement des chromosomes homologues afin d'éviter des échanges « illégitimes » entre régions d'ADN non homologues lors des crossing-over qui auront lieu au stade pachytène (Kneitz *et al.*, 2000, deVries *et al.*, 1999 ; Baker *et al.*, 1995).

Chez les mammifères, la protéine MSH4 est localisée sous forme de foyers le long des chromosomes dès le début de leur appariement au stade zygotène. Les souris *Msh4*<sup>-/-</sup> présentent un défaut d'appariement des chromosomes homologues, entraînant un blocage des cellules germinales au stade zygotène causant une stérilité mâle et femelle (Kneitz *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent un rôle de MSH4 dans l'appariement des chromosomes. Chez la souris, le gène *Msh5* est détecté à 1jpp chez le mâle et à 16-18jpc chez la femelle (Edelmann *et al.*, 1999). Comme pour *Msh4*, les souris invalidées pour *Msh5* présentent une stérilité associée à un défaut d'appariement des chromosomes (deVries *et al.*, 1999). De la même façon, l'inactivation du gène *Pms2* chez la souris provoque une stérilité mâle avec un défaut d'appariement des chromosomes (Baker *et al.*, 1995). Ces résultats montrent que les protéines PMS2, MSH4 et MSH5, sont donc essentielles pour l'appariement des chromosomes homologues. Ils suggèrent également que ces trois protéines appartiennent à un même complexe protéique. En effet, un hétérodimère de MSH4-MSH5 se fixe à l'ADN puis interagit avec un hétérodimère de MLH ou PMS. L'interaction de ces deux hétérodimères est indispensable à l'appariement des chromosomes homologues.

Les chromosomes autosomiques sont homologues sur toute leur longueur, ils sont donc capables de s'apparier entièrement. A l'inverse, les chromosomes X et Y ne sont pas homologues sauf au niveau de la région pseudo-autosomale (PAR). La reconnaissance et l'appariement des chromosomes X et Y ne peuvent se faire que grâce aux cassures double brin présentes dans la PAR. Chez la souris, on compte une cassure double brin tous les 10 méga base (Mb) environ mais la PAR mesure 0.7Mb. Il est pourtant indispensable d'avoir au moins une cassure double brin dans la PAR. Grâce à une structure particulière de sa chromatine, en nombreuses petites boucles, la PAR favorise la formation de cassures double brin (Kauppi *et al.*, 2012).

Par ailleurs, le complexe DMC1-RAD51 détecte sur les chromosomes homologues les séquences simple brin générés au stade leptotène. Il permet ensuite l'invasion de la chromatide homologue par le simple brin. Après élongation par synthèse d'ADN, il y a formation d'intermédiaires de recombinaison appelées doubles jonctions de Holliday. Ces jonctions de Holliday permettent la



**Figure 9 : Modèle du comportement des chromosomes X et Y pendant la méiose (Kauppi *et al.*, 2012)**

Une paire de chromosomes autosomiques est représentée en gris et noir, le chromosome X est en rouge et le Y en bleu. La majorité des DSB (cassures doubles brin) sur les autosomes se forme avant celles localisées sur les PAR (Pseudo-autosomales Régions). En conséquence, les chromosomes homologues s'apparient avant les chromosomes sexuels. Seules les DSB pouvant faciliter l'appariement des homologues sont représentées (cercles jaunes). Les nombreuses DSB qui se forment sur la zone non-PAR du chromosome X mais qui ne peuvent agir sur l'appariement ne sont pas représentées. Dans de nombreuses cellules, les PARs subissent une formation plus tardive des DSB, à peu près au moment de la formation du Sex Body (en grisé). Ce domaine chromatidien lie le X et le Y ensemble et facilite ainsi l'appariement des PAR.

réalisation des crossing-over qui aboutiront à l'obtention de chromosomes recombinés au stade pachytène. Les crossing-over permettent l'échange d'informations génétiques entre les chromosomes d'origine parentale différente. Ils permettent ainsi d'augmenter la variabilité génétique dans le gamète qui, ainsi, n'hériterait pas seulement d'un chromosome d'origine paternel ou maternel mais pourra hériter d'un chromosome hybride portant l'information génétique des deux parents.

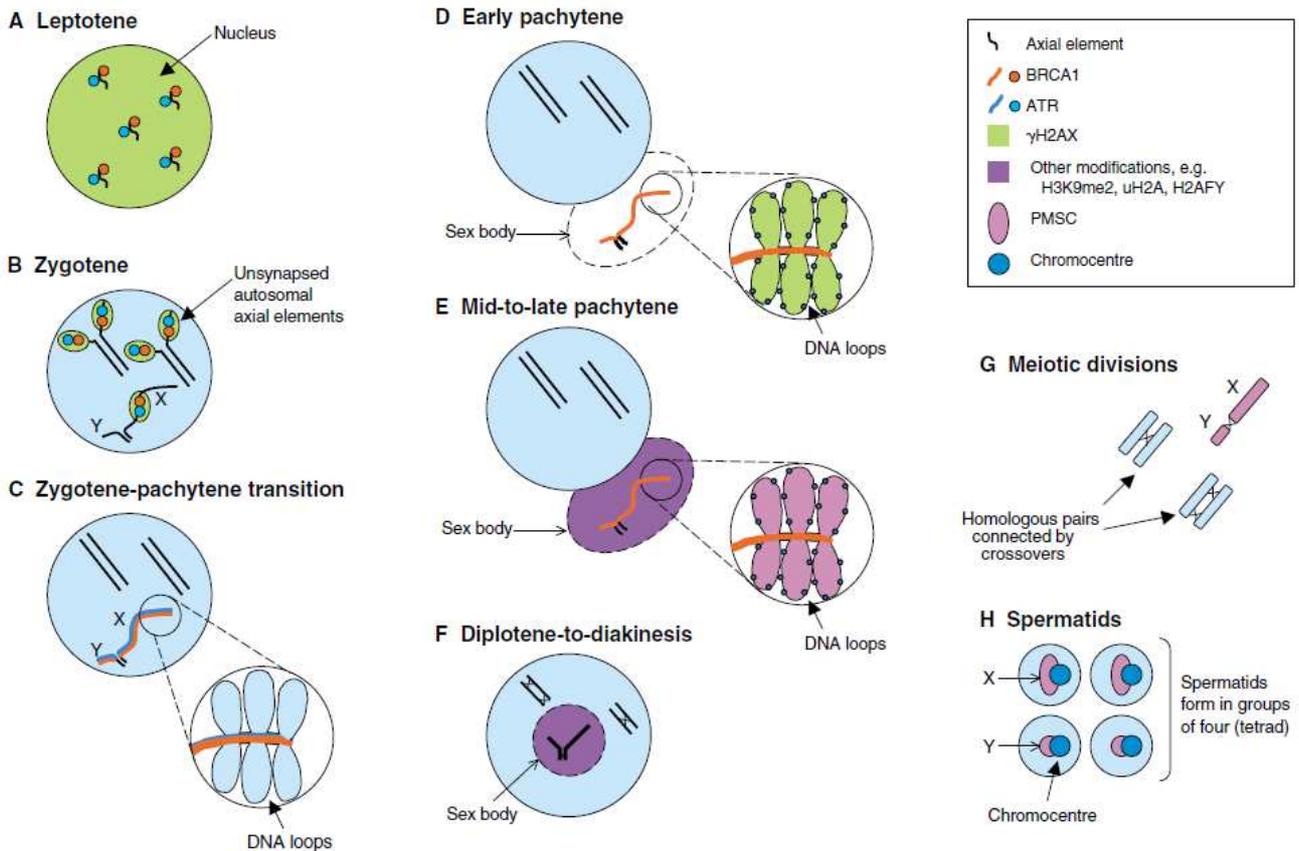
Une nouvelle protéine a été décrite comme indispensable pour maintenir un nombre correcte de foyers DMC1-RAD51 au cours du stade zygotène : MEIOB (*Meiosis specific with OB domains*). Cette protéine contient des sites de liaison à l'ADN (confirmé *in vitro*) et est exprimé spécifiquement dans les cellules germinales en début de méiose. Elle se localise sur les axes des chromosomes et son invalidation chez la souris se traduit par une infertilité mâle et femelle avec arrêt de la méiose à un stade zygotène-pachytène like. Cet arrêt de la méiose est causé par la perturbation de la réparation des cassures double brin et de l'appariement des chromosomes homologues (Souquet *et al.*, 2013) ce qui montre que MEIOB est impliquée dans la recombinaison homologue pendant la méiose.

#### 4. *Pachytène*

Ce stade méiotique est bien souvent lui-même divisé en trois sous-périodes : le pachytène précoce, intermédiaire et tardif.

Une fois les chromosomes complètement appariés, les spermatocytes passent au stade pachytène. Les spermatocytes en pachytène sont reconnaissables par leur noyau de grande taille à l'aspect granuleux en microscopie optique. Le stade pachytène est très long chez les mammifères par rapport aux autres stades mais sa durée est fixe pour chaque espèce (5 à 6 jours chez la souris).

Cependant, tous les chromosomes ne sont pas appariés puisqu'en dehors des PARs, les chromosomes X et Y demeurent non-appariés. Les PAR sont les seules régions où peuvent avoir lieu des recombinaisons entre les chromosomes X et Y chez le mâle. Cela conduit à la formation du XY-body (ou sex body), un domaine nucléaire en périphérie des autres chromosomes appariés, dans lequel se localisent les chromosomes sexuels identifiables par plusieurs protéines telles que BRCA1,  $\gamma$ -H2AX et ATR. (Revue : Handel, 2004) (**Figure 9**). Ces protéines provoquent l'arrêt de la transcription des chromosomes X et Y par un mécanisme appelé *Meiotic Sex Chromosome Inactivation* (MSCI) (Revue : Turner *et al.*, 2007). Cette inactivation est réalisée par un remodelage important des chromosomes X et Y. On retrouve un MSCI dans la lignée germinale de presque tous les organismes possédant des chromosomes sexuels différenciés.



**Figure 10 : Représentation schématique du MSCI (Turner *et al.*, 2007)**

Durant le stade leptotène, une phosphorylation globale de H2AX dépendante d'ATM a lieu en réponse à la formation de DSB (cassures double brin) de l'ADN. BRCA1 et ATR forment des foyers sur les éléments axiaux (Aes) nouvellement formés.

- Durant le stade zygotène, l'appariement coïncide avec la perte de BRCA1, ATR et  $\gamma$ H2AX sur les AEs des chromosomes autosomiques. BRCA1, ATR et  $\gamma$ H2AX restent en foyers sur les Aes des autosomes qui ne se sont pas encore appariés et sur l'AE du chromosome X.
- Transition zygotène-pachytène. L'appariement des chromosomes autosomiques est complet et  $\gamma$ H2AX lié à la recombinaison disparaît. Les marquages de BRCA1 et ATR deviennent linéaire sur les Aes des chromosomes X et Y. L'ADN méiotique s'organise en boucles attachées à leur base au niveau des AEs.
- En pachytène précoce, ATR se transloque le long des boucles d'ADN, là où il phosphoryle H2AX, ce qui produit le MSCI et la formation du sex body.
- Pachytène moyen – tardif. D'autres modifications d'histones (production de H3K9me, uH2A et variants d'histone (H2AFY)) assurent la maintenance du MSCI.
- Diplotène à diacinese. Les chromosomes X et Y migrent au centre du noyau. BRCA1, ATR et  $\gamma$ H2AX disparaissent des chromosomes sexuels mais les autres modifications persistent. Ces modifications assurent la maintenance du MSCI au cours des divisions méiotiques (G) et dans les spermatides (H), c'est ce que l'on appelle la répression post-méiotique des chromosomes sexuels (PSCR).

Dans la gonade mâle des mammifères, l'activité transcriptomique des chromosomes sexuels varie beaucoup dans les cellules germinales au cours de la spermatogenèse. Les chromosomes X et Y sont transcriptionnellement inactifs dans les spermatocytes primaires en pachytène et restent réprimés pour toute la durée de la spermatogenèse. Juste après la transition zygotène-pachytène, les chromosomes X et Y sont cloisonnés dans le XY-body.

Le MSCI correspond à un mécanisme particulier de répression général appelé *Meiotic Silencing Unsynapsed Chromatin* (MSUC), initié par des protéines de réparation de l'ADN et maintenu par des modifications d'histones associées à une répression transcriptomique. Le MSCI persiste tout au long du stade pachytène et jusqu'au stade diplotène (**Figure 10**) (McKee et Handel, 1993 ; Turner, 2007).

L'un des acteurs clé du MSCI est le variant d'histone H2AX. Ce variant, abondant dans les testicules de mammifères en comparaison avec d'autres tissus, est un des composants du nucléosome des cellules en méiose. Des souris mâles invalidées pour *H2AX* présentent un arrêt de la méiose associé à un échec de mise en place du MSCI (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003), et il a été montré que la phosphorylation de H2AX en  $\gamma$ -H2AX est impliquée dans la mise en place du MSCI.

De plus, il a été décrit que la protéine de réparation de l'ADN, ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), est co-localisée avec  $\gamma$ -H2AX sur les chromosomes sexuels à partir de la mise en place du MSCI jusqu'à la déphosphorylation de  $\gamma$ -H2AX (en H2AX) au moment de la transition diplotène-métaphase I.

Enfin, une autre protéine intervient dans le bon déroulement du MSCI. Des études ont montré que la protéine suppresseur de tumeur BRCA1 (*breast cancer 1*) est également localisée sur les chromosomes sexuels pendant le MSCI et son invalidation chez la souris provoque une absence de phosphorylation de H2AX au niveau des chromosomes sexuels et donc un défaut de MSCI (Turner *et al.*, 2004).

Dès le stade leptotène, H2AX est phosphorylé dans tout le noyau en réponse à la formation des cassures double brin. Les protéines BRCA1 et ATR forment des foyers sur les éléments axiaux de tous les chromosomes. Au stade zygotène, les chromosomes autosomes commencent à s'apparier ce qui coïncide avec la perte de BRCA1 et ATR au niveau des éléments axiaux des autosomes. Ainsi BRCA1, ATR et  $\gamma$ -H2AX restent sous forme de foyers sur les autosomes non appariés et sur les chromosomes sexuels.

En début de pachytène, ATR change de localisation pour se retrouver le long des boucles des chromosomes sexuels et induit une deuxième vague de phosphorylation (après celle du stade leptotène) de H2AX mais uniquement au niveau de la chromatine des chromosomes X et Y (Turner *et*

*al.*, 2005). Cette 2<sup>ème</sup> vague de phosphorylation de H2AX provoque la mise en place du MSCI et la formation du *sex-body*. Si ATR n'est pas correctement localisé sur les chromosomes X et Y, on assiste à une phosphorylation ectopique de H2AX et à un échec du MSCI d'où un arrêt méiotique.

Juste après l'initiation du MSCI, au stade pachytène intermédiaire, les chromosomes X et Y subissent d'autres modifications post-transcriptionnelles: ubiquitylation de H2A (qui devient uH2A), déacétylation des histones H3 et H4, diméthylation de H3 (qui devient H3K9me2) et de la sumoylation de différentes protéines. Le rôle de ces modifications post-transcriptionnelles est de maintenir le MSCI (Revue : Turner, 2005).

Du stade diplotène jusqu'en diacinèse, les chromosomes X et Y migrent au centre du noyau. Les protéines BRCA1, ATR et  $\gamma$ -H2AX ne sont plus liées aux chromosomes sexuels mais les autres modifications post-transcriptionnelles de ces chromosomes perdurent, ce qui maintient le MSCI pendant les deux divisions méiotiques et jusque dans les spermatides où il sera appelé PSCR (*Post-meiotic sex chromosome repression*). On ne parle plus alors de XY inactif mais réprimé.

Le MSCI s'accompagne de l'augmentation de l'expression de gènes de sauvegarde (backUp genes) sur les autosomes afin de compenser l'expression des gènes inactivés sur les chromosomes sexuels (Wang *et al.*, 2005).

Une autre protéine se localise dans le XY body des spermatocytes et s'associe avec  $\gamma$ H2AX : SCML2 (*Sex comb on midleg-like 2*, codée par le chromosome X). Cette protéine est spécifiquement exprimée dans les spermatogonies, spermatocytes et spermatides rondes et recrute la dé-ubiquitinase USP7 dans le XY body. L'inactivation de *Scml2* chez la souris conduit à un échec de l'accumulation d'USP7 dans le XY body ainsi qu'à la mono-ubiquitination de H2AX sur les chromosomes sexuels, ce qui se traduit par un défaut de la spermatogenèse (Luo *et al.*, 2015).

Pour la suite de la méiose, la recombinaison homologue se poursuit sous le contrôle du complexe protéique MSH4-MSH5-MLH1-MILH3. A la fin du stade pachytène, les crossing-over sont maintenus sous le contrôle de l'hétérodimère MLH1 et MLH3. En effet, les souris mâles et femelles invalidées pour le gène *Mlh1* (*MutL homolog 1*) sont stériles, les chromosomes homologues se séparent prématurément lors de la méiose à cause d'une recombinaison incomplète (Baker *et al.*, 1996). De même, les souris invalidées pour *Mlh3* (*MutL homolog 3*) sont stériles dans les deux sexes et les mâles présentent un appariement correct des chromosomes homologues mais la formation des crossing-over ne se fait pas convenablement (Lipkin *et al.*, 2002). Par ailleurs, MLH3 est nécessaire pour que MLH1 se lie aux chromosomes méiotiques (Lipkin *et al.*, 2002).

Chez la levure, le complexe MSH2-MSH3 stimule l'activité endonucléase portée par MLH1-MLH3 pour permettre la formation de cassures simple brin de l'ADN, ce qui permettrait la résolution des intermédiaires de recombinaison et la réparation de l'ADN (Rogacheva *et al.*, 2014).

Chez la souris, le nombre de foyers marqués dans des expériences d'immunohistochimie avec MSH4 entre le zygotène et le zygotène augmente durant le stade pachytène puis diminue jusqu'à une disparition totale en fin de pachytène (Santucci-Darmanin *et al.*, 2000). De plus, MSH4 est colocalisé avec MLH1 sur les chromosomes méiotiques et il a été montré que, *in vitro*, ces deux protéines interagissent ensemble. Cette observation suggère que MSH4 intervient également lors de la formation des crossing-over en association avec l'hétérodimère MLH1-MLH3.

En fin de pachytène, les chromosomes homologues sont totalement appariés grâce au complexe synaptonémal, exception faite des chromosomes X et Y. Les chromosomes sont compactés et leurs centromères sont étroitement appariés.

## 5. *Diplotène*

La dissociation du complexe synaptonémal marque l'entrée en diplotène des cellules germinales. Cette étape est cruciale à la progression de la méiose puisque les spermatocytes dont le complexe synaptonémal ne se dissocie pas présentent un arrêt en pachytène/diplotène. La séparation des chromosomes homologues est marquée par l'enlèvement de l'élément central du complexe synaptonémal. En effet, par immunomarquage, le signal de SCP1 disparaît au niveau du complexe synaptonémal (Moens et Spyropoulos, 1995). En conséquence, SCP3 est redistribué, il passe d'une localisation au niveau de l'élément latéral à une localisation sur les régions centromériques (Dobson *et al.*, 1994) et entre les chromatides sœurs (Parra *et al.*, 2004).

Cependant, les chromosomes homologues restent liés l'un à l'autre par l'intermédiaire d'au moins un crossing-over par paire de chromosomes homologues. A ce stade, on peut distinguer les chiasmas, des croisements entre deux chromatides de chromosomes homologues. Les cohésines, dont REC8, impliquées dans l'appariement des chromosomes ont un rôle important dans le maintien des chiasmas jusqu'à la fin de la prophase I (Klein *et al.*, 1999). Chez les mammifères, la séparation des chromosomes est sous le contrôle de plusieurs protéines dont HSPA2 (*Heat shock-related protein 2*) chez l'humain et son homologue chez la souris HSP70-2 (Dix *et al.*, 1997 ; Sun et Handel, 2008). La protéine HSP70-2 est présente dans le complexe synaptonémal, au niveau de l'élément latéral dans les spermatocytes en pachytène (Dix *et al.*, 1997). Les spermatocytes *Hsp70-2*<sup>-/-</sup> présentent un complexe synaptonémal normal ce qui montre que HSP70-2 n'est pas indispensable pour sa formation. Mais le complexe synaptonémal ne se dissocie pas en fin de pachytène chez les mutants, HSP70-2 est donc nécessaire directement ou indirectement pour la dissociation du complexe

synaptonémal et ainsi l'accomplissement de la méiose I. HSP70-2 pourrait affecter directement le désappariement via la déphosphorylation en C-terminal de SYCP1 (Dix *et al.*, 1997).

La dissociation du complexe synaptonémal s'accompagne d'autres évènements de remodelage de la chromatine. Tout d'abord, l'histone H3 est phosphorylé sur la Ser10. C'est un marqueur de l'entrée en phase M (Hendzel *et al.*, 1997). De plus, les chromosomes sont compactés et on assiste à la formation de bivalents morphologiquement distincts.

Chez les mammifères, c'est à ce stade diplotène que se bloque la méiose I chez les femelles. Ce blocage intervient pendant la vie fœtale et perdure jusqu'à la puberté qui peut intervenir, selon les espèces, plusieurs années plus tard (comme chez la femme) ou quelques jours plus tard (comme chez la souris). La fin de la méiose des ovocytes reprendra donc à partir de la puberté, avant chaque ovulation. A ce moment, les ovocytes achèveront la prophase I puis entreront en métaphase I.

Chez le mâle, à la fin du stade diplotène, on n'observe plus de nodules de recombinaison et les chromosomes ne sont plus appariés qu'au niveau des chiasmas. Les chromosomes sont au maximum de leur état de compaction et leur centromère s'éloignent.

## 6. *Diacinèse*

Chez la femelle à la reprise de la méiose ou de suite en fin de stade diplotène chez le mâle, le stade diacinèse se met en place. L'enveloppe nucléaire se fragmente tandis que les fuseaux méiotiques s'organisent à partir de deux centres actifs d'organisation des microtubules, localisés aux pôles opposés du noyau.

Le bon positionnement et donc la ségrégation correcte des chromosomes homologues pendant la première division méiotique est dépendante de la présence d'au moins un chiasma par paire de chromosomes homologues. En effet, la ségrégation des chromosomes homologues nécessite un lien physique afin de permettre une orientation correcte des paires de chromosomes sur le fuseau méiotique lors de la métaphase I. Un déficit en crossing-over entraîne une diminution du nombre de chiasma et une ségrégation incorrecte des chromosomes homologues ce qui peut aboutir à la formation de cellules germinales aneuploïdes (Revue : Handel et Schimenti, 2010).

En diacinèse, les chromosomes homologues sont toujours maintenus ensemble par les crossing-over. Ces crossing-over sont stabilisés au niveau des sites d'échange de chromatine grâce aux cohésines qui maintiennent l'appariement des chromatides sœurs.

Dans les spermatocytes primaires de souris, en fin de prophase I, les deux centrosomes sont adjacents et localisés près de la membrane nucléaire. Les chromosomes bivalents sont prêts pour la métaphase.

### 7. *La Métaphase 1*

Durant la première division de méiose, les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique et sont ségrégués dans deux futures cellules filles. Cette étape est indispensable pour assurer le succès final de la méiose. Les erreurs en première division de méiose constituent la cause principale d'aneuploïdies chez l'Humain. La division de métaphase I est rapide chez le mâle contrairement à celle des ovocytes.

En pro-métaphase, les fuseaux méiotiques, essentiels à la ségrégation des chromosomes, s'organisent à partir de structures spécifiques, les MTOCs (*microtubule organizing center*). Les kinétochores apparaissent au niveau des centromères. Les kinétochores sont des complexes protéiques de type tri-laminaire qui constituent un point d'ancrage des chromosomes aux microtubules (Jablonski *et al.*, 1998). Contrairement aux cellules en mitose ou en métaphase II où les kinétochores sont situés « dos à dos » sur les chromatides sœurs, en métaphase I les kinétochores des chromatides sœurs sont localisés « côte à côte » pour que les deux chromatides d'un même chromosome soient attachées au même pôle cellulaire par les microtubules. Les deux kinétochores agissent comme une seule entité, attachées toutes les deux au même fuseau méiotique (Parra *et al.*, 2004).

Le régulateur clé des kinétochores de méiose I est MEIKIN. Cette protéine a un rôle crucial dans la mono-orientation des kinétochores et protège les cohésines au niveau des centromères. MEIKIN fonctionne principalement en partenariat avec PLK1 (une kinase polo-like) qui se localise au niveau des kinétochores de façon MEIKIN-dépendante (Kim *et al.*, 2015).

Au moment de la rupture de la membrane nucléaire, les kinétochores sont rapidement capturés par les microtubules en cours d'élongation. Les microtubules migrent pour former les deux pôles d'un fuseau aplati, en forme de tonneau. Les chromosomes bivalents sont orientés de façon radiale par rapport à chaque fuseau. En fin de pro-métaphase, la majorité des chromosomes bivalents ont atteint le centre du fuseau méiotique.

La métaphase I progresse lorsque tous les chromosomes sont attachés et alignés au centre de la cellule. La métaphase I est très rapide, suivie aussitôt de l'anaphase puis de la télophase de première division méiotique.

## **8. L'Anaphase I**

En anaphase I, les chiasmats sont résolus et la cohésion entre les deux bras homologues est levée sauf au niveau des centromères, là où sont localisés les kinétochores. Pour séparer les deux chromosomes, les cohésines sont clivées par une endopeptidase spécifique, la séparase (Nasmyth *et al.*, 2002). Afin d'éviter une séparation trop précoce des chromosomes, l'activité de la séparase est inhibée par une protéine chaperonne, la sécurine. La séparase est inhibée par la sécurine jusqu'à la transition métaphase/anaphase qui se fait sous le contrôle de nombreuses protéines formant un complexe promoteur de l'anaphase (*Anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C*) (Peters *et al.*, 2006). L'APC/C dispose d'une activité ubiquitine ligase qui déclenche l'ubiquitination de régulateurs clés du cycle cellulaire (Cycline B1 ; sécurine) et ainsi leur dégradation via le protéasome. L'activation de l'APC/C est dépendante de Cdc20 (Fang *et al.*, 1998). L'APC/C permet le passage en anaphase en activant la séparase qui retire les liens entre les chromatides sœurs.

En fin d'anaphase I, les chromosomes à deux chromatides sont tirés vers les pôles opposés de la cellule germinale. La cellule s'allonge pour préparer la division cellulaire suivante, la méiose II.

## **9. La Téléphase I**

En téléphase I, le fuseau méiotique disparaît tandis que chaque groupe de chromosomes est situé près d'un des pôles cellulaires. Une nouvelle membrane cellulaire se forme pour donner deux cellules filles.

Les cellules sont alors appelées spermatocytes secondaires (II) et sont reconnaissables à leur noyau de taille réduite avec une chromatine légèrement granuleuse.

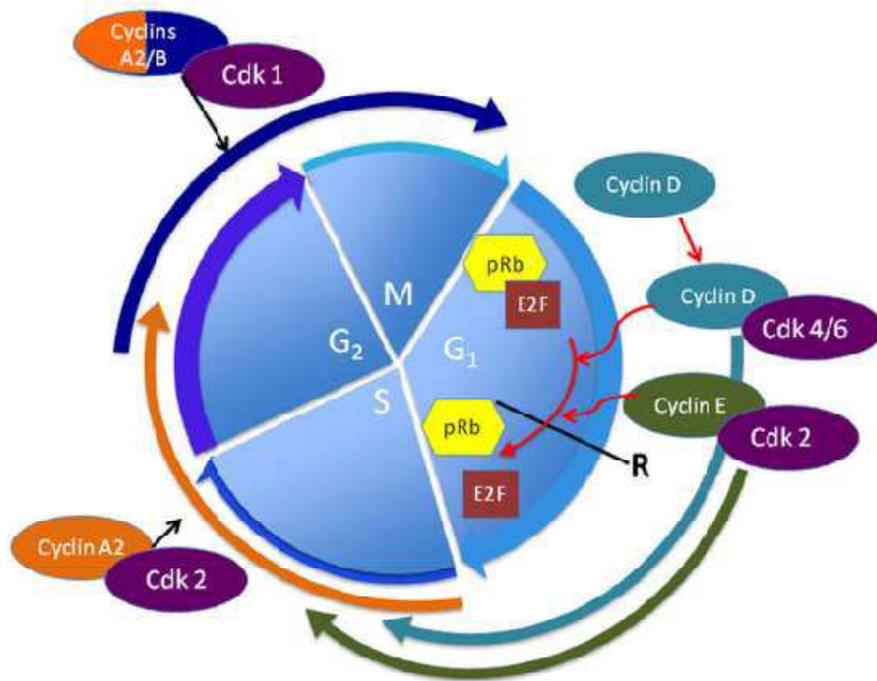
## **10. La Deuxième division de méiose**

Les spermatocytes II ont une durée de vie très courte, ils se divisent rapidement au cours de la deuxième division de méiose pour devenir des spermatides rondes. Il n'y a pas de réplication de l'ADN avant la deuxième division de méiose. Cette méiose II est similaire à une mitose classique, les chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent dans chaque cellule fille.

En conclusion, au cours de la méiose, à partir d'une spermatogonie, on obtient quatre gamètes haploïdes génétiquement différents.

### **C. Points de contrôle de la méiose**

La prophase I est la phase la plus critique de la méiose, elle comporte des étapes cruciales (appariement des chromosomes et mise en place des crossing-over) soumises à des points de contrôle. En cas d'anomalie dans l'une de ces étapes, le cycle cellulaire est stoppé ou retardé pour éviter la production de gamètes anormaux. En effet, en cas de mauvaise ségrégation des



**Figure 11 : Modèle classique du cycle cellulaire mitotique (Wolgemuth et al., 2013)**

La phase G<sub>1</sub> est initiée par la liaison de la cycline D et l'activation des kinases Cdk4/Cdk6. Le complexe actif cyclin D-Cdk4/6 phosphoryle la protéine rétinoblastome (pRb) ainsi que les protéines liées au pRb p107 et p130. quand pRb est phosphorylée, son interaction avec le facteur de transcription E2F est abolie. E2F libre stimule alors la synthèse de cycline E. La cycline E se lie ensuite avec Cdk2 pour former le complexe Cycline E-Cdk2. Ce complexe, avec le complexe Cycline D-Cdk4/6, augmente la phosphorylation de pRb, libérant ainsi d'avantage de E2F jusqu'à atteindre un taux suffisant pour induire l'entrée en phase S du cycle cellulaire. E2F a également pour cible la cycline A2 et plusieurs gènes spécifiques de la phase S, qui conduiront finalement à la transition G<sub>1</sub>/S. La cycline A2 se lie à Cdk2 et induit la transition G<sub>1</sub>/S ainsi que la transition S/G<sub>2</sub>, tout comme la réplication de l'ADN. Plus tardivement, la cycline A2 et la cycline B se lient à Cdk1 pour faire la transition G<sub>2</sub>/M et initier la mitose.

chromosomes pendant la méiose I ou de non séparation des chromatides sœurs durant la méiose II, il y a non-disjonction des chromosomes qui se traduit par une aneuploïdie.

On distingue trois points de contrôle, deux pendant la prophase I et un pendant la métaphase I lors de la formation des fuseaux méiotiques.

### **1. Points de contrôle en prophase I**

Le premier point de contrôle concerne la réparation des cassures double brin. En effet, après le stade pachytène I, toutes les cassures double brin doivent être restaurées. Il y a donc un point de contrôle pour détecter d'éventuelles erreurs de réparation des cassures et, le cas échéant, empêcher l'entrée en métaphase I. Il a été montré qu'une vingtaine de cassures double brin non réparées étaient nécessaires pour bloquer la division cellulaire (Deckbar *et al.*, 2007). Ce point de contrôle implique les protéines kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Meyn *et al.*, 1999) et ATR (Iliakis *et al.*, 2003). Grâce à leur fonction de phosphorylation, ces protéines forment un complexe sur les régions endommagées de l'ADN (Cortez *et al.*, 1999). ATM et ATR ont comme substrats BRCA1 et BRCA2 (*breast cancer*). La recombinaison homologue est liée à l'appariement des chromosomes. Il est donc également contrôlé lors de ce point de contrôle. En effet, les régions génomiques incapables de s'apparier correctement sont inaptes à la réparation de leurs cassures double brin. Ces régions présentent encore au stade pachytène les complexes protéiques recrutés pour résoudre les cassures double brin (De Vries *et al.*, 2005 ; Plug *et al.*, 1998). Le point de contrôle repère ainsi les cassures double brin persistantes et alerte la cellule. Les protéines BRCA1 et ATR s'accumulent le long du chromosome concerné au lieu de former des foci (Turner *et al.*, 2004). Cette localisation particulière de BRCA1 et ATR le long des chromosomes est retrouvée sur les chromosomes sexuels chez le mâle. De plus, l'accumulation de ces deux protéines est corrélée à la présence de la forme phosphorylée de H2AX qui est une marque de répression génétique (Turner *et al.*, 2005 ; Baarends *et al.*, 2005).

Le second point de contrôle surveille le nombre de chiasmas par la présence de chromosome univalent. Si le nombre de chiasmas est insuffisant, la cellule n'entame pas la métaphase I et entre en apoptose. C'est le cas dans l'invalidation de *Mlh1* ou de *Mlh3* (Baker *et al.*, 1996, Eaker *et al.*, 2002).

### **2. Transition Prophase I - Métaphase I**

Le passage des cellules germinales de la prophase I de méiose à la métaphase I est similaire du point de vue moléculaire à la transition G2/M du cycle cellulaire mitotique (**Figure 11**). De plus, cette transition se caractérise par des changements morphologiques dont le principal est le remodelage de la chromatine qui passe d'un état relativement dispersé à une forme hautement condensée ainsi que le désassemblage des composants du complexe synaptonémal.

Le MPF (*metaphase promoting factor*) est le régulateur de l'entrée en métaphase, dans la mitose et la méiose. Il est requis pour la transition G2/M c'est à dire la sortie de prophase I. Le MPF est un hétérodimère composé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique la kinase CDC2A (ou CDK1) et une sous-unité régulatrice la CyclineB1 (CCNB1). La régulation du MPF est induite par des phosphorylations et déphosphorylations par des kinases ou phosphatases spécifiques du cycle cellulaire. La kinase CDK1 est présente dans les spermatocytes au stade pachytène (Godet *et al.*, 2000). Aux stades précédant la transition en métaphase, on assiste à une accumulation de CCNB1 dans la cellule germinale avec un pic de concentration dans les spermatocytes en pachytène (Godet *et al.*, 2000). L'activation de l'activité kinase de CDK1 en transition G2/M implique la Cak (*Cyclin dependent kinase activation kinase*) et sa déphosphorylation par la phosphatase Cdc25c. Le taux de transcrits de *Cdc25c* augmente en fin de pachytène dans les spermatocytes de souris. L'activité kinase de CDK1 est principalement présente dans les spermatocytes en pachytène (Chapman et Wolgemuth, 1994) tandis que chez la femelle, l'activité de CDK1 augmente durant la pro-métaphase et la métaphase de méiose I (Davydenko *et al.*, 2013).

Un traitement *in vitro* avec un inhibiteur de phosphatase, comme l'acide okadaïque, stimule la transition G2/M1 des spermatocytes de souris. Ce résultat suggère l'implication du MPF ou d'autres kinases dans la transition G2/M1 chez la souris (Wilshire *et al.*, 1995). En cas d'inhibition du MPF, il n'y a pas d'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10, ce qui est un événement caractéristique de la transition G2/M1 (Cobb *et al.*, 1999).

Les mammifères présentent des cyclines de type A, la cycline A2 exprimée de façon ubiquitaire et la cycline A1 codé par le gène *Ccna1* qui est exprimé spécifiquement dans la lignée germinale mâle (Ravnik et Wolgemuth, 1996). Il a été décrit que l'ARNm et la protéine de la CyclineA1 sont détectés seulement en pachytène tardif jusqu'en diplotène. Il n'y a pas d'expression significative durant la deuxième division de méiose (Sweeney *et al.*, 1996). Les souris invalidées pour le gène *Ccna1* sont viables mais les mâles sont stériles avec une absence de différenciation des cellules germinales au-delà du stade diplotène (Liu *et al.*, 1998). Des expériences de TUNEL, montrant une mort massive des cellules germinales en diplotène, ce qui confirme un arrêt à la transition diplotène/métaphase I. Ces résultats suggèrent que la cyclineA1 est indispensable pour l'entrée en métaphase I spécifiquement chez les mâles. La cyclineA1 activerait donc la transition en métaphase de première division de méiose en parallèle avec le MPF.

De plus, les cyclines E1 et E2 sont exprimées dans le testicule. L'ARNm et la protéine de la cyclineE2 (codée par le gène *Ccne2*) sont détectés dans les spermatocytes en prophase I (Martinerie *et al.*, 2014). L'invalidation du gène codant pour la CyclineE2 chez la souris est viable mais les mâles sont

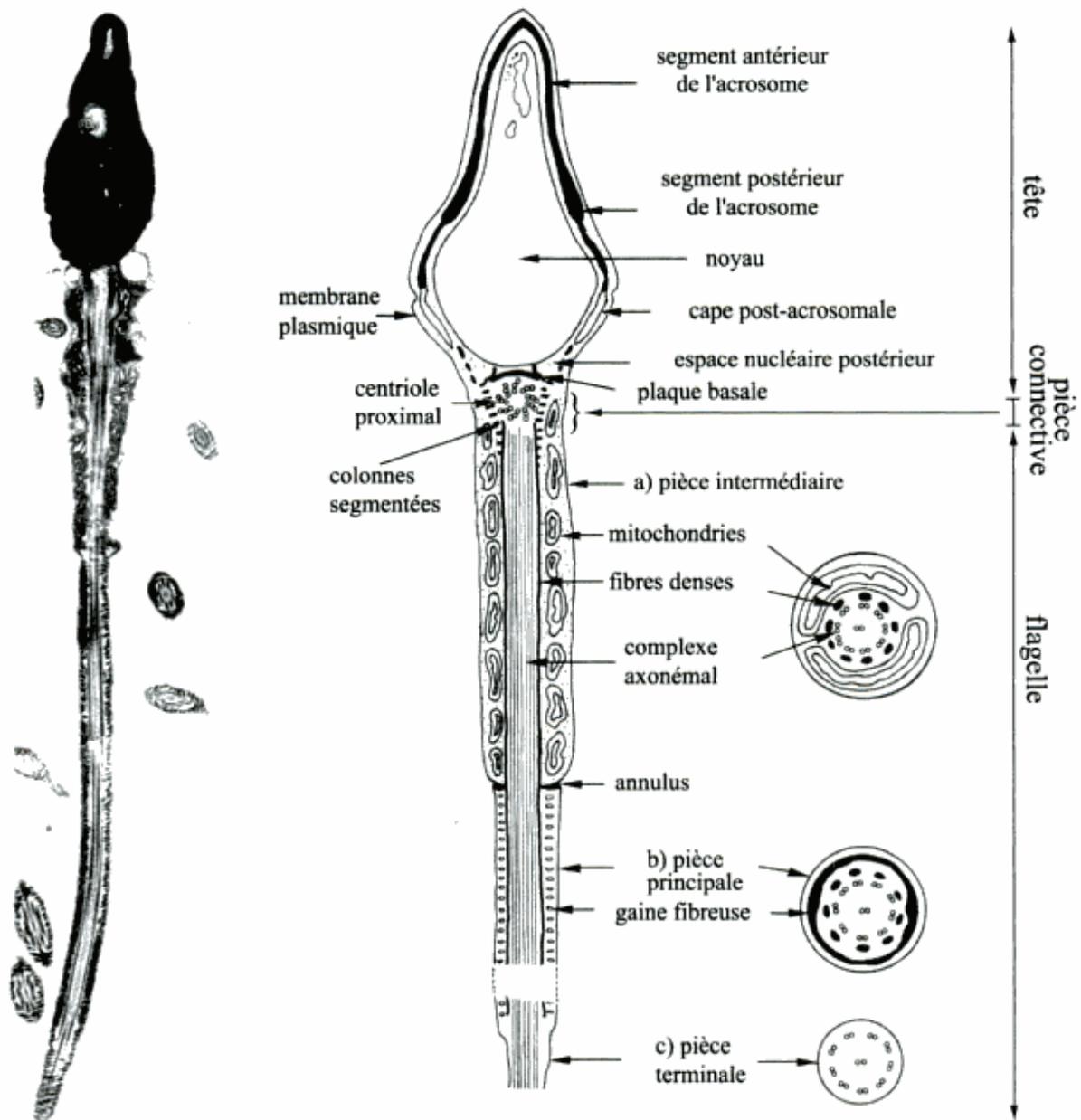
sous-fertiles ce qui suggère que cette cycline aurait un rôle dans la spermatogenèse. Plus précisément, ces souris mâles présentent un chargement anormal des protéines du complexe synaptonémal, des foci de  $\gamma$ H2AX persistant et une association de chromosomes non homologues (Martinerie *et al.*, 2014). CDK2 est un partenaire catalytique connu des cyclines de type E, il est également exprimé en prophase1 de méiose et semble requis pour la progression méiotique (Ortega *et al.*, 2003). Il a donc été fait l'hypothèse que le complexe CyclineE2-CDK2 est engagé dans la phosphorylation des protéines impliquées dans la progression méiotique (Martinerie *et al.*, 2014).

Chez la majorité des mammifères, les testicules, localisées dans le scrotum, ont une température inférieure d'environ 5°C à la température corporelle. A la moindre augmentation de la température, la spermatogenèse s'arrête, ce qui suggère l'implication de protéines *Heat Shock Protein* (HSP). Les HSP fonctionnent comme des molécules chaperonnes et ont une activité ATPase, elles forment des complexes avec d'autres protéines pour réguler leur transport et leur assemblage en complexes avec d'autres protéines. On distingue six protéines HSP70 dont deux sont exprimées spécifiquement dans les cellules spermatogéniques : HSP70-2 (HSPA2) exprimé pendant la phase méiotique (Rosario *et al.*, 1992) et HSP70T exprimé durant la phase post-méiotique de spermatogenèse. Bien qu'exprimé à un niveau faible dans certains tissus somatiques, l'invalidation de *Hsp70-2* n'est délétère que dans les cellules en spermatogenèse. Les souris mâles *Hsp70-2*<sup>-/-</sup> sont stériles avec une entrée en apoptose des cellules germinales en fin de prophase I de méiose correspondant à un arrêt de la spermatogenèse lors de la transition G2/M (Dix *et al.*, 1996). Des expériences de Western Blot associées à des immunoprécipitations ont montré que HSP70-2 était associé à CDK1 mais pas à la cyclineB1. De plus, dans les testicules *Hsp70-2*<sup>-/-</sup>, les protéines CDK1 et CyclineB1, bien que présentes, ne forment pas d'hétérodimère et CDK1 n'a pas d'activité kinase. Ces résultats suggèrent qu'HSP70-2 est requise pour activer la fonction kinase de CDK1 et pour que CDK1 acquière la conformation nécessaire pour former le complexe MPF.

La métaphase est entamée lorsque tous les chromosomes sont attachés et alignés au centre de la cellule.

### **3. Transition Métaphase I - Anaphase I**

Le troisième point de contrôle se situe à la transition métaphase I - anaphase I. Il correspond au contrôle du fuseau méiotique aussi appelé *Spindle assembly checkpoint* (SAC). Après attachement du fuseau aux kinétochores, le SAC vérifie que les chromosomes sont correctement orientés en détectant si la tension mécanique est équivalente entre les chromosomes qui doivent être séparés. Ce point de contrôle est essentiel pour la ségrégation correcte des chromosomes lors de l'anaphase I. Le SAC empêche l'entrée en anaphase I tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement



Microscopie électronique d'une section longitudinale (x 3 600). Schéma correspondant. Trois niveaux du flagelle sont représentés en coupe transversale.

**Figure 12 : Ultrastructure du spermatozoïde humain (Tiré de La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, Ellipses, Editions INRA)**

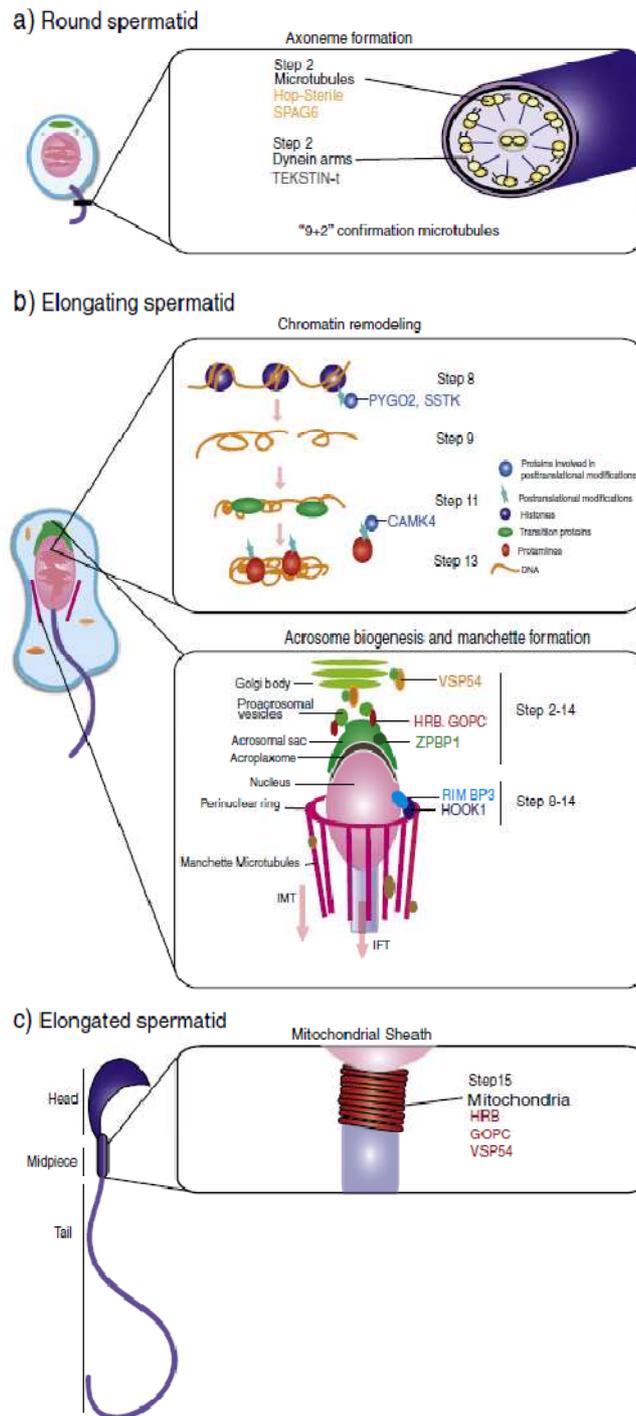
Le spermatozoïde humain est constitué de trois parties : la tête contenant le noyau et l'acrosome, la pièce connective ou pièce intermédiaire avec le centriole et le flagelle. Le flagelle est lui-même composé de la pièce intermédiaire qui contient le manchon mitochondrial, de la pièce principale avec la gaine fibreuse et d'une pièce terminale.

attachés au fuseau méiotique (Taylor *et al.*, 2004). Le SAC empêche ainsi la ségrégation inégale des chromosomes et prévient ainsi la formation de cellules aneuploïdes (Nicklas *et al.*, 1997). Deux facteurs régulent l'activité du SAC : l'attachement des microtubules aux kinétochores et la tension exercée par les microtubules sur les chromosomes. Il est à noter que, lors de la méiose I, la tension n'est pas directement générée par les kinétochores mais plutôt par les chiasmas. Pendant la métaphase 1 de méiose, l'orientation et la tension entre les chromosomes homologues dépend de la présence de chiasmas. MLH1 et MLH3, deux homologues de MutL chez la souris, sont indispensables pour la transformation de sites de recombinaison en crossovers au stade pachytène. En cas d'inactivation de l'un de ces gènes, le SAC est activé et les spermatocytes s'arrêtent en métaphase I (Eaker *et al.*, 2002). De nombreux composants du SAC fonctionnent également dans le *Mitotic Spindle Checkpoint*, ils ont été caractérisés dans des cellules en mitose (May et Hardwick, 2006). Ce point de contrôle implique des protéines principalement issues de deux familles : les BUD (*Bulding uninhibited by bezimidazole*) et MAD (*Mitotic arrest deficient*) (Vogt *et al.*, 2008). Ces protéines peuvent former plusieurs complexes : Mad1-Mad2, Bub1-Bub3 ou encore Bub3-BubR1/Mad3. Ces complexes sont essentiels pour cibler les kinétochores libres et pour enclencher le SAC.

De plus, la kinase Aurora B (Aurhb) est impliquée dans le SAC et dans la ségrégation correcte des chromosomes. Elle agit sous forme de complexe avec la protéine INCENP pour phosphoryler de nombreuses cibles. Ces deux protéines sont localisées sur l'hétérochromatine centromérique en fin de prophase et se concentrent plus précisément sur les centromères au cours de la métaphase (Parra *et al.*, 2003). La perturbation de ce complexe dans les cellules en mitose provoque une mauvaise ségrégation des chromosomes (Lampson *et al.*, 2004).

#### D. Spermiogenèse

Chez les mâles, la spermiogenèse est l'étape de différenciation permettant de passer d'une spermatide ronde, avec un noyau non condensé, à une cellule avec un flagelle et un noyau condensé. Les spermatides rondes subissent donc des modifications morphologiques et cytologiques radicales pour se différencier en spermatozoïde. Au niveau morphologique, les spermatides acquièrent trois régions distinctes : la tête, la pièce intermédiaire et la queue (**Figure 12**). Au niveau cytologique, elles subissent un remodelage de la chromatine, elles développent un acrosome et perdent la majorité de leur cytoplasme. La formation de la tête du spermatozoïde se fait en trois événements majeurs : la condensation de la chromatine, la modification de la morphologie nucléaire et la formation de l'acrosome. Ces trois événements ne sont pas indépendants car, par exemple, l'absence d'acrosome est souvent combinée à des anomalies morphologiques du noyau. Au cours de la spermiogenèse, plusieurs structures apparaissent : deux structures transitoires, l'acroplaxome et la manchette et une



**Figure 13 : Représentation schématique des gènes clés impliqués dans les changements morphologiques et cytoplasmiques des spermatides murins au cours de la spermiogenèse (Jan *et al.*, 2012)**

- a) Formation de l'axonème
- b) Formation de la manchette, du sac acrosomal et remodelage de la chromatine.
- c) Formation de la gaine mitochondriale.

structure qui sera observée dans les spermatozoïdes, la thèque périnucléaire (**Figure 13**) (Revue : O'Donnell *et al.*, 2011).

Cette étape dure 23 jours chez l'Homme et environ deux semaines chez la souris.

D'après des critères morphologiques, on peut distinguer 16 étapes dans la spermiogenèse chez la souris. Les étapes 1 à 8 correspondent aux spermatides rondes tandis que les étapes 9 à 16 correspondent aux spermatides allongées qui seront finalement libérées dans la lumière du tube séminifère (**Figure 5**).

### **1. Remodelage de la chromatine**

Les spermatides rondes voient la transcription des gènes reprendre avant que leur information génétique se condense pour réduire la taille du gamète et protéger l'ADN de la cellule (**Figure 13, b**). La condensation du noyau nécessite le remplacement des histones par des protamines.

Le remplacement des histones par les protamines est un processus graduel et associé à une hyperacétylation des histones H4. La transition d'histones à protamines commence chez la souris environ 6.5 jours après l'accomplissement de la méiose, cela correspond au stade 10 de la spermiogénèse lorsque les spermatides sont en élongation. 36h plus tard, au stade 12, on ne détecte plus d'histones dans les spermatides. Au stade 15, les protéines de transition ont disparues. La durée de la transition d'histones à protamines est donc d'environ 120h (Meistrich *et al.*, 2003).

Le remplacement des histones par les protamines est facilité par l'incorporation de variants d'histones, par des modifications post-transcriptionnelles, par des complexes de remodelage de la chromatine ainsi que par des cassures transitoires de l'ADN (Revue : Rathke *et al.*, 2014).

Chez la majorité des cellules eucaryotes, les unités de compaction de l'ADN sont les nucléosomes. Les nucléosomes correspondent à un fragment d'ADN d'environ 200pb entourant un octamère d'histones. L'octamère est formé par deux molécules de chacun des noyaux d'histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4. La fonction majeure des histones canoniques est de conditionner le génome et de réguler les gènes. On trouve également des histones non canoniques, les variants d'histones, qui ont un rôle dans des processus variés. Il existe des variants d'histones exprimés dans les cellules germinales post-méiotiques et pouvant être impliqués dans le relâchement de la structure chromatinienne en préparation de la transition histone/protamine.

En premier, certaines histones canoniques sont remplacées par des variants d'histones spécifiques du testicule. Chez les mammifères, parmi les 11 sous-types d'histone H1 connus, trois sont exprimés spécifiquement dans le testicule : H1t, H1T2 et H1LS1 (Happel et Doenecke, 2009).

La lignée germinale mâle se distingue par des variants d'histone qui lui sont spécifiques : TH2A, TH2B (apparaissent dans les spermatocytes précoces), H1t (apparaît dans les spermatocytes dès le stade pachytène tardif), TH3 (exprimé dans les spermatogonies différenciés) et ssH2B (dans les spermatides rondes) (Smith *et al.*, 1992 ; Moss et Orth, 1993 ; Meistrich *et al.*, 1985).

Les histones sont communément modifiées post-traductionnellement au niveau de la queue amino-terminale. Ces modifications qui jouent un rôle dans le remodelage de la chromatine peuvent être : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination et SUMOylation (Revue : Rathke, 2014). Des études ont montré que la phosphorylation et l'acétylation étaient décisives pour permettre la suppression des histones et leur remplacement par les protéines de transition. En effet, chez les mammifères, on observe une hyperacétylation des histones H4 dans les spermatides en élongation juste avant l'enlèvement des histones (Sonnack *et al.*, 2002). De plus, l'inactivation de gènes impliqués dans la phosphorylation, *Sstk* par exemple, ou dans l'acétylation, *Pygo2* par exemple, cause des anomalies morphologiques associées à des défauts de condensation de la chromatine dans les spermatides, ce qui provoque une stérilité mâle (Spiridonov *et al.*, 2005 ; Nair *et al.*, 2008). Ces modifications d'histones permettraient d'ouvrir la structure de la chromatine ce qui faciliterait le déplacement des histones (Sassone-Corci *et al.*, 2002). Un niveau réduit d'hyperacétylation de l'histone H4 est corrélé avec une fertilité altérée (Fenic *et al.*, 2004). En plus de l'acétylation, une forte méthylation des histones est détectée dans les spermatides en élongation. Acétylation et méthylation pourraient permettre une conformation plus ouverte de la chromatine. Un enrichissement des histones H2A et H2B est remarqué pendant la méiose et l'élongation des spermatides chez la souris (Baarends *et al.*, 1999).

Ensuite, les protéines de transition sont incorporées alors que les nucléosomes sont retirés.

On trouve deux protéines de transition importantes chez la souris : TNP1 et TNP2, codées respectivement par les gènes *Tnp1* et *Tnp2* (*TNP1* et *TNP2* chez l'homme). Enfin, les protamines créent le noyau spermatique hautement condensé. Les protamines constituent une unité nucléoprotéique d'environ 15pb. Comme les protéines de transition, les protamines sont des protéines riches en arginine et hautement basiques qui neutralisent la charge négative de l'ADN permettant ainsi sa compaction. Chez la souris et l'homme, on distingue deux protamines : PRM1 et PRM2, codées respectivement par *Prm1* et *Prm2*. La majorité des mammifères n'ont qu'un seul type de protamine. Chez la souris, PRM1 et PRM2 sont indispensables à la fertilité mâle et une délétion dès

l'état hétérozygote de *Prm1* ou *Prm2* conduit à une infertilité (Cho *et al.*, 2001). L'expression des gènes *Prm1* et *Prm2* est initiée dans les spermatides au stade 7, en même temps que *Tnp1* et *Tnp2*, chez la souris. Le remplacement des histones par les protamines se fait en deux étapes chez la souris: Aux stades 11-12 de différenciation, les histones sont remplacées par les protéines de transition. Aux stades 13-15, dans les spermatides tardives, les protéines de transition sont remplacées par les protamines (Meistrich *et al.*, 2003).

Les protamines stabilisent la chromatine des spermatozoïdes par leur assemblage dans le petit sillon de l'ADN. En effet, le niveau élevé d'arginine dans les protamines permet une forte liaison à l'ADN et les cystéines facilitent la formation de ponts disulfures inter et intra-protamines ce qui est essentiel pour une forte compaction de la chromatine.

Plusieurs arguments peuvent expliquer pourquoi les spermatozoïdes présentent une structure chromatinienne si spécialisée. Pour commencer, la condensation de la chromatine permet d'obtenir une forme compacte hydrodynamique au spermatozoïde. Ensuite, comme dit précédemment, la compaction de la chromatine permet de protéger le génome paternel des dégâts physiques et chimiques. Enfin, les protamines peuvent être impliquées dans des régulations épigénétiques.

Une diminution en protamines conduit à des modifications dans la compaction de la chromatine, dans la forme et l'organisation de l'acrosome et même dans l'architecture globale du spermatozoïde (Cho *et al.*, 2003). Des expériences d'ICSI (Injection Intra-Cytoplasmique) avec des spermatozoïdes *Prm2*<sup>-/-</sup> épидидymaires montrent que ces spermatozoïdes sont capables d'activer la majorité des ovocytes arrêtés en métaphase II mais peu de zygotes se développent jusqu'au stade blastocyste. Chez l'humain, un niveau réduit de protamines est corrélé avec une infertilité mâle, l'ADN endommagé des spermatozoïdes affecte le développement embryonnaire après une ICSI (Rogenhofer *et al.*, 2013).

Le remplacement des histones n'est pas total. Il a été montré que des régions chromatiniennes péricentriques conservaient leur organisation à base d'histones (Pittoggi *et al.*, 1999). Ce phénomène pourrait être impliqué dans l'empreinte épigénétique paternelle en permettant de maintenir une structure de chromatine ouverte aux modifications épigénétiques ce qui faciliterait la mise en place de l'empreinte paternelle. La conservation de certaines histones pourrait constituer elle-même une marque épigénétique en constituant les premières régions à être transcrites après la fécondation.

La condensation du noyau conduit à l'arrêt de la transcription dans les spermatides. La synthèse protéique reste pourtant active au cours de la spermiogenèse grâce à l'accumulation d'ARNm dans le cytoplasme des spermatides. Plus précisément, il a été montré que les ARNm peuvent être

accumulés au niveau du corps chromatoïde, une structure intracellulaire mise en place dans les spermatocytes au stade pachytène. Ces ARNm ont une demi-vie exceptionnellement longue puisqu'ils peuvent être traduits jusqu'à 15 jours plus tard (durant spermiogenèse) chez la souris (Stern *et al.*, 1983).

## 2. *Elongation du flagelle*

Au stade 2 de différenciation, tandis que le noyau des spermatides se condense, le flagelle commence son élongation. Le flagelle est l'élément indispensable à la mobilité des spermatozoïdes mais ceux-ci n'acquièrent la capacité à se mouvoir qu'après le passage dans l'épididyme. Le flagelle permettra le déplacement du spermatozoïde sur de longues distances dans l'appareil génital de la femelle afin d'atteindre l'ovocyte.

La formation du flagelle débute par la migration des centrioles au futur pôle caudal des spermatides. Le centriole proximal reste inactif tandis que le centriole distal donne naissance à un ensemble de microtubules à l'origine de l'axonème (**Figure 13, a**). L'axonème, partie motrice principale du flagelle, est constituée de 9 doublets de microtubules A et B organisés autour d'un doublet central. Le microtubule A est circulaire et formé par la juxtaposition de 13 protofilaments correspondant à une alternance de dimères de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de tubuline. Les microtubules B sont incomplets et constitués de 11 protofilaments. Chaque doublet de microtubules est lié à son voisin par un bras de nexine et présente deux bras de dynéine. Les bras de dynéine contiennent des ATPases libérant l'énergie nécessaire aux mouvements du flagelle (La reproduction chez les mammifères et l'homme, Chapitre 13, Dadoune et Demoulin).

Plusieurs études de mutations de gènes ont montré que des défauts dans la formation de l'axonème causent une stérilité mâle. La délétion de protéines impliquées dans la formation de l'axonème, SPAG6 ou TEKSTIN-T par exemple, conduit à l'absence de structure importante pour l'axonème et en conséquence provoque une perte de motilité du flagelle (Sapiro *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 2004). De façon intéressante, la perte de ces structures de l'axonème s'accompagne également d'anomalies de la tête suggérant une coordination entre la formation de la tête et de la queue. Une gaine fibreuse se met ensuite en place autour de ce complexe axonémal.

Une partie des mitochondries migre et se regroupe dans la région adjacente à la pièce intermédiaire. Puis ces mitochondries se condensent, s'allongent et se lient bout à bout pour former un manchon hélicoïdal enroulé autour de la gaine fibreuse de l'axonème. C'est ce qu'on appelle la gaine mitochondriale qui est la source d'énergie du flagelle (Sun *et al.*, 2010). Cette gaine mitochondriale est limitée à son extrémité distale par l'anneau de Jensen qui fait la jonction entre la pièce principale et la pièce intermédiaire (**Figure 13, c**).

La spermatide ronde devient alors une spermatide en cours d'élongation qui correspond aux stades 8 à 14 de différenciation. Une structure transitoire, la manchette, se met alors en place (**Figure 13, b**). La manchette comporte une partie en anneau, l'anneau périnucléaire, formé de tubuline  $\alpha$  qui entoure la base du noyau en élongation. Cet anneau joue un rôle clé dans l'élaboration du noyau et de la tête du spermatozoïde, c'est à partir de cet anneau que rayonnent les faisceaux de microtubules, parallèlement au flagelle en formation, pour former le manteau de la manchette (Kierszenbaum et Tres, 2004). Un défaut dans la formation de la manchette se traduit par une stérilité. Par exemple, la mutation du locus *Azh* (*abnormal spermatozoa head*) chez la souris se traduit par une manchette anormale des spermatozoïdes associée à une queue enroulée et courbée ainsi que des spermatozoïdes avec des têtes anormales (Mochida *et al.*, 1999). La tête anormale de ces spermatozoïdes *azh/azh* est induite par la position ectopique des microtubules de la manchette qui perturbe la forme du noyau (Russell *et al.*, 1991). Par ailleurs, la mutation du gène *Hook1*, localisé dans la même région du chromosome 4 que le locus *Azh*, provoque le même type de défaut des spermatozoïdes (Mendoza-Lujambio *et al.*, 2002). Le gène *Hook1* est exprimé majoritairement dans les cellules germinales haploïdes et il a été montré que la protéine HOOK1 stabiliserait la manchette et serait impliquée dans la liaison de la manchette au noyau. La mutation *Azh* chez la souris est en fait causée par une délétion des exons 10 et 11 du gène *Hook1* conduisant à une protéine non-fonctionnelle. C'est donc la perte de fonction de la protéine HOOK1 qui cause le phénotype *Azh*. Le gène *HOOK1* humain pourrait être un bon gène candidat aux infertilités mâles causées par une tératozoospermie ou des défauts de la tête du spermatozoïde.

### 3. Réduction cytoplasmique

En même temps que l'élongation des spermatides, le volume cytoplasmique est progressivement réduit. Cette réduction se fait majoritairement grâce au complexe tubulo-bulbaire (TBC) c'est-à-dire des protusions cytoplasmiques de la tête du spermatide entourées par des invaginations profondes de la membrane des cellules de Sertoli afin de leur transférer l'excès de cytoplasme. Les TBC sont bordés par des filaments d'actine  $\beta$  (Cavicchia *et al.*, 2011).

Chez la souris, la protéine CAPZA3 interagit avec l'actine F pour permettre l'évacuation de cytoplasme. Une mutation dans le gène *Capza3* se traduit par une stérilité des souris mâles associée à une morphologie anormale des spermatides avec un défaut de motilité causé par une mauvaise élimination du cytoplasme (Geyer *et al.*, 2009). Le reste du cytoplasme est enlevé sous forme de gouttelettes de cytoplasme, appelées corps résiduels, qui sont phagocytées par les cellules de Sertoli.

#### 4. Formation de l'acrosome

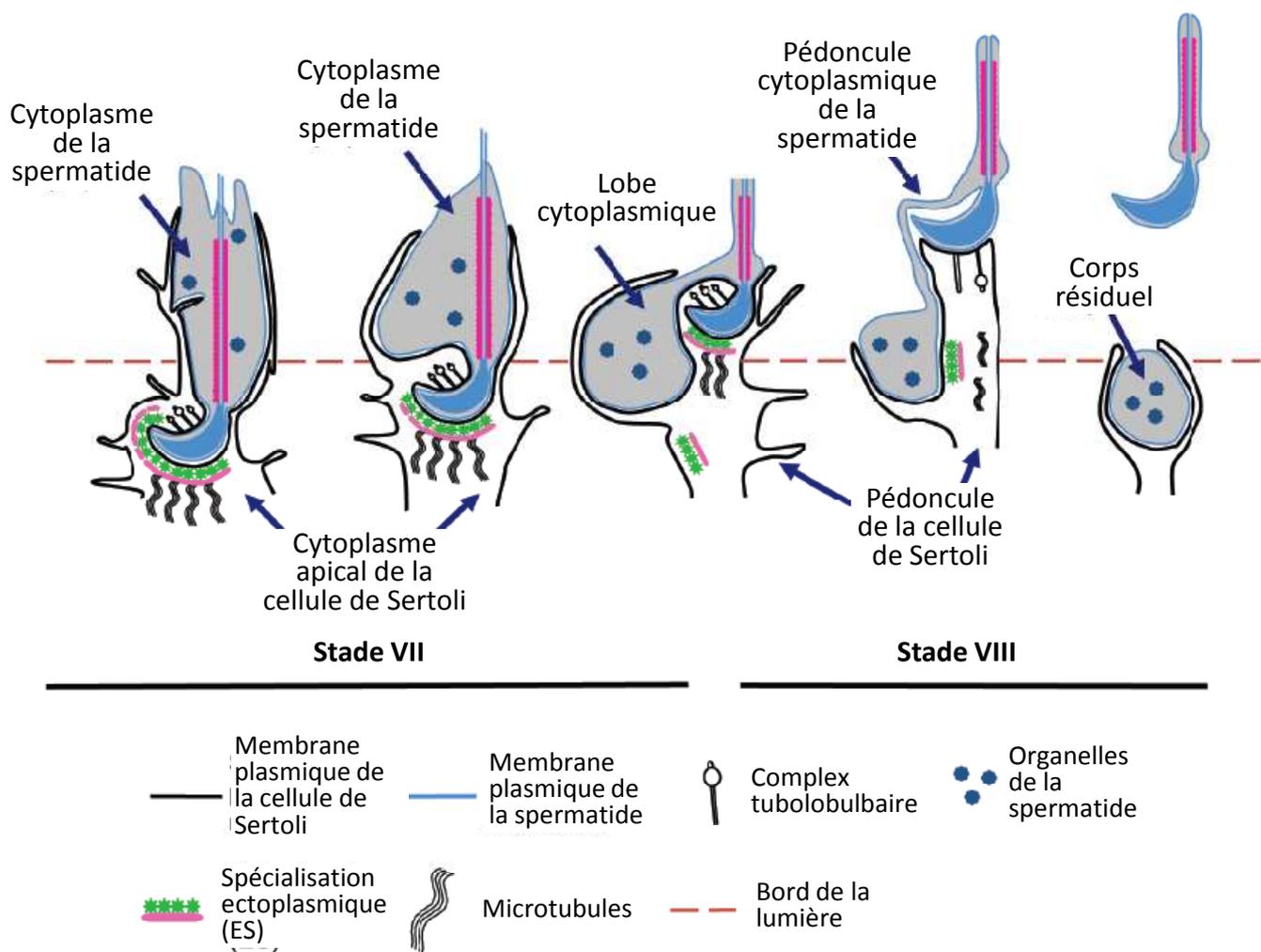
L'acrosome est une vésicule dérivée de l'appareil de Golgi qui se situe à l'avant du noyau haploïde et contient des enzymes capables de digérer des protéines et des sucres complexes afin de pouvoir lyser les enveloppes externes de l'ovocyte et permettre la fécondation. Parmi ces enzymes protéolytiques, on trouve la hyaluronidase, la phosphatase acide, la neuraminidase ainsi qu'une protéase portant une activité trypsinique, l'acrosine (Lin *et al.*, 1994 ; Adham *et al.*, 1997 ; Tulsiani *et al.*, 1998).

La formation de l'acrosome est progressive et débute au stade 2 pour finir au stade 12 de la spermiogenèse. Au départ, des vésicules pro-acrosomales issues de l'appareil de Golgi sont transportées jusqu'au pôle supérieur des spermatides. Une fois arrivées, elles s'accrochent et fusionnent au niveau d'une structure d'actine F et de kératine, l'acroplaxome. L'acroplaxome se présente comme un complexe dense aux électrons en microscopie électronique. Les composants de l'acroplaxome sont assemblés dans l'espace étroit entre l'enveloppe du noyau en allongement et la membrane de l'acrosome en formation. L'acroplaxome est localisé à la pointe du sac acrosomal dans les spermatides en développement. L'acroplaxome est constitué de deux éléments : l'anneau marginale et la plaque acroplaxomique. L'anneau marginal de l'acroplaxome est un complexe de filaments d'actine et de kératine.

En plus d'être impliqué dans le transport des vésicules pro-acrosomales, l'acroplaxome ancre l'acrosome en formation au noyau de la spermatide.

La proacrosine est exprimée spécifiquement dans la lignée germinale mâle et intervient dans la formation de l'acrosome. La proacrosine est la forme inactive de l'acrosine, elle s'activera au contact de la protéine ZP2 (*Zona Pellucida glycoprotein 3*), présente à la surface de l'ovocyte.

Durant les stades 5 à 12 de différenciation, la vésicule acrosomale s'aplatit, se condense et s'allonge. Un défaut dans la formation de l'acrosome cause une globozoospermie, c'est-à-dire des malformations graves de l'acrosome et de la tête des spermatides, ce qui se traduit par une stérilité mâle. Cela a été montré chez la souris avec l'inactivation de protéines impliquées dans le transport et la fusion des vésicules, comme AGFG1 (Kang-Decker *et al.*, 2001) ou GOPC (*Golgi associated PDZ and coiled motif containing protein*) (Yao *et al.*, 2002), qui causent une malformation de l'acrosome et, en conséquence, une globozoospermie. En plus de ce défaut de l'acrosome, ces deux mutants ne présentent pas de gaine mitochondriale autour de la pièce intermédiaire ; la motilité de la cellule germinale est donc impactée. La protéine KIFC1 (*C-terminal kinesin motor*) a également été décrite comme étant impliquée dans la formation et l'élongation de l'acrosome (Yang *et al.*, 2003).



**Figure 14 : Schéma de la spermiation (O'Donnell *et al.*, 2011)**

A l'initiation de la spermiation, au stade VII, les spermatides présentent un cytoplasme abondant autour du flagelle et sont enveloppées par des projections en forme de doigts du cytoplasme apical des cellules de Sertoli. Les complexes tubulo-bulbaires se forment au niveau de la tête des spermatides, là où les spécialisations ectoplasmiques (ES) sont absentes. Le cytoplasme des cellules de Sertoli recule jusqu'à ne plus être en contact qu'avec la surface dorsale de la spermatide au stade VIII. Le pédoncule de la cellule de Sertoli s'allonge et repousse la spermatide vers la lumière du tube. Le cytoplasme de la spermatide se condense et demeure dans l'épithélium, il se retrouve localisé sous le niveau de la tête et est alors appelé lobe cytoplasmique de la spermatide. C'est ce lobe qui formera le corps résiduel après son désengagement. Durant la progression du stade VII à VIII, seules les ES dans le pédoncule des cellules de Sertoli persistent. Les complexes tubulo-bulbaires sont plus nombreux dans la courbure ventrale de la tête de la spermatide au stade VII, puis au niveau de la courbure dorsale au stade VIII (parfois sans composant bulbaire). La spermiation se termine : Désengagement rapide de la tête de la spermatide, rupture du pédoncule cytoplasmique et phagocytose du corps résiduel par la cellule de Sertoli.

Par ailleurs, il a également été montré que la condensation de l'acrosome jouait un rôle crucial dans sa formation. Par exemple, la protéine ZBP1 aurait un rôle dans la condensation de l'acrosome au stade 6 de la différenciation des spermatides. Son invalidation chez la souris cause un phénotype de spermatozoïdes anormaux et immobiles similaire à celui des mutants pour AGFG1 et GOPC et conduit à une stérilité mâle (Lin *et al.*, 2007).

## 5. Spermiation

La spermiation est un processus long et complexe qui permet la libération des spermatides matures par les cellules de Sertoli dans la lumière du tube séminifère. La spermiation est un critère déterminant pour le nombre de spermatozoïdes qui entrent dans l'épididyme et donc pour la quantité de spermatozoïdes présente dans l'éjaculat.

Les événements morphologiques et structuraux associés à la spermiation sont bien décrits et semblent conservés entre les espèces murine et humaine (Revue : O'Donnell *et al.*, 2011) (**Figure 14**).

La spermiation est initiée au stade VII chez la souris, ce qui correspond au stade II chez l'homme. Elle débute avec l'alignement des spermatides allongées au bord luminal de l'épithélium séminifère. La cellule de Sertoli enveloppe largement la spermatide par des projections en forme de doigts de son pôle apical. A ce stade, les spermatides sont en contact avec les cellules de Sertoli par des Spécialisations Ectoplasmiques (SE). Ces SE sont des complexes protéiques qui apparaissent au niveau des spermatides rondes au stade 8 de différenciation, dans le modèle murin. Elles sont associées avec des microtubules et des protéines motrices afin de transloquer les spermatides à travers l'épithélium séminifère pendant la spermiogenèse. Le cytoplasme de la cellule de Sertoli recule jusqu'à n'être plus en contact qu'avec la surface dorsale de la tête de la spermatide au stade VIII. Alors que la spermiation progresse, la cellule de Sertoli s'allonge et pousse la spermatide dont la tête et le flagelle sont progressivement plus étendus dans la lumière du tube séminifère. Alors que la tête de la spermatide s'allonge, son volume cytoplasmique se condense et reste dans l'épithélium séminifère. Le cytoplasme de la spermatide est donc localisé en dessous du niveau de la tête, il paraît ainsi couler vers l'épithélium séminifère. Ce cytoplasme stationné dans l'épithélium est appelé lobe cytoplasmique et est relié à la spermatide par une fine tige cytoplasmique. Les organelles de la spermatide se concentrent dans le lobe cytoplasmique qui formera, après la libération de la spermatide, le corps résiduel. Au cours de la progression du stade 7 au stade 8 de la différenciation des spermatides, les SE disparaissent de la membrane plasmique de la cellule de Sertoli.

La fin de la spermiation se caractérise par un désengagement rapide de la tête de la spermatide de la cellule de Sertoli. La tige cytoplasmique entre la région périnucléaire de la spermatide et le corps résiduel se rompt. La spermiation se termine par la libération de la spermatide, alors appelée

spermatozoïde, dans la lumière du tube séminifère et la phagocytose du corps résiduel par la cellule de Sertoli.

## **E. Maturation post-testiculaire des gamètes mâles**

Une fois la spermiogenèse terminée, les spermatozoïdes sortent du testicule, mais ne sont pas fonctionnellement matures. Ils possèdent un flagelle non fonctionnel car les mitochondries ne sont pas encore aptes à leur permettre des déplacements. Le pouvoir fécondant du spermatozoïde est acquis à la sortie du testicule par deux étapes : la première est la maturation épидидymaire, la seconde est la capacitation dans les voies génitales femelles.

### **1. Maturation épидидymaire**

#### **a) Caractéristiques et fonctions de l'épididyme**

L'épididyme est un tubule simple, long (1,5m chez la souris, environ 6m chez l'homme, 60m chez le bélier) et pelotonné, empaqueté dans une tunique conjonctive. Il relie les canaux efférents au canal déférent. L'épididyme assure le transport des spermatozoïdes hors du testicule, ce transit est très important pour la maturation des spermatozoïdes. La durée du passage des spermatozoïdes dans l'épididyme est variable selon les différentes espèces (13 jours chez le bélier, 1 à 12 jours chez l'homme).

L'épididyme est organisé en trois parties : la tête (*Caput*), le corps (*Corpus*) et la queue (*Cauda*). Ces trois parties sont séparées par des cloisons conjonctives et ont des rôles fonctionnels différents (Belleannée *et al.*, 2012).

La paroi de l'épididyme est constituée d'un épithélium pluristratifié entouré de fibres musculaires lisses qui permettent des contractions péristaltiques régulières de l'épididyme. Cet épithélium est constitué de deux couches cellulaires : une couche de grandes cellules principales présentant de nombreuses microvillosités et une couche de petites cellules basales. La barrière hémato épидидymaire est composée de jonctions serrées entre les cellules épithéliales.

L'épididyme possède plusieurs fonctions. Sa première fonction est bien-sûr le transport des spermatozoïdes vers le système éjaculateur. Mais il a aussi une fonction de réabsorption des ions, des protéines et d'eau, afin de concentrer les spermatozoïdes. De plus, il capte et concentre des substances sanguines, comme la carnitine et l'inositol, dans la lumière du tube. *In vitro*, la carnitine a été décrite pour augmenter la motilité des spermatozoïdes (Aliabadi *et al.*, 2012). L'épididyme sécrète également des petites molécules organiques comme la glycérylphosphorylcholine ainsi que des protéines spécifiques, majoritairement des enzymes (phosphatases, protéases, glucosidases et glycotransférases) qui modifient le revêtement de surface des spermatozoïdes et interviennent ainsi dans leur maturation. L'épididyme sécrète également des inhibiteurs de protéases et de glycosidases

qui contrôlent l'activité de ces enzymes (Dacheux *et al.*, 2009). Les cellules épithéliales du tube sont reliées entre elles par des jonctions serrées au pôle apical ce qui permet au liquide épидидymaire d'avoir une composition contrôlée et très différente de celle du sang.

### b) Modifications des spermatozoïdes

C'est dans l'épididyme que le spermatozoïde acquiert sa capacité de motilité fléchante, c'est-à-dire avec une trajectoire rectiligne grâce à des battements du flagelle coordonnés. Dans la tête et le début du corps de l'épididyme, le spermatozoïde subit des modifications importantes afin d'acquérir un pouvoir fécondant. Ces modifications sont dépendantes de l'environnement, c'est-à-dire selon la composition du liquide épидидymaire. Le corps et la queue de l'épididyme jouent un rôle dans la protection et la survie des spermatozoïdes ainsi qu'un rôle de contrôle qualité, les spermatozoïdes qui ne terminent pas le programme sont éliminés.

Au cours du transit dans la région proximale de l'épididyme, le spermatozoïde subit une modification (maturation, masquage ou perte) de ses protéines membranaires d'origine testiculaire. Chez les rongeurs, les protéines de la famille ADAM (*A disintegrin and metalloproteases*) (fertiline  $\alpha$ , fertiline  $\beta$  et cyritestine par exemple), présentes sur la membrane du testicule sous forme de précurseurs inactifs, subissent un clivage protéolytique accompagné d'une relocalisation au niveau de la région post-acrosomique (Blobel *et al.*, 2000). Ces protéines sont indispensables pour la reconnaissance spermatozoïde-ovocyte. En effet, l'invalidation des gènes codant pour l'hétérodimère formé des fertelines  $\alpha$  et  $\beta$  (respectivement *Adam2* et *Adam3*) et l'invalidation d'*Adam3* codant pour la cyritestine provoquent un défaut de liaison et de fusion du spermatozoïde à l'ovocyte se traduisant par une stérilité mâle (Cho *et al.*, 1998 ; Nishimura *et al.*, 2004 ; Shamsadin *et al.*, 1999). L'invalidation de ces gènes se traduit également par une incapacité des spermatozoïdes à se déplacer correctement dans l'oviducte (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Dans la région médiane de l'épididyme, certaines protéines membranaires du spermatozoïde apparaissent transitoirement puis disparaissent. Ces protéines, comme la clusterine et la lactoferrine, peuvent avoir un rôle dans la protection contre l'oxydation ou un rôle dans le masquage de certains sites, comme c'est le cas pour l'hexosaminidase. Enfin, dans la partie caudale de l'épididyme, de nouvelles protéines (fortement sialylées et de faible poids moléculaire) se mettent en place au niveau de la membrane du spermatozoïde (Dacheux *et al.*, 2005). Ces nouvelles protéines sont caractéristiques du pouvoir fécondant du spermatozoïde.

Des études (Yamaguchi *et al.*, 2006 ; Han *et al.*, 2009 ; Krutskikh *et al.*, 2012) ont montrés, par des invalidations de gènes, que les modifications membranaires des spermatozoïdes étaient dépendantes les unes des autres. L'invalidation des gènes tels que *Adam2* et *Adam1a* provoque

l'absence d'autres composés de la membrane du spermatozoïde comme ADAM3. La composition membranaire du spermatozoïde dépend de la position correcte de tous ses composés puisque l'absence d'une seule protéine peut perturber la maturation des autres protéines et la mise en place de sites cruciaux pour la reconnaissance ovocytaire causant ainsi une stérilité.

Par ailleurs, au niveau lipidique, il existe un changement du ratio phospholipides/cholestérol ce qui augmente la fluidité membranaire des spermatozoïdes.

Des échanges ioniques et aqueux se mettent aussi en place, surtout au niveau de la tête de l'épididyme, ce qui régule le volume du spermatozoïde et principalement de sa tête. La compaction du noyau de la spermatide a débuté dans le testicule, par le remplacement des histones par les protamines. Dans la tête de l'épididyme, la compaction du noyau de la spermatide continue avec l'oxydation des groupements thiols libres des protamines. Plus la tête est petite, plus la mobilité du spermatozoïde est efficace et plus l'information génétique contenue dans le noyau est protégée contre d'éventuels effets mutagènes (Noblant *et al.*, 2012).

De plus, la tête de l'épididyme sécrète de la GPx5 (Glutathion peroxydase) qui contrôle le niveau en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans la lumière de l'épididyme. La concentration en  $H_2O_2$  doit être régulée, en effet une concentration en  $H_2O_2$  importante provoque des dommages radicalaires (peroxydation des lipides membranaires, atteintes du noyau des cellules germinales) pouvant perturber la fécondation (O'Flaherty *et al.*, 2006). Cependant, un défaut d'expression de *GPx4* perturbe la condensation du noyau de la spermatide au niveau de la tête de l'épididyme. En effet, l' $H_2O_2$  est aussi nécessaire à la formation de ponts disulfures sur les résidus thiols des cystéines et donc à la compaction du noyau des spermatides dans l'épididyme (Revue : Drevet, 2006).

## 2. *Capacitation*

Après l'éjaculation, les spermatozoïdes arrivent dans le tractus femelle, ils sont progressivement motiles mais encore incapables c'est-à-dire capables de se déplacer mais ne peuvent pas encore se fixer à l'œuf ni le féconder. Ils traversent ensuite la cavité utérine où les premières étapes de la capacitation ont lieu : perte des facteurs membranaires de décapacitation, majoritairement acquis dans les plasmas épидидymal et séminal. Ces modifications de la membrane du spermatozoïde augmentent la fluidité de la membrane et la perméabilité à l'ion  $Ca^{2+}$ . Ceci facilite les mouvements des protéines membranaires. Les récepteurs spermatiques impliqués dans la reconnaissance et la fixation à la zone pellucide de l'ovocyte deviennent exposés (Reid *et al.*, 2011). La membrane plasmique est prête à initier la réaction acrosomale en réponse au  $Ca^{2+}$  (Florman *et al.*, 2008).

L'un des premiers changements subits par le spermatozoïde correspond à l'enlèvement du cholestérol libre de la membrane plasmique du spermatozoïde par un stress oxydatif combiné à des accepteurs du cholestérol : l'albumine et la lipoprotéine HDL, présentes dans les sécrétions génitales. Le cholestérol constitue un puissant facteur de décapacitation car il stabilise la membrane plasmique du spermatozoïde durant le transit épидидymaire et évite les interactions intermoléculaires responsables d'un état de décapacitation (Davis *et al.*, 1980). L'enlèvement du cholestérol redonne de la mobilité aux phospholipides membranaires du spermatozoïde ce qui laisse pénétrer des ions, dont le  $\text{Ca}^{2+}$  qui se lie à la phosphatidylsérine. Or la phosphatidylsérine stabilise la phosphatidyléthanolamine membranaire qui, en son absence, quitte la bicouche lipidique pour former des micelles. Ceci fluidifie davantage la membrane du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes se lieraient ensuite aux cellules épithéliales dans la région de l'isthme de l'oviducte où ils entreraient en quiescence et seraient stockés en attente de l'ovulation (Baillie *et al.*, 1997).

Un signal endocrine coïncidant avec l'ovulation provoque un changement soudain dans la biochimie du spermatozoïde : augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des niveaux intracellulaires d'adénosine cyclique monophosphate et de phosphorylation des tyrosines. En effet, une augmentation massive de la phosphorylation des tyrosines est observée au niveau de la gaine fibreuse du flagelle (Visconti *et al.*, 1995). En réponse à ce signal, le calcium est relargué de façon pulsatile ce qui induit une motilité hyperactive du spermatozoïde.

La motilité hyperactive implique une transition d'un battement du flagelle symétrique et de faible amplitude à un mouvement de grande amplitude et asymétrique de la queue du spermatozoïde (Yanagimachi *et al.*, 1994).

Le spermatozoïde hyperactif est relâché par l'épithélium de l'oviducte et migre dans les trompes de Fallope jusqu'à l'ovocyte où il pénètre dans le cumulus de l'ovocyte. Les spermatozoïdes peuvent réaliser la réaction acrosomique dans le cumulus.

### III. Régulations de la spermatogenèse

#### A. Régulations hormonales et paracrines

L'étude de la régulation hormonale de la différenciation testiculaire et de la spermatogenèse a été permise grâce à l'existence de mutants chez la souris. On trouve des mutants naturels comme les *testicular feminised mouse (tfm)* qui n'ont pas de récepteurs des androgènes fonctionnels (Lyon *et al.*, 1970) et les *hypogonaded mouse (hpg)* qui présentent une déficience sévère en gonadotrophines circulantes (Cattanach *et al.*, 1977). Il existe également des lignées de souris invalidées pour certains gènes comme le récepteur de la FSH (FSHRKO) (Abel *et al.*, 2008), le récepteur des androgènes (ARKO) (O'Shaughnessy *et al.*, 2012), le récepteur des androgènes spécifiquement dans les cellules de Sertoli (SCARKO) (De Gendt *et al.*, 2004) et des souris sans le récepteur des androgènes spécifiquement dans les cellules périvitubulaires myoïdes (PTM-AKO) (Welsh *et al.*, 2009). Ces souris mutantes apportent des informations sur l'initiation de la spermatogenèse mais pas sur son maintien, c'est pour cela qu'un nouveau modèle de souris à expression inducible dans le testicule a été développé, permettant de diriger une expression conditionnelle de certains gènes d'intérêt (Revue : O'Shaughnessy, 2014)

#### 1. Régulation hormonale de la différenciation germinale mâle

Pendant la vie fœtale, le développement des pro-spermatogonies a lieu avant la formation et la maturation de l'hypophyse. Le développement précoce des gonocytes n'est donc pas régulé par les gonadotrophines, hormones qui seront ensuite produites par l'hypophyse. Les mutants FSHRKO et *hpg* confirment cette absence de régulation par les gonadotrophines puisque le nombre de cellules germinales n'est pas affecté, à la naissance, chez ces souris (O'Shaughnessy *et al.*, 2012 ; Baker *et al.*, 2001).

Les cellules de Leydig fœtales commencent à produire des androgènes peu de temps après la formation du testicule, vers 13jpc chez la souris (O'Shaughnessy *et al.*, 2005). Cependant, les souris ARKO ou ARKO+FSHRKO présentent un nombre de gonocytes normal à la naissance, ce qui montre que le développement fœtal des gonocytes n'est pas régulé par les androgènes (O'Shaughnessy *et al.*, 2012).

Entre la naissance et 5jpp, les gonocytes prolifèrent. Chez toutes les souris mutantes pour les androgènes ou leur récepteur, on observe une diminution d'environ 45% du nombre de cellules germinales en postnatal à 5jpp, même si elles migrent correctement jusqu'à la membrane basale du tube séminifère. Ces résultats suggèrent que la prolifération post-natale des gonocytes et leur survie avant le stade CSS (Gonocytes formant le pool de cellules germinales disponibles après la puberté

pour la spermatogenèse) sont dépendantes des hormones (O'Shaughnessy *et al.*, 2012 ; Baker *et al.*, 2001).

## 2. Régulation hormonale de la spermatogenèse

Sous l'influence de l'hormone GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), l'hypophyse sécrète deux hormones appelées gonadotrophines : FSH et LH. Ces deux hormones sont indispensables à la spermatogenèse puisqu'en leur absence chez l'homme, lors de cas d'hypophysectomie, il y a un arrêt de la spermatogenèse. Les souris *hpg* invalidées pour les gonadotrophines présentent une absence de spermatogenèse (Singh *et al.*, 1995). Les souris sans récepteurs de la FSH ou des androgènes ne présentent que 3% du nombre normal de cellules germinales à 20jpp (O'Shaughnessy *et al.*, 2012).

Dans la gonade pubère, LH stimule les cellules de Leydig au niveau de ses récepteurs. Ces récepteurs sont de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G intracellulaire. Le signal passe ensuite par la formation d'AMPc. En réponse à ce signal, les cellules de Leydig produisent et sécrètent la testostérone. Cette hormone est l'androgène principal chez la plupart des espèces de mammifères. Elle agit hors du testicule sur les organes sexuels et les caractères sexuels secondaires.

FSH sécrétée pendant la vie fœtale agit directement sur les cellules de Sertoli via son récepteur couplé à une protéine G. La transduction du signal se fait par l'intermédiaire de cette protéine G associée à l'adénylcyclase qui stimule la production d'AMPc. L'AMPc semble être le principal second messenger, puisqu'*in vitro* il peut remplacer seul les effets de la FSH (Huhtaniemi, 1996). A son tour, l'AMPc entraîne la phosphorylation de la protéine de liaison CREB (Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate Response Element-Binding Protein). Cette protéine CREB fonctionne comme un activateur de transcription en se liant à la région promotrice de gènes cibles de l'AMPc (Walker *et al.*, 1995). La FSH régule ainsi les fonctions et la structure des cellules de Sertoli.

Avant la puberté, FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli. C'est un rôle fondamental pour la fertilité car c'est le nombre de cellules de Sertoli qui définit le nombre de spermatozoïdes pouvant être produit. En plus de ce rôle sur la prolifération, FSH joue également un rôle sur la maturation et la différenciation des cellules de Sertoli. De plus, FSH est la principale hormone impliquée dans l'initiation de la spermatogenèse à la puberté. L'invalidation du gène codant pour FSH (Souris FSH $\beta$ KO) ou pour son récepteur (FSHRKO) ne provoque pas de stérilité mais induit une diminution du nombre de cellules germinales ainsi que de la qualité du sperme (Kumar *et al.*, 1997 ; Abel *et al.*, 2000 ; Wreford *et al.*, 2001). FSH augmente donc le nombre de spermatogonies, en augmentant la prolifération des cellules de Sertoli et ainsi leur capacité à nourrir les cellules germinales. De même, chez des patients présentant une mutation inactivatrice du récepteur de la FSH, on observe une

réduction de la taille des testicules mais sans azoospermie, certains patients sont même fertiles (Huhtaniemi *et al.*, 1998 ; Tapanainen *et al.*, 1997).

La testostérone semble, elle, indispensable au maintien de la spermatogenèse. Les souris déficientes en récepteurs des androgènes fonctionnels (ARKO et *tfm*) présentent une perte des spermatocytes qui échouent à réaliser la méiose (O'Shaughnessy *et al.*, 2012 ; De Gendt *et al.*, 2004). Par ailleurs, des expériences d'hypophysectomie chez le rat ou de souris déficientes en gonadotrophines montrent une forte diminution du poids testiculaire ainsi d'une dégénérescence de certaines cellules germinales (spermatocytes en pachytène et spermatides rondes principalement) conduisant à une stérilité. L'injection de LH ou de testostérone juste après l'hypophysectomie permet de restaurer une spermatogenèse (Huang *et al.*, 1987 ; Sun *et al.*, 1989 ; Pakarainen *et al.*, 2005). L'administration de FSH seule ne maintient pas la spermatogenèse chez ces animaux mais si elle est injectée avec de la testostérone ou de la LH, elle augmente l'effet de la testostérone seule (Russell *et al.*, 1998). La FSH et la testostérone semblent donc agir en synergie pour contrôler la spermatogenèse bien qu'elles semblent posséder chacune un rôle physiologique spécifique.

L'invalidation des récepteurs des androgènes dans les cellules péritubulaires myoïdes (souris PTM-AKO) se traduit par une diminution du nombre de spermatocytes et de spermatides ainsi que par une perte progressive des spermatogonies (Welsh *et al.*, 2009). Les androgènes maintiennent donc la spermatogenèse en agissant sur les cellules péritubulaires myoïdes, même si cet effet se fait probablement via les cellules de Sertoli car la fonction de ces cellules est perturbée chez ces souris.

Néanmoins, d'autres hormones interviennent dans le contrôle endocrine de la spermatogenèse, comme, par exemple : l'hormone de croissance (Bartlett *et al.*, 1990), la prolactine (Takase *et al.*, 1990), les hormones thyroïdiennes qui augmentent le nombre de cellules de Sertoli (Kumar *et al.*, 2014), l'ocytosine (Assinder *et al.*, 2002), l'insuline et l'IGF qui contrôlent la prolifération des cellules de Sertoli immatures (Pitetti *et al.*, 2013).

Plus précisément, l'épithélium séminifère à certains stades de développement semble dépendant de FSH tandis qu'à d'autres stades, l'épithélium semble dépendant de la testostérone. En effet, l'expression des récepteurs des androgènes des cellules de Sertoli varie en fonction du cycle de l'épithélium séminifère. Chez le rat, l'expression des récepteurs des androgènes la plus forte est retrouvé au stade VII, qui serait donc le stade le plus sensible à la testostérone (Kerr *et al.*, 1993). L'épithélium séminifère alterne donc la dépendance à FSH et à la testostérone au cours de leur développement.

### 3. Régulation paracrine de la spermatogenèse

En plus d'être régulées par les hormones, les fonctions des différentes cellules du testicule sont soumises à une régulation paracrine au cours de la spermatogenèse. On appelle facteur de régulation paracrine un facteur produit par un type cellulaire et qui régule (prolifération ou différenciation) un autre type cellulaire adjacent au sein du même organe. Le testicule, de par son architecture complexe, est typiquement le genre d'organe cible à régulation paracrine. La cellule de Sertoli a, comme décrit précédemment, plus particulièrement un rôle primordial dans la régulation de la spermatogénèse car elle se localise entre le milieu interstitiel et la lumière du tube séminifère, en contact avec les différents types cellulaires du testicule. Il existe un nombre important d'interrelations spécifiques entre ces différents types cellulaires au sein du testicule. On s'intéressera à trois d'entre elles : cellules de Sertoli et cellules germinales, cellules de Leydig et cellules de Sertoli, cellules péritubulaires et cellules de Sertoli.

- L'élément de régulation paracrine principal des cellules de Leydig sur les cellules de Sertoli est la production de testostérone qui stimule la sécrétion par les cellules de Sertoli de différents facteurs comme l'ABP (Androgen Binding Protein) ou la transferrine. Réciproquement, les cellules de Sertoli jouent un rôle sur les cellules de Leydig. En effet, en cas de fonctionnement anormal des cellules de Sertoli (déficience en vitamine A, par exemple), la morphologie des cellules de Leydig est altérée. La cellule de Sertoli sécrète donc une substance régulant les cellules de Leydig. Cette substance peut être les œstrogènes, l'IGF-1, le TGF $\alpha$ , le TGF $\beta$ , l'IL-1 ou encore l'inhibine.

- Les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires sont séparés par la membrane basale du tube séminifère et présentent de nombreuses interactions, principalement de type coopératif. Elles collaborent ensemble pour produire la matrice extracellulaire. *In vitro*, les cellules péritubulaires seules en culture monocouche nécessitent l'addition de sérum dans le milieu de culture pour survivre alors que des cultures des cellules de Sertoli avec les cellules péritubulaires survivent pendant plusieurs mois et on observe la production d'une matrice extracellulaire sous forme d'agrégats (Skinner *et al.*, 1985). De la même façon, la présence de cellules péritubulaires en culture augmente la survie des cellules de Sertoli et leur permet une sécrétion de transferrine, d'ABP ou d'inhibine (Skinner *et al.*, 1985). Ainsi, les cellules péritubulaires sécrètent des facteurs de croissance, tels que IGF-1, GF $\alpha$ , TGF $\beta$  et de l'activine qui ont un effet paracrine sur les cellules environnantes et notamment les cellules de Sertoli (Maekawa *et al.*, 1996 ; Verhoeven *et al.*, 1995). Les cellules péritubulaires produisent également, sous le contrôle des androgènes, le facteur P-Mod-S pouvant réguler la fonction et la différenciation des cellules de Sertoli. Les androgènes pourraient donc avoir un effet sur les fonctions testiculaires via les cellules péritubulaires (Norton *et al.*, 1989).

Enfin, puisqu'elles sont impliquées dans le contrôle et le maintien des fonctions des cellules de Sertoli, les cellules péricubulaires contrôlent donc indirectement sur la spermatogenèse.

- Les cellules de Sertoli sécrètent un grand nombre de protéines pouvant réguler les fonctions des cellules germinales (multiplication, différenciation et métabolisme) ou pouvant être aussi des protéines de transport, de liaison, des protéases ou antiprotéases et des composants des complexes jonctionnels (La reproduction animale et humaine, Quae 2014, Chapitre 5, Jégou, Rolland et Albert). Ces facteurs sont produits de façon bidirectionnelle : soit exportés vers la lumière du tube séminifère, soit produits vers la membrane basale. Le compartiment de sécrétion, adluminal ou basal, définit la cellule qui sera ciblée par les différents facteurs de régulation. Les facteurs libérés dans le compartiment adluminal peuvent ainsi réguler les cellules germinales en méiose (spermatocyte) ou en spermiogénèse (spermatides, spermatozoïdes) tandis que les facteurs sécrétés dans le compartiment basal peuvent réguler les cellules interstitielles ainsi que les cellules germinales préméiotiques (spermatogonies et spermatocytes jusqu'en pré-leptotène).

Si les cellules de Sertoli ont un rôle très important dans la régulation des cellules germinales, ces dernières jouent également un rôle dans la régulation de certaines fonctions des cellules de Sertoli. Le dialogue est donc bidirectionnel. Les cellules germinales peuvent agir principalement de trois façons différentes : via des molécules membranaires (Cell Adhesion Molecules et Substrate Adhesion Molecules), via le transfert de matériel cellulaire ou via la sécrétion de protéines. Comme décrit précédemment, les spermatogonies présentent des pseudopodes qui pourraient être phagocytés par les cellules de Sertoli et permettraient ainsi une interaction entre ces deux types cellulaires. Cependant, le mécanisme majeur de contrôle par transfert de matériel cellulaire concerne la phagocytose des corps résiduels pendant la spermiation. La phagocytose de ces structures germinales active la production d'interleukine-1 $\alpha$  et 6 par la cellule de Sertoli (Syed *et al.*, 1993). Cette phagocytose semble donc réguler les fonctions de sécrétion des cellules de Sertoli. Par ailleurs, la phagocytose des corps résiduels est réalisée au stade de l'épithélium séminifère précédant le stade correspondant à la division des spermatogonies et à l'initiation de la méiose au sein du cycle de l'épithélium séminifère. Elle aurait donc un rôle clé dans la coordination du cycle de l'épithélium. Les cellules germinales peuvent également réguler les fonctions des cellules de Sertoli par la sécrétion de protéines. En effet, l'utilisation *in vitro* de milieux conditionnés à partir de différentes cellules germinales a montré qu'il existait des protéines sécrétées par ces cellules germinales capables d'inhiber ou de stimuler certaines fonctions des cellules de Sertoli comme la sécrétion d'ABP, de transferrine ou encore d'inhibine (Gerard *et al.*, 1993). De plus, les cellules germinales sécrètent des facteurs de croissance spécifiquement selon le stade de développement de l'épithélium séminifère. Ces facteurs de croissance pourraient avoir un rôle dans la régulation

paracrine des cellules de Sertoli sur les cellules germinales. Parmi ces facteurs est décrit le NGF (Nerve Growth Factor), sécrété par les spermatocytes au stade pachytène et les spermatides rondes (Ayer-Lelievre *et al.*, 1988). On trouve également le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) exprimés également dans les spermatocytes au stade pachytène et les spermatides rondes. Leurs récepteurs sont eux exprimés par les cellules de Sertoli induisant une régulation paracrine des cellules germinales sur les cellules de Sertoli (De *et al.*, 1993).

La régulation de la spermatogenèse fait donc intervenir de multiples voies hormonales et paracrines et les cellules de Sertoli jouent un rôle central dans cette régulation en étant en relation avec les autres types cellulaires du testicule.

## **B. Piwi interacting RNA**

Chez les mammifères, les cellules germinales et les embryons en développement subissent une reprogrammation épigénétique à l'échelle du génome qui nécessite l'effacement et le ré-établissement du patron des marques épigénétiques. Ces marques sont constituées de la méthylation de l'ADN sur les dinucléotides CpG, des modifications des histones, de l'inactivation du chromosome X (permettant l'expression monoallélique de nombreux gènes liés à l'X chez la femelle) et des empreintes génomiques (permettant l'expression monoallélique de certains gènes de façon spécifique selon l'origine parentale de l'allèle).

La méthylation globale de l'ADN est un phénomène dynamique au cours de la vie des mammifères. On assiste à une première vague de déméthylation globale de l'ADN génomique peu de temps après la fécondation (0,5jpc chez la souris). Le génome d'origine maternel est déméthylé de façon directe et passive tandis que les méthylcytosines du génome d'origine paternel, dans le pronucléus, sont converties en hydrométhylcytosines qui seront rapidement éliminées (Hales *et al.*, 2011). Au stade 4 cellules, le niveau de méthylation de l'ADN est égal pour les deux génomes parentaux (Hales *et al.*, 2011). A 3,5jpc, le point de méthylation le plus faible est atteint dans la masse cellulaire interne de l'embryon.

Après cela, au moment de l'implantation, vers 4,5jpc chez la souris, le génome subit une méthylation *de novo* globale. La méthylation est presque complète à 6,5jpc. A cet instant, les cellules destinées à être des cellules somatiques continuent à se développer et maintiennent un niveau de méthylation globale élevé. Les autres cellules s'orientent vers un destin de cellules germinales et se spécifient en CGP. Elles initient une phase de déméthylation globale de l'ADN au moment de leur migration dans les crêtes génitales. Le génome des CGP est pratiquement complètement déméthylé (seuls 7% des CpG restent méthylés) vers 12,5jpc ce qui permet l'établissement d'un patron de méthylation spécifique des gamètes (Popp *et al.*, 2010).

Pendant la période de déméthylation, les transposons perdent également leur marques d'inhibition, les cellules germinales sont alors vulnérables à l'invasion de leur ADN par les éléments transposables. On détecte en effet une expression des rétrotransposons dans les gonocytes et les ovocytes en croissance.

Les cellules germinales, spermatozoïdes et ovocytes, sont des cellules hautement spécialisées dont l'expression génique diffère car elles présentent un patron de méthylation distinct (Morgan *et al.*, 2005).

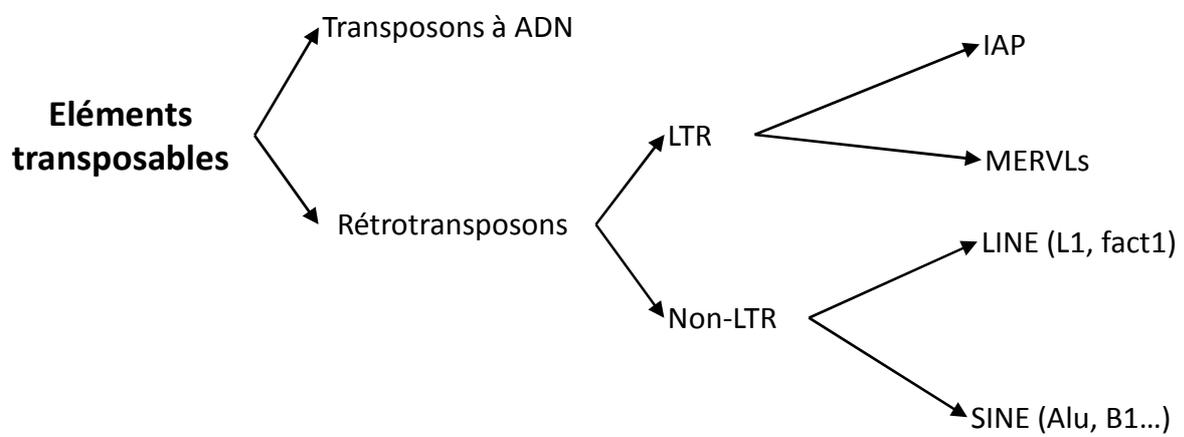
La mise en place de la méthylation dans les cellules germinales ne se fait pas en même temps chez le mâle et la femelle. Chez la femelle, les empreintes de méthylation ne sont acquises qu'après la naissance, vers 10-25jpc, dans les ovocytes en croissance (Saitou *et al.*, 2012). Dans les cellules germinales mâles, la méthylation des gènes à empreinte et des séquences répétées se met en place dans les prospermatogonies, vers 15,5-17,5jpc (Saitou *et al.*, 2012). La méthylation est complète après la naissance, avant le stade pachytène de division méiotique (Oakes *et al.*, 2007).

Les éléments transposables sont des séquences répétées mobiles capables de transporter ou d'amplifier du matériel génétique d'un endroit du génome à un autre, par un mécanisme de copier/coller ou de couper/coller, ce qui altère l'information et l'organisation du génome. Les éléments transposables représentent approximativement 37% du génome murin et environ 45% du génome chez l'homme (Waterston *et al.*, 2002 ; Lander *et al.*, 2001).

Les éléments transposables sont responsables d'un remodelage des génomes au cours de l'évolution de par leur grand nombre (ils constituent environ la moitié du génome des mammifères) et leur mobilité. Cependant, la majorité des éléments transposables est inactive car ils sont mutés ou tronqués, on dit qu'ils sont à l'état d'ADN fossile. Les éléments transposables restant sont actifs ou peuvent être réactivés et ainsi continuer de s'amplifier ce qui provoque l'apparition de nouvelles copies de transposons dans le génome. Les transposons sont répandus chez les procaryotes, les eucaryotes et les archées. Et leur nombre augmente au cours de l'évolution, les organismes supérieurs ont une proportion plus importante de copies de transposons dans leur génome (45% chez l'humain, 5% chez le poulet et 10% chez la drosophile) (Sela *et al.*, 2010).

Des mécanismes de défense contre l'action négative et l'expansion des éléments transposables sont donc nécessaires.

On distingue deux catégories d'éléments transposables, selon leur mécanisme de déplacement ou d'amplification : les transposons à ADN et les rétrotransposons médiés par l'ARN.



**Figure 15 : Les différents types d'éléments transposables**

LTR : Long Terminal Repeat Sequence

IAP : Intracisternal A-type particle

MERVLs : Mouse Endogenous RetroVirus Like

LINE : Long Interspersed Nuclear Element

SINE : Short Interspersed Nuclear Element

- Les transposons à ADN (Classe II) se déplacent d'un site à l'autre de l'ADN en utilisant une transposase puis une protéine de réparation pour être « couper/coller » ailleurs dans le génome (Revue : Feshotte et Pritham, 2007).

- Les rétrotransposons (Classe I) s'amplifient eux-mêmes à partir d'un intermédiaire ARN. Un locus portant des séquences de rétrotransposons est transcrit pour donner des ARNs intermédiaires qui subissent à leur tour une transcription inverse pour donner de l'ADN capable de se transposer à une nouvelle position du génome via une intégrase. Il s'agit donc d'un mécanisme de type « copier/coller ».

### **1. Les éléments transposables à ARN**

Les rétrotransposons peuvent être classés en trois sous-classes, selon leur structure : Les rétrotransposons long terminal repeat (LTR), les non-LTR autonomes long interspersed elements (LINEs) et les non-LTR non autonomes short interspersed elements (SINEs) (Chuma and Nakano, 2012) (**Figure 15**).

Les LTR sont analogues aux rétrovirus de par leur mécanisme d'action car, de la même façon, ils codent pour la protéine Gag (groupe spécifique antigène) et Pol (reverse transcriptase). Cependant, ils ne codent pas pour la protéine Env, nécessaire à la formation de l'enveloppe rétrovirale. Les LTR représentent 8 à 10% du génome des mammifères mais ils sont principalement inactifs chez l'homme. On trouve des copies actives chez la souris, les IAPs (intracisternal A particles) par exemple. Ils sont encadrés de longues séquences en répétitions, d'où leur nom de LTR (Deininger *et al.*, 2003).

Les LINEs présentent un promoteur interne en 5'UTR et un signal de poly-Adénylation en 3'UTR. Ils présentent deux cadres de lecture ouverts (ORF, *Open Reading Frame*) : ORF1 codant pour une protéine de liaison à l'ARN et ORF2 codant pour une protéine à domaines d'endonucléase et de transcription inverse (Kazazian *et al.*, 2004). Les LINEs sont les rétrotransposons les plus abondants dans les génomes des Mammifères. L1 est le type de LINEs le plus commun puisqu'on le retrouve à environ 500 000 copies dans les génomes mammaliens dont 100 copies pleines longueurs chez l'homme et 3000 copies actives chez la souris.

Les SINEs sont courts et ils ne codent pas pour des protéines fonctionnelles. Ils sont d'ailleurs incapables de transposer avec leur propre machinerie, ils utilisent donc les protéines des LINEs (principalement ORF2) pour fonctionner. Le SINE le plus abondant chez l'homme est Alu qui représente environ 10% du génome. Chez la souris, les SINEs les plus importants sont B1 et B2 qui représentent 2-3% du génome murin (Kramerov et Vassetzky, 2005).

## 2. Contrôle des rétrotransposons

La proportion des éléments transposables varie en fonction des espèces et nécessite une régulation fine. La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont des modifications épigénétiques qui interviennent dans la régulation des éléments transposables chez de nombreuses espèces. La méthylation de l'ADN génomique est une modification chimique des cytosines de l'ADN. Elle est contrôlée par des DNMT (*DNA methyl transferase*). L'une de ces enzymes, la DNMT1 de maintenance, agit pour réprimer les transposons et son invalidation chez la souris se traduit par une létalité embryonnaire (Li *et al.*, 1992). DNMT3a et DNMT3b sont étroitement liées et sont considérées comme étant des méthyltransférases *de novo*, c'est-à-dire nécessaire à l'établissement du patron de méthylation génomique (Okano *et al.*, 1999) ; l'invalidation de *Dnmt3a* se traduit par une absence de cellules germinales chez le mâle tandis que l'invalidation de *Dnmt3b* cause une létalité embryonnaire par déméthylation de l'ADN (Okano *et al.*, 1999). DNMT3L, qui n'a pas d'activité catalytique démontrée *in vitro*, a un rôle plus spécifique dans la régulation des rétrotransposons des cellules germinales (Bourc'his et Bestor, 2004). Ces mécanismes sont épigénétiques et transmettent donc l'inactivation des éléments transposables aux cellules filles.

Les modifications d'histones jouent également un rôle essentiel dans la répression épigénétiques des éléments transposables. C'est le cas de la modification répressive de type diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 qui réprime l'expression des rétrotransposons (Di Giacomo *et al.*, 2013).

En réponse au danger représenté par les rétrotransposons, le génome a mis en place un mécanisme de répression génique post-transcriptionnel basé sur des petits ARNi (ARN interférant). Ce mécanisme est relayé par des *small non coding RNA* (sncRNA) qui guident les protéines Argonaute afin de cliver ou de supprimer la transcription d'ARNs cibles complémentaires. Les protéines Argonaute sont caractérisées par leurs domaines PAZ, MID et PIWI (Song *et al.*, 2004). Le domaine PAZ reconnaît l'extrémité 3' des petits ARNs tandis que le domaine MID reconnaît leur extrémité 5'. Le domaine PIWI contient un motif catalytique conservé de type aspartate-aspartate-glutamate qui permet une activité nucléase (Song *et al.*, 2004). Les protéines Argonautes se divisent en deux sous-familles : les Ago et les Piwi (*P-element induced wimpy testis*).

Les Ago sont des protéines plutôt ubiquitaires, elles sont retrouvées dans les organismes pluricellulaires. Elles interagissent avec les miARNs et les siARNs, des ARNs non-codant (ncARNs) de 21-22 nt de long environ. Les ncARNs ne sont pas traduits en protéines, ils régulent l'expression de gène en agissant par appariement de bases complémentaires avec leur ARNs cibles. De leur côté, les PIWI ne sont exprimées que dans les gonades animales et s'associent avec des ARNs de 24 à 30 nt de long, les piARNs (Piwi-interacting RNA), afin de contrôler les rétrotransposons au niveau

<b>Souris</b>	<b>Homme, bovidés</b>
MIWI	PIWI L1
MILI	PIWI L2
-	PIWI L3
MIWI2	PIWI L4

**Figure 16: Les différentes protéines Piwi chez la souris et leurs orthologues humains et bovins**

transcriptionnel et post-transcriptionnel au cours du développement de la lignée germinale. La voie des Piwi est conservée au cours de l'évolution et joue un rôle crucial dans la suppression des rétrotransposons (Grimson *et al.*, 2008).

Chez l'homme et l'ovine, on distingue quatre protéines PIWI : PiwiL1, PiwiL2, PiwiL3 et PiwiL4 (**Figure 16**). Chez la souris, on distingue trois protéines PIWI : Miwi, Mili et Miwi2 qui sont exprimés dans les cellules germinales mâles avec des patrons d'expression séquentiels et superposés durant la spermatogenèse (**Figure 18, a**) (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001 ; Carmell *et al.*, 2007 ; Deng *et al.*, 2002). Chez la souris, Mili est exprimée dans les cellules germinales fœtales au moment de la différenciation du sexe vers 12.5jpc et son expression se poursuit jusque dans les spermatides rondes précoces. Pour le moment, peu d'études sur les Piwi ont été réalisées chez la femelle et seul Mili est exprimé dans l'ovaire fœtal murin (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001). Miwi2 est exprimée dans les spermatogonies et jusqu'en périnatal (vers 15.5jpc jusqu'à 3jpp), au stade correspondant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la méthylation *de novo* des CGPs (Carmell *et al.*, 2007). Les deux autres protéines ont un profil d'expression plus restreint. Miwi est exprimé le plus tardivement, puisque son expression ne commence que dans les spermatocytes en pachytène puis elle se poursuit jusque dans les spermatides allongées (Deng *et al.*, 2002). La protéine MIWI apparaît à 14jpp au stade pachytène puis on la retrouve jusque dans les spermatides rondes des stades V-VII de l'épithélium séminifère ; elle est particulièrement abondante dans les spermatocytes en diplotène (Stade XI de l'épithélium séminifère) (Deng *et al.*, 2002).

Chez les Mammifères, les piARNs sont exprimés de façon majoritaire dans la lignée germinale mâle, même si des piARNs ont également été détectés dans les ovocytes en développement (Watanabe *et al.*, 2006). Une étude récente par séquençage a également montré la présence de piRNA-like RNAs (piARNs) dans les cellules somatiques (Ortogerro *et al.*, 2014).

Les piARN, sont très diversifiés (1 million de séquences uniques et peu conservées entre espèces) et faiblement exprimés. Les piARNs sont retrouvés dans toutes les espèces qui ont été étudiées pour le moment (Drosophile, poissons, mammifères), ils apparaissent donc très tôt au cours de l'évolution ce qui suggère qu'ils ont un rôle majeur dans la lutte contre l'expression des éléments transposables. Les piARNs font 24 à 33 nucléotides de long, ils sont donc légèrement plus grands que les siARNs (21 nt) et les miARNs (22 nt). La biogenèse des piARNs est différente de celle des miARN et des siARN. Les miARN sont maturés à partir de structures en tige boucle, les siARNs nécessitent la présence de double brin d'ARNs et les piARNs sont issus de longs précurseurs d'ARNs simple brin. Contrairement aux autres ARNi, les piARNs sont synthétisés par un mécanisme indépendant de Dicer (Vagin *et al.*, 2006).

Des études par séquençage (Brennecke *et al.*, 2007) ont montré que les millions de piARNs différents provenaient d'un nombre limité de locus, une centaine chez les mammifères. Ces clusters mesurent quelques kilobases à plus de 100kilobases de long. De plus, ces loci sont principalement localisés dans des régions riches en répétitions ou dans des régions intergéniques. Chez la souris, au sein d'un cluster, les séquences de piARNs peuvent être issus de l'un ou de l'autre brin sans chevauchement. Une base de donnée regroupant les piARNs chez l'humain, la souris et le rat fournit les annotations des piARNs selon leur localisation dans les gènes, dans les régions intergéniques, les 5'UTR, 3'UTR ou les régions répétées ainsi que les caractéristiques des différents clusters (Sarkar *et al.*, 2014).

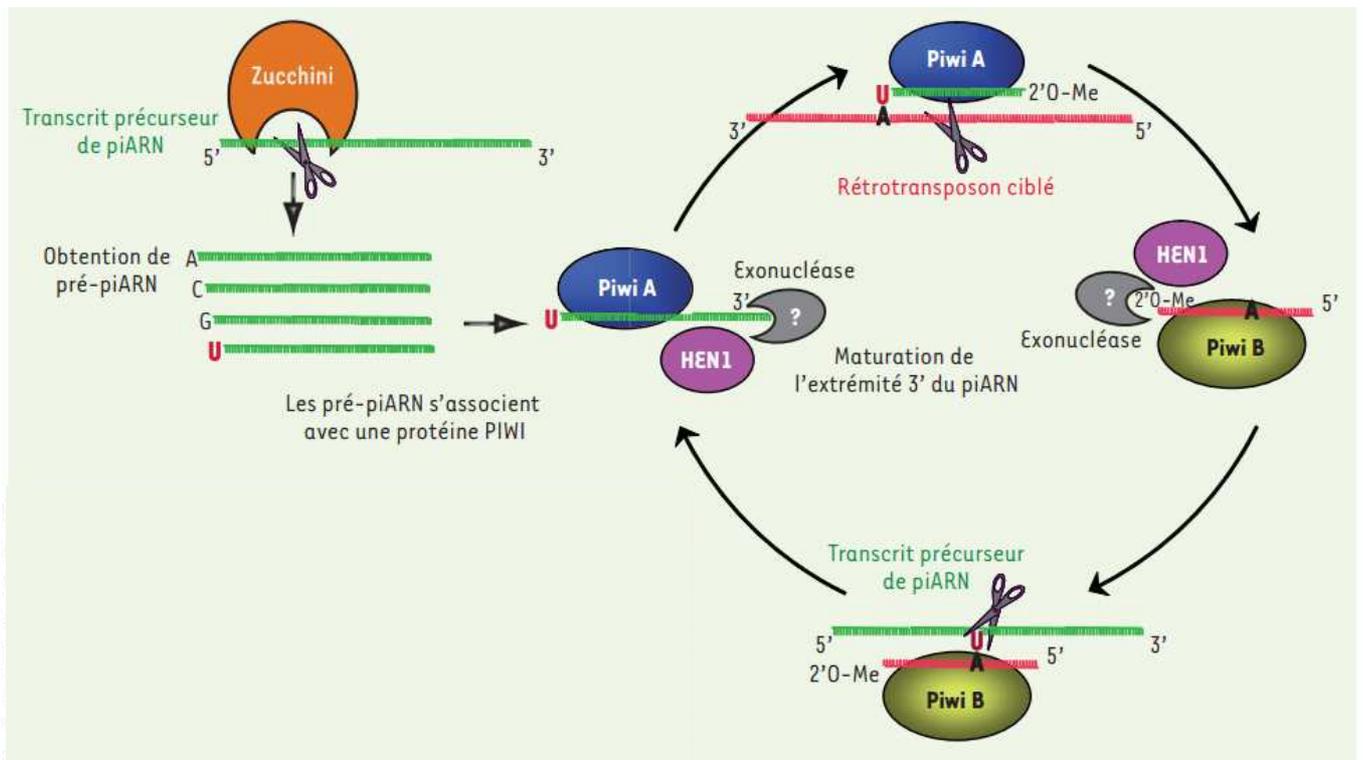
Les piARNs peuvent être classés en trois sous-population selon leur moment d'expression : pré-pachytène foetal/prénatal, pré-pachytène post-natal ou pachytène (Gan *et al.*, 2011).

Chez la souris, au stade pro-spermatogonie, MILI et MIWI2 se lient aux piARNs foetaux qui dérivent majoritairement de transposons. MILI se lie préférentiellement à des piARNs qui sont sens des éléments transposables tandis que MIWI2 se lie aux piARNs qui sont antisens (Aravin *et al.*, 2008). Une petite partie (3%) des piARNs pré-pachytène foetaux dérivent d'exons de gènes codant pour des protéines (Aravin *et al.*, 2008).

Les piARNs pré-pachytène post-nataux sont liés par MILI, la seule protéine PIWI exprimée entre la naissance et la méiose. Les piARNs pré-pachytène post-nataux présentent les mêmes caractéristiques que les piARNs foetaux mais avec une proportion plus grande (20%) de piARNs dérivant d'exons de gènes codant pour des protéines (Aravin *et al.*, 2008).

Pendant le stade pachytène de méiose I, le taux de piARNs augmente fortement ainsi que dans les spermatides rondes post-méiotiques. Ces piARNs spécifiques du stade pachytène sont issus en partie d'éléments transposables mais sont enrichies en séquences intergéniques, non annotées, appelées clusters de piARNs. Les piARNs de pachytène s'associent avec les protéines MILI et MIWI.

La taille des piARNs est déterminée par l'encombrement stérique de chaque protéine PIWI : 26 nucléotides de long pour Mili, 28 nucléotides pour Miwi2 et 29-30 nucléotides pour Miwi. Ainsi, les protéines PIWI interagissent avec des piARN de taille et de nature différente (Chuma et Nakano, 2012).



**Figure 17 : Modèle théorique de la biogenèse primaire des piARNs et de l'amplification par cycle ping-pong (Muller *et al.*, 2013)**

L'endonuclease Zucchini est responsable de la maturation de transcrits portant les *clusters* de piARN. Les pré-piARN sont reconnus par une protéine PIWI (ici PiwiA), qui a une préférence pour les séquences présentant un U en 1<sup>ère</sup> position. Associés à PiwiA, les pré-piARN subissent ensuite une maturation par une exonuclease 3'—5', ainsi que par HEN1 qui apporte un groupement méthyl en 2'0 de l'extrémité 3', ce qui les rend fonctionnels. Les piARN primaires ainsi générés peuvent s'engager dans le cycle ping-pong. Par complémentarité de séquence, le piARN primaire dirige le clivage du rétrotransposon cible (brin sens ou antisens) par la protéine PiwiA qui porte l'activité endonucléase. La nouvelle extrémité 5' générée est reconnue par une autre protéine PIWI (ici PiwiB) ou par une protéine Piwi identique à la première. L'extrémité 3' du piARN secondaire est maturée et modifiée de la même façon que celle du piARN primaire. Le piARN secondaire peut diriger l'activité de clivage de PiwiB sur le transcrit portant les *clusters* de piARN, générant ainsi un nouveau piARN secondaire dont la séquence est identique au piARN primaire, et ainsi de suite. Les piARN dont l'extrémité 5' est générée par l'action de Zucchini sont appelés piARN primaires, alors que les piARN dont l'extrémité 5' est générée par les protéines PIWI sont appelés piARN secondaires. De cette façon, les piARN notés A10 représentent des piARN secondaires tandis que les piARN U1 peuvent être primaires ou secondaires.

### 3. Biogenèse des piARNs

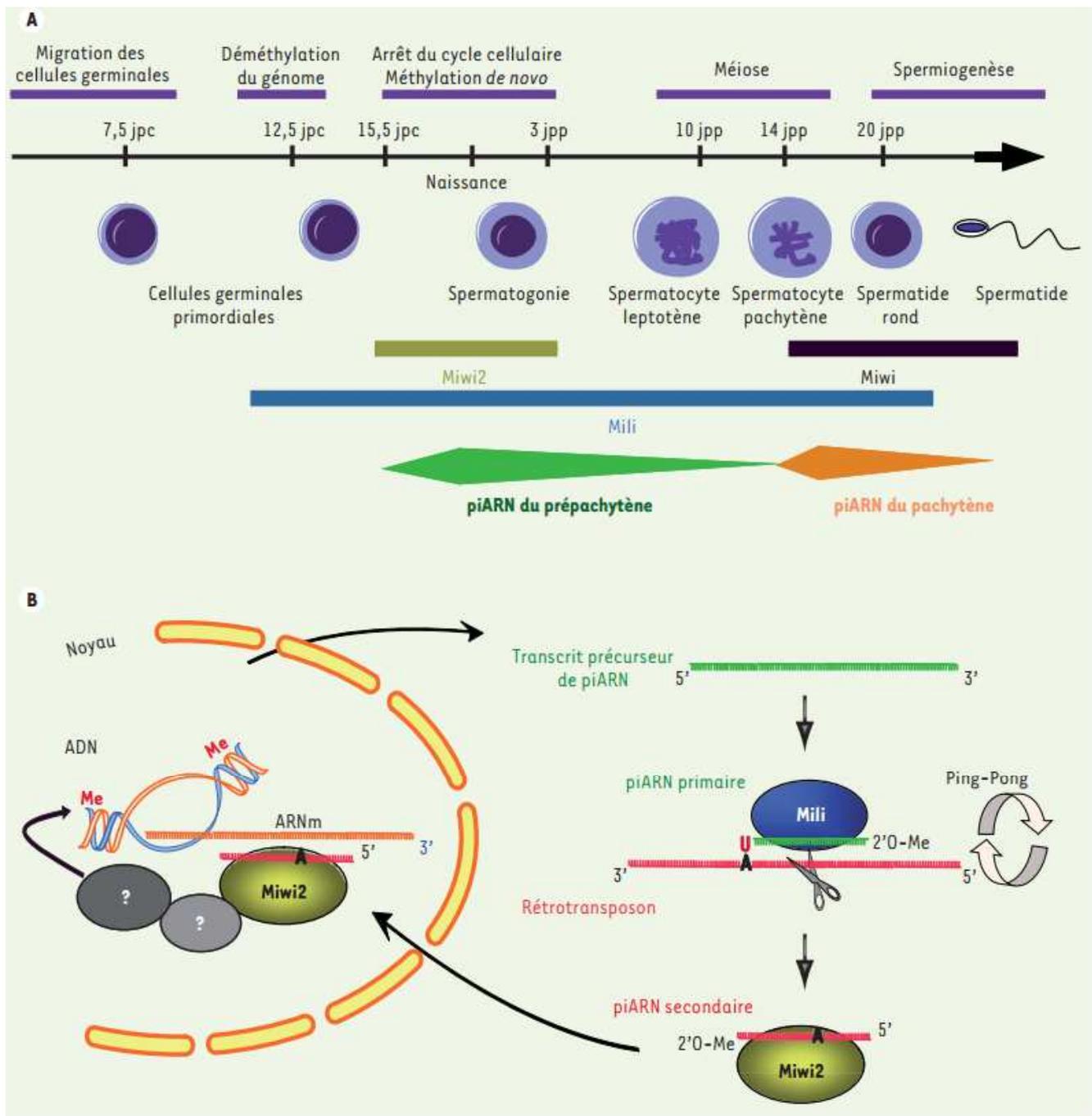
Chez la souris, les piARNs du pré-pachytène sont générés par un mécanisme primaire suivi d'un mécanisme secondaire consistant en une boucle d'amplification. Pour commencer, le cluster de piARNs est transcrit par l'ARNpol II afin de générer un long transcrit simple brin avec une coiffe 5' et poly-adénylé appelé piARN précurseur (Li *et al.*, 2013) (**Figure 17**).

La première étape est réalisée par une endonucléase Mitopl1d (également appelée Zucchini chez la *Drosophile* ou Pld6) qui coupe le transcrit précurseur de piARN en formant un pré-piARN (ou piARN intermédiaire) avec une extrémité en 5' portant un groupe phosphate (Nishimasu *et al.*, 2012). Ce pré-piARN ainsi obtenu est reconnu et lié par la protéine MILI qui a une préférence pour les séquences présentant un U en première position 5'. Le pré-piARN, associé à MILI, subit ensuite une maturation de son extrémité 3' par une exonucléase 3'-5' pour produire une extrémité OH. De plus, une enzyme HEN1 (Hua enhancer) apporte un groupement 2'O-méthyl sur l'extrémité 3' du pré-piARN (Saito *et al.*, 2007). Cette méthylation pourrait avoir un rôle dans la protection du piARN. Ces maturations aboutissent à un piARN fonctionnel dit piARN primaire d'une taille réduite à 21-30 nucléotides.

Les piARNs primaires s'engagent ensuite dans un cycle d'amplification « ping-pong ». Par complémentarité de séquence, totale ou partielle, le piARN dirige le clivage de l'ARNm d'un rétrotransposon cible. Le clivage est réalisé par l'activité endonucléase portée par la protéine MILI. La protéine PIWI clive l'ARN cible entre les nucléotides en 10 et 11<sup>ème</sup> position (Gunawardane *et al.*, 2007). Une nouvelle extrémité 5' est ainsi générée sur l'ARNm du rétrotransposon qu'on appelle alors pré-piARN secondaire.

L'extrémité 5' du pré-piARN secondaire est reconnue par une protéine PIWI, MILI ou MIWI2. Si le piARN secondaire est lié par MILI, l'extrémité 3' du piARN secondaire est alors maturée et modifiée de la même façon que pour le piARN primaire, c'est-à-dire avec une exonucléase et HEN1. Le piARN secondaire dirige MILI sur le transcrit précurseur de piARN ce qui génère un nouveau piARN secondaire dont la séquence est identique au piARN primaire. Ce piARN secondaire peut à son tour diriger le clivage d'un autre rétrotransposon cible et ainsi de suite, ce qui constitue l'amplification « ping-pong » (De Fazio *et al.*, 2011).

Si le piARN secondaire est lié par la protéine MIWI2 alors la protéine MIWI2 est transloquée au noyau avec le piARN secondaire et guide la méthylation de la séquence génomique des rétrotransposons. Cette marque épigénétique est une marque à long terme. MIWI2 n'ayant pas d'activité endonucléase, elle ne peut pas participer au mécanisme « ping-pong ».



**Figure 18 : Rôle des piARNs dans l'inactivation des rétrotransposons chez la souris (Muller *et al.*, 2013)**

- A. Expression des protéines PIWI et des piARN au cours de la spermatogenèse de souris. *Jpc* : jours post-coïtum. *Jpp* : jours *post-partum*.
- B. Biogenèse et fonction des piARN du pachytène. Après export du noyau, le transcrit portant les clusters de piARN génère des piARN primaires qui s'associent avec Mili. L'endonucléase de Mili clive sa cible pour donner naissance à un piARN secondaire. Un cycle ping-pong entre deux protéines Mili peut amplifier la production de piARN secondaires. Le piARN secondaire associé à Miwi2 peut entrer dans le noyau et guider la méthylation de l'ADN des rétrotransposons en s'appariant à un transcrit en cours d'élongation pour recruter une machinerie encore inconnue conduisant à la modification des histones et à la méthylation de l'ADN.

En pré-pachytène, il existe donc une répression post-transcriptionnelle rapide des rétrotransposons par MILI et une répression épigénétique à long terme par MIWI2.

Pour résumer, les piARNs portant une extrémité 5' générée par l'exonucléase Mitopl1d sont appelés piARN primaires tandis que les piARNs avec une extrémité 5' générée par MILI sont considérés comme des piARNs secondaires. Les piARNs secondaires ont une séquence complémentaire au piARN primaire sur les 10 premiers nucléotides avec un A en position 10 car le piARN primaire présente un U en première position (Pillai et Chuma, 2012). La longueur de l'extrémité 3', et donc la longueur du piARN, est déterminé par la protéine Piwi impliquée dans sa synthèse, ce qui explique les différentes tailles des piARNs associés aux différentes Piwi.

Chez la souris, la boucle d'amplification « ping-pong » n'a lieu que lors de la biogenèse des piARNs du pré-pachytène fœtaux, lorsque les piARNs primaires sont chargés par MILI et les piARNs secondaires sont chargés par MILI et MIWI2 (Aravin *et al.*, 2008 ; De Fazio *et al.*, 2011).

Au stade pachytène, les piARNs s'associent à la protéine MIWI qui, par son activité endonucléase, réprime les rétrotransposons qui auraient échappés à la première vague de répression (**Figure 18, b**).

Chez la souris, une absence de MILI ou de MIWI2 (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004 ; Carmell *et al.*, 2007) se traduit par des défauts importants de biogenèse des piARNs fœtaux accompagnés d'une méthylation *de novo* incorrecte des loci des rétrotransposons dans les spermatogonies. Cette hypométhylation provoquerait une activation transcriptionnelle des rétrotransposons dans les spermatocytes en période post-natale aboutissant à une mort cellulaire des cellules germinales. Ce phénotype, marqué par une déméthylation des rétrotransposons et une catastrophe méiotique (mort cellulaire pendant la méiose), ressemble à celui obtenu chez les mutants pour DNMT3L (DNA-méthyl-transférase 3 L) (Bourc'his et Bestor, 2004). La méthylation de l'ADN pourrait donc être une cause majeure du phénotype des mutants Miwi2 et Mili.

Cependant, les souris invalidées pour l'activité catalytique de MIWI2 sont fertiles et présentent une répression des rétrotransposons comparable à celle des souris sauvages (De Fazio *et al.*, 2011). L'activité d'épissage de MIWI2 n'est donc pas requise pour la répression de Line1. Cependant, la répression des éléments transposables par la méthylation *de novo* de l'ADN nécessite l'activité d'épissage de MILI (Di Giacomo *et al.*, 2013).

La protéine MIWI est une protéine cytoplasmique dont l'inactivation provoque un arrêt en début de spermiogénèse. L'analyse des testicules *Miwi*<sup>-/-</sup> montre que la spermatogénèse est arrêtée avant le stade 4 de la spermiogénèse (Deng *et al.*, 2002).

#### 4. Les autres composants de la voie des Piwi

Les protéines PIWI et les piARNs sont les éléments centraux de la machinerie des piARNs mais ils n'agissent pas seuls. Ils forment avec d'autres facteurs indispensables un gros complexe ribonucléoprotéique, le piRISC, comparable au complexe RISC (*RNA induced silencing complex*) des miARNs.

- Chez la souris, les protéines PIWI interagissent avec des protéines de la famille TDRD (une classe de protéines contenant un domaine Tudor). MILI lie TDRD1, MIWI2 forme un complexe avec TDRD9 et MIWI avec TDRD6. Ces protéines TDRD constituent une plateforme d'assemblage pour former un complexe macromoléculaire via leur domaine tudor (Mathioudakis *et al.*, 2012).

Une mutation de *Tdrd1* ou de *Tdrd9* chez la souris provoque une activation du rétrotransposon LINE1 pendant la spermatogenèse accompagnée d'une absence d'activation de MILI et MIWI2 (Reuter *et al.*, 2009 et Shoji *et al.*, 2009). On observe également chez ces mutants une très forte diminution de la méthylation *de novo* du promoteur de LINE1 dans les spermatogonies. TDRD1 et TDRD9 sont donc indispensables à la régulation de LINE1 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

- L'un des composants de la voie des PIWI est aussi le facteur VASA appelé *mvh* (Mouse Vasa homolog ou Ddx4 chez la souris). La protéine VASA, à domaine hélicase à ARN, est utilisée comme nous l'avons vu précédemment comme marqueur spécifique des cellules germinales. Chez la souris, l'inactivation de *Mvh* se traduit par une augmentation de l'expression des rétrotransposons LINE1 et IAP associée à un blocage de la spermatogenèse pendant la méiose (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2010). De plus, les piARNs fœtaux ne sont pas chargés par Miwi2 et la méthylation de l'ADN est perturbée. Ces résultats suggèrent que *Mvh* est un facteur essentiel à la voie des piARNs.

- Mov10L1 (*Moloney Leukemia virus 10-like 1*, homologue de Armitage chez la drosophile) est une hélicase à ARN requise pour la biogenèse primaire des piARNs ainsi que pour la répression de LINE1 et IAP dans la spermatogenèse (Frost *et al.*, 2010). De plus, cette étude montre que MOV10L1 pouvait interagir avec MILI et MIWI (Frost *et al.*, 2010)

- Mael (*Maelstrom homolog*) est une protéine à HMG-box nécessaire à la répression de LINE1 et IAP. Sa perte de fonction provoque un défaut dans le profil d'expression des piARNs et une hypométhylation transitoire des spermatogonies précoces (Soper *et al.*, 2008).

- Le gène *Gasz* code pour une protéine à domaine ankyrin repeat et à domaine SAM (Domaine d'approximativement 70 acides aminés, pourrait jouer un rôle dans les contacts intercellulaires et les processus de signalisation (Shultz *et al.*, 1997). Il agit pour réprimer LINE1 et IAP, peut-être en stabilisant MILI et d'autres facteurs de la voie (Ma *et al.*, 2009).

Globalement, chez la souris, les mutations, avec perte de fonction, des différents éléments de la machinerie des piARNs conduisent toujours à une stérilité mâle dû à un arrêt de la spermatogenèse. On peut distinguer deux phénotypes différents selon le stade à laquelle s'arrête la spermatogenèse.

#### a) Arrêt en méiose

Le premier phénotype correspond à un arrêt de la méiose des spermatocytes, cet arrêt est causé par l'invalidation des gènes *Mili*, *Miwi2*, *Tdrd1*, *Tdrd9*, *Mvh*, *Mov10L1*, *Maelstrom*, *Gasz* et *MitoplD*. Lorsque ces gènes sont mutés, on observe un arrêt de la spermatogenèse au stade zygotène de méiose I avec un échec d'appariement des chromosomes homologues et une augmentation des cassures double brin. On peut avancer une explication simple à ce phénotype : la forte activité des rétrotransposons provoque des dommages à l'ADN génomique. Cette hypothèse semble être confirmée puisque, l'élimination de *Mael* dans une lignée invalidée pour *Spo11* montre que les cassures double brin persistent dans les spermatocytes, signe que les dommages à l'ADN sont indépendants de la recombinaison méiotique endogène (Soper *et al.*, 2008). Chez ces animaux mutants, la genèse des piARNs est perturbée tandis que l'expression des rétrotransposons est augmentée. De plus, on observe une méthylation *de novo* incorrecte des loci des rétrotransposons. Cette méthylation est normalement établie dans les spermatogonies après la déméthylation globale des CGPs. Ce phénotype différé peut s'expliquer si l'hypométhylation des loci des rétrotransposons dans les spermatogonies précoces est transmise aux cellules suivantes jusqu'aux spermatocytes en méiose (Chuma et Nakano, 2013). Dans ces spermatocytes, les rétrotransposons sont transcriptionnellement activés, mais réprimés chez les animaux WT alors que chez les mutants des gènes de la voie des piwi une hypométhylation conduit à la mort cellulaire. Une autre explication à ce phénotype différé pourrait être que l'hypométhylation du génome modifierait la conformation chromatidienne ce qui conduirait à une recombinaison homologue non-allélique ou à une condensation chromosomique aberrante d'où la mort cellulaire.

#### b) Arrêt en spermiogenèse

Le deuxième phénotype correspond à un arrêt plus tardif, pendant la spermiogenèse des spermatides haploïdes. On retrouve ce phénotype lors de la mutation des gènes *Miwi*, *Tdrd1* et *Tdrd5* (Deng *et al.*, 2002 ; Chuma *et al.*, 2006 ; Yabuta *et al.*, 2011). Ce phénotype est moins bien caractérisé. Les piARNs exprimés dans les spermatocytes en pachytène ou dans les spermatides ne sont pas enrichis en séquences dérivées de transposons. Ceci suggère que la voie des PIWI ne semble pas avoir de rôle sur le contrôle des transposons après la méiose. Par ailleurs, l'invalidation du gène *Miwi* provoque l'activation du rétrotransposon LINE1. MIWI est capable de cliver LINE1 afin de diminuer sa quantité et générer des piARNs par le mécanisme ping-pong (Reuter *et al.*, 2011). Cependant, cette action de MIWI est post-transcriptionnelle et n'affecte pas la méthylation des loci

apparentés aux rétrotransposons. L'inactivation de *Tdrd5* cause également un phénotype dans les spermatides rondes rappelant celui des KO *Miwi*. Cependant, en plus de ce phénotype dans les spermatides rondes, les mutants pour *Tdrd5* présentent aussi des modifications moléculaires dans les spermatogonies fœtales : l'expression de LINE1 est augmentée tandis que son locus est hypométhylé.

Les différents acteurs de la machinerie des piARNs sont confinés dans des granules cytoplasmiques (ou encore appelés Nuages) (Eddy *et al.*, 1975). Chez les mammifères, trois structures différentes rassemblent la plupart des acteurs de la machinerie des piARNs : les ciments intermitochondriaux, les corps P (ou processing bodies) et les corps chromatoïdes. Les corps chromatoïdes, périnucléaires et sans membrane, hébergent la majorité des acteurs de la machinerie des piARNs. Pour l'instant, le rôle de ces structures demeure inconnu mais elles pourraient intervenir sur la dégradation des piARNs et des protéines impliquées ou avoir un rôle de stockage des protéines de la voie des piARN afin de limiter leur action à une fenêtre temporelle précise (Muller *et al.*, 2013).

En conclusion, les études génétiques chez la souris ont permis de montrer que la voie des PIWIs est essentielle à la fertilité mâle de cette espèce. Chaque protéine de cette voie agit à des étapes distinctes de la spermatogenèse et leurs fonctions ne sont pas redondantes.

Chez la femelle, certains composants de la voie des PIWIs (*Mili*, *Tdrd9* et *Tdrd1* par exemple) ainsi que les piARNs sont exprimés dans les ovocytes de souris (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001 ; Aravin *et al.*, 2008). Pourtant, il n'y a pas de stérilité femelle ni de dégénérescence ovocytaire décrites dans les mutants invalidés pour les gènes de la voie des PIWIs. Cette absence de phénotype chez les mutants femelles pourrait être expliquée par l'action des siARNs endogènes et de la voie des ARNi canonique qui agissent pour réprimer les rétrotransposons dans l'ovocyte (Watanabe *et al.*, 2008 ; Tam *et al.*, 2008). Par ailleurs, les ovocytes murins invalidés pour le gène *Mili* présentent une augmentation modérée des rétrotransposons (Watanabe *et al.*, 2008). Ces ovocytes mutants sont malgré cela toujours fonctionnels et fécondables. On peut donc faire l'hypothèse que les ovocytes invalidés pour les gènes impliqués dans la voie des PIWIs peuvent être affectés mais à un niveau inférieur au seuil létal pour l'ovocyte. Il pourrait également exister des phénomènes de compensation chez les femelles.

## **Objectifs de la thèse**

## Contexte / Objectifs de la thèse

L'une des thématiques de recherche du laboratoire porte sur le développement ovarien chez l'ovin qui comporte trois événements clés : la différenciation de la gonade bipotentielle en ovaire et la multiplication des cellules germinales, l'entrée en prophase I de méiose des cellules germinales et la formation des follicules ovariens. Le laboratoire travaille plus particulièrement sur les gènes impliqués dans l'ovogenèse et la mise en place précoce des follicules.

Des études précédemment menées ont montré que la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) était parfaitement adaptée pour isoler de nouveaux gènes de mammifères impliqués dans différentes étapes de l'ovogenèse. Le laboratoire a ainsi généré deux banques d'ADNc d'ovaires fœtaux ovins, dans le but de découvrir de nouveaux gènes spécifiquement exprimés au cours de l'initiation de la prophase I de méiose et de la formation des follicules. Ces banques ont été réalisées à partir de gonades femelles à 55jpc, stade correspondant à l'entrée en méiose des cellules germinales, et des gonades femelles à 82jpc, stade correspondant à l'initiation de la folliculogenèse chez l'ovin (Baillet et al., 2008). L'analyse de ces banques a mis en évidence plusieurs transcrits préférentiellement exprimés pendant la méiose, dans l'ovaire fœtal ovin. Parmi ces transcrits, des gènes présentant des profils d'expression sexe-dimorphique ou spécifique d'un stade ont été trouvés, tels que *Mov10L1*, *Tex11* et *Gtsf1* (*Gametocyte-specific factor1*). De plus, plusieurs ESTs (*Expressed Sequence Tag*) correspondant à des gènes non-annotés ont été mis en évidence. Ces ESTs ont d'abord été comparés à des ESTs préalablement identifiés dans d'autres études sur les gonades. C'est ainsi que nous avons sélectionné un EST présent dans des banques de testicules adultes humains et murins et dans des ovaires de souris à la naissance. La séquence de la protéine putative humaine correspond à cet EST possède un domaine PAZ. Le domaine PAZ, pour PIWI/Argonaute/Zwille, est un domaine conservé au cours de l'évolution, retrouvé dans les protéines impliquées dans la répression des rétrotransposons et donc le maintien des cellules germinales, chez la souris et la drosophile (Song et al., 2003 ; Yan et al., 2003 and Höck and Meister, 2008). La caractérisation de cet EST a donc été menée au laboratoire (Baillet et al., 2011).

Le gène correspondant à cet EST a été nommé *Topaz1* pour *Testis and Ovary-specific PAZ domain gene1*. Ce transcrit a été isolé et sa séquence déterminée au laboratoire par 5'RACE à partir d'ARNm d'ovaires fœtaux ovins à 60jpc et à partir de testicules murins. Le gène TOPAZ1 présente un ARNm dont la séquence codante représente 4803 bp chez l'ovin et 4962 bp chez la souris, chacun présentant 20 exons. Par homologie de séquence du gène *Topaz1* ovin dans les bases de données publiques, les gènes *Topaz1* humain et bovin ont été recherchés, ils sont également composés de 20 exons avec une ORF (phase ouverte de lecture) de 5079bp et 4960bp respectivement. Chez la souris (chromosome 9), l'ovin (chromosome 19), le bovin (chromosome 22) et l'homme (chromosome 3), le

gène *Topaz1* présente une gamme de tailles nucléotidiques identiques pour chaque exon entre les différentes espèces sauf l'exon 1, dont la taille varie considérablement entre ces quatre espèces (46 à 346 pb).

Le gène *Topaz1* code pour une protéine putative TOPAZ1 de 1600 acides aminés chez l'ovine, 1653 acides aminés dans l'espèce murine et bovine, et 1692 acides aminés chez l'homme. La protéine TOPAZ1 est hautement conservée dans la phylogénie de divers Vertébrés.

En plus du domaine PAZ, la protéine TOPAZ1 présente un domaine CCCH situé dans l'exon 8. Le domaine CCCH est un domaine de type doigt-de-zinc consistant en un motif canonique C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H mais se présentant sous forme C-X<sub>9</sub>-C-X<sub>4/5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H dans la protéine TOPAZ1 de différentes espèces.

Les protéines avec un domaine doigt de zinc de type CCCH sont des protéines de liaison à l'ARN qui présentent des fonctions de régulation à tous les stades du métabolisme des ARNm (Epissage des pré-ARNm, transport, localisation subcellulaire, stabilité, dégradation, transcription, ubiquitination ou encore poly ADP-ribosylation des ARNm). On retrouve ce domaine CCCH hautement conservé dans le gène *Topaz1* jusque chez le *zebrafish*. La présence de ces domaines PAZ et doigt de zinc dans la protéine TOPAZ1 suggère fortement un rôle dans la reconnaissance ou la liaison avec des ARNs.

Par RT-PCR semi-quantitative sur différents tissus adultes, le laboratoire a montré que *Topaz1* est exprimé spécifiquement dans les gonades ovines et murines. Des expériences de RT-qPCR ont ensuite permis de montrer que le gène *Topaz1* est préférentiellement exprimé chez les femelles pendant la vie fœtale chez l'ovine alors qu'il est majoritairement exprimé dans le testicule adulte chez la souris. Le gène *Topaz1* est donc exprimé spécifiquement dans les gonades chez le mouton et la souris mais son profil d'expression est spécifique de l'espèce.

De plus, chez l'ovine, *Topaz1* présente un profil d'expression similaire à celui d'un gène de prophase I de méiose, comme *Dmc1*.

Afin de déterminer le type cellulaire exprimant *Topaz1*, nous avons utilisé la lignée de souris invalidées pour le gène *kit* (Bernex *et al.*, 1996). Ces souris mutantes à l'état homozygote présentent une absence de migration puis de survie des CGP ce qui se traduit par des gonades sans cellules germinales. Ainsi, le laboratoire a montré qu'il n'y a pas d'expression de *Topaz1* dans les gonades mâles et femelles *kit*<sup>-/-</sup>, indiquant que *Topaz1* est spécifique des cellules germinales chez la souris.

Le profil d'expression de *Topaz1* et sa conservation élevée au cours de l'évolution suggèrent un rôle important de ce gène dans le développement gonadique. Il est donc paru nécessaire de pouvoir étudier son rôle fonctionnel. Dans ce but, une invalidation de *Topaz1* a été réalisée chez la souris par l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg).

Le gène *Topaz1* présente un domaine PAZ et est exprimé spécifiquement dans les cellules germinales, comme les gènes *Piwi*. L'invalidation chez la souris des gènes de la voie des *Piwi* se

traduit par une stérilité mâle régulièrement associée à une augmentation de l'expression des rétrotransposons. Ainsi *Topaz1* pourrait également avoir un rôle dans la voie de répression des rétrotransposons et donc son invalidation chez la souris pourrait entraîner un phénotype comparable à celui des autres gènes impliqués dans la voie des piARNs.

Mon travail de thèse a donc été de caractériser le phénotype des souris *Topaz1*<sup>-/-</sup> en répondant plus particulièrement aux questions suivantes :

- L'invalidation de *Topaz1* impacte-elle la fertilité des animaux mutés, chez les mâles et les femelles ?
- Quel est le phénotype gonadique des mutants *Topaz1*<sup>-/-</sup> d'un point de vue histologique et expression génique ?
- Dans quels mécanismes de la méiose *Topaz1* intervient-il ?

Pour cela, nous avons mis en œuvre des techniques d'histologie, d'immunofluorescence, d'hybridation *in situ* ainsi que des analyses d'expression de gènes par microarray et par RT-qPCR.

## **Article :**

# **Topaz1, a germ cell specific factor essential for male meiotic progression**

Alix Luangpraseuth-Prosper, Elodie Lesueur, Luc Jouneau, Eric Pailhoux,  
Corinne Cotinot and Béatrice Mandon-Pépin

INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Cet article est soumis à Development

## **Résultats supplémentaires**

**Tableau 1 : Protéines différentiellement exprimées dans les testicules *Topaz1+/+* (WT) et *Topaz1-/-* (KO).**

Protéines absentes dans les testicules <i>Topaz1-/-</i>				
Gène	Top Protein Description	Ttest	KO	WT
Trim35	Ubiquitin-protein Trim36	2,70E-07	0	25
Pdilt	Disulfide-isomerase-like protein of the testis Pdilt	5,02E-07	0	26
Ace	Isoform Testis-specific of Angiotensin-converting enzyme Ace	1,24E-05	0	25
Cabs1	Calcium-binding and spermatid-specific protein 1 Cabs1	1,80E-05	0	20
Ccdc103	Coiled-coil domain-containing protein 104 Ccdc104	1,91E-05	0	14
Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial Gpd2	3,36E-05	0	11
Zp3r	Zona pellucida sperm-binding protein 3 receptor Zp3r	3,36E-05	0	11
Oxct2a	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2A	4,15E-05	0	53
Acrbp	Isoform 2 of Acrosin-binding protein Acrbp	6,05E-05	0	19
Prkar2a	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha	6,51E-05	0	16
Spata19	Spermatogenesis-associated protein 20 Spata20	8,95E-05	0	92
Crat	Carnitine O-acetyltransferase Crat	1,05E-04	0	18
Sord	Sorbitol dehydrogenase Sord	1,31E-04	0	30
Lrrc45	Leucine-rich repeat-containing protein 46 Lrrc46	1,31E-04	0	10
Irgc0	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgge protein Irgc1	1,61E-04	0	37
Tcp11	T-complex protein 11 Tcp11	2,89E-04	0	26
Dctn2	Dynactin subunit 2 Dctn2	3,25E-04	0	12
Asrgl1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase Asrgl1	3,83E-04	0	27
Kif2c	Kinesin-like protein KIF2C Kif2c	4,23E-04	0	7
Vps13a	Isoform 2 of Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	4,23E-04	0	7
Txndc2	Thioredoxin domain-containing protein 2 Txndc2	5,95E-04	0	24
Odf2	Isoform 5 of Outer dense fiber protein 2 Odf3	7,25E-04	0	19
Akap4	Isoform 2 of A-kinase anchor protein 4 Akap4	1,09E-03	0	63
Pro-mAKAP82	Major sperm fibrous sheath protein Pro-mAKAP82	1,09E-03	0	63
Dynll2	Dynein light chain 2, cytoplasmic Dynll2	2,02E-03	0	18
Dynll1	Dynein light chain 1, cytoplasmic Dynll1	2,02E-03	0	18
Ppm1b	Protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta	2,02E-03	0	12
Acr	Acrosin Acr	2,02E-03	0	6
Phpt1	phosphohistidine phosphatase Phpt1	2,02E-03	0	6
Fth1	Ferritin heavy chain Fth1	2,45E-03	0	5
Pdhx	Pyruvate dehydrogenase protein X component	2,45E-03	0	5
Eif3e	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E Eif3e	2,45E-03	0	5
Ropn1	Ropporin-1 Ropn1	2,45E-03	0	5
Aspscr1	Tether containing UBX domain for GLUT4 Aspscr1	2,71E-03	0	8
Cox6b2	Cytochrome c oxidase subunit 6B2 Cox6b2	2,71E-03	0	8
Dnaja4	DnaJ homolog subfamily A member 4 Dnaja4	2,71E-03	0	8
Spaca1	Sperm acrosome membrane-associated protein 1 Spaca1	2,71E-03	0	8
Tsta3	GDP-L-fucose synthase Tsta3	5,42E-03	0	12
Adam2	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2	6,46E-03	0	27
Tdrd6	Tudor domain-containing protein 6 Tdrd6	8,90E-03	0	13

## Résultats supplémentaires

### Résultats complémentaires de l'article sur Topaz1

- Marquage à la  $\beta$ -galactosidase

Dans notre modèle de souris invalidées pour le gène *Topaz1*, les exons 1 et 2 ont été remplacés par le gène rapporteur *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase de la bactérie E coli. L'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase (hydrolyse des  $\beta$ -galactosides) est mesurée avec un substrat (X-Gal) dont l'hydrolyse donne un produit coloré bleu. La visualisation de l'activité enzymatique codée par le gène *LacZ* requiert la fixation préalable des tissus et ne peut donc pas être employée pour marquer des cellules vivantes.

Le but d'une telle construction est de pouvoir suivre l'expression de *Topaz1* à travers un marquage à la  $\beta$ -galactosidase. L'expression du gène de la  $\beta$ -galactosidase a été vérifiée par qPCR dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> et ce gène est bien exprimé dans les testicules des souris mutantes selon le même profil que le gène *Topaz1* dans des animaux normaux (Figure 19). Les premières expériences de marquage ont été réalisées sur des organes *Topaz1*<sup>+/-</sup> et des organes WT comme contrôles négatifs. Différents protocoles ont été testés :

- un protocole selon le kit commercial de la société Millipore.
- un protocole issu de Young *et al.*, 2011.
- et trois autres protocoles différents mais réalisés avec des solutions fabriquées au laboratoire.

Les différents protocoles ont été testés sur plusieurs organes (testicules, épидидyme, cerveau et rein) inclus en paraffine ou en TissueTek, avec ou sans fixation avant inclusion et à différentes températures d'incubation selon le protocole.

Les testicules présentent des marquages variables selon le protocole utilisé : dans les tubes séminifères ou dans l'espace pérیتubulaire. De plus, quel que soit le protocole de marquage utilisé, l'épididyme ainsi que le rein présentent un marquage à la  $\beta$ -galactosidase. Or, ces deux organes sont connus pour être marqués de façon non-spécifique par les substrats de la  $\beta$ -galactosidase. Par ailleurs, les contrôles négatifs (organes issus d'animaux WT) présentaient également un marquage  $\beta$ -gal, ce qui démontrait que les marquages obtenus n'étaient pas spécifiques. La coloration par la technique de marquage  $\beta$ -galactosidase a donc été abandonnée.

- Etude protéomique des testicules adultes *Topaz1*<sup>+/+</sup> et *Topaz1*<sup>-/-</sup>

Nous avons réalisé une étude LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) afin d'identifier des protéines dérégulées par l'absence de TOPAZ1 dans des testicules de souris adultes. Cette étude a été réalisée sur la plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) du centre de Jouy en Josas, à l'aide d'un ORBITRAP Discovery (ThermoFinnigan).

**Protéines sous-exprimées dans les testicules Topaz1/-**

	<b>Top Protein Description</b>	<b>Ttest</b>	<b>KO</b>	<b>WT</b>
Hyou1	Hypoxia up-regulated protein 1	4,06E-06	54	111
Sucla2	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	4,41E-06	30	48
Creld2	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 2	5,53E-06	1	16
Gpx4	Isoform Cytoplasmic of Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	6,05E-06	3	43
Fbp1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	1,18E-05	8	42
Ldhal6b	L-lactate dehydrogenase	1,28E-05	8	34
Lancl2	LanC-like protein 2	3,14E-05	1	18
Ipo5	Importin-5	3,90E-05	28	103
Txnrd3	Thioredoxin reductase 3	5,04E-05	9	44
Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	6,42E-05	7	22
Shcbp1	SHC SH2 domain-binding protein 1-like protein	7,30E-05	5	31
Fabp9	Fatty acid-binding protein 9	7,82E-05	9	39
Ddt	D-dopachrome decarboxylase	1,14E-04	11	28
Fads2	Fatty acid desaturase 2	1,31E-04	14	4
Ckap4	Cytoskeleton-associated protein 4	1,31E-04	2	12
Pgp	Phosphoglycolate phosphatase	1,40E-04	11	64
Hspa4l	Heat shock 70 kDa protein 4L	1,84E-04	154	284
Hspa4	Heat shock 70 kDa protein 4	1,84E-04	154	284
Piwil1	Piwi-like protein 1	2,08E-04	20	66
Dak	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	2,27E-04	37	77
Dnpep	Aspartyl aminopeptidase	2,80E-04	28	47
	UPF0364 protein C6orf211 homolog	2,87E-04	9	40
Sccpdh	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	3,11E-04	9	25
Tpp2	Isoform Short of Tripeptidyl-peptidase 2	3,48E-04	31	120
Cops4	COP9 signalosome complex subunit 4	3,63E-04	3	14
Uchl3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	3,63E-04	2	13
Uchl3	Putative uncharacterized protein	3,63E-04	2	13
Ppp3cc	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit gamma isoform	4,01E-04	1	11
Ppp3cb	Isoform 1 of Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	4,01E-04	1	11
Cep72	Isoform 2 of Centrosomal protein of 72 kDa	4,23E-04	1	8
Bsg	Isoform 2 of Basigin	4,38E-04	5	27
Pgk2	Phosphoglycerate kinase 2	4,85E-04	21	73
Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	4,85E-04	21	73
Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	5,00E-04	31	44
Pabpc1	Polyadenylate-binding protein 1	6,55E-04	58	105
Pabpc6	Protein Pabpc6	6,55E-04	58	105
Thop1	Thimet oligopeptidase	7,42E-04	23	50
Ldhc	L-lactate dehydrogenase C chain	7,46E-04	146	218
Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	7,46E-04	146	218
Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain	7,46E-04	146	218
Ldha	L-lactate dehydrogenase	7,46E-04	146	218
Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	8,12E-04	53	84
Pgam2	Phosphoglycerate mutase 2	8,12E-04	53	84

Cette technique permet d'identifier les protéines contenues dans un mélange provenant d'un gel d'électrophorèse. Chaque spectre de fragmentation MS/MS obtenu est interprété et traduit en séquence primaire d'acides aminés. Les séquences obtenues sont ensuite utilisées pour identifier les protéines par homologie de séquence avec la base de données protéiques. Une protéine est considérée comme présente dans un mélange protéique initial si au moins deux peptides différents lui correspondant sont retrouvés dans l'analyse. Nous avons comparé les résultats obtenus à partir de testicules adultes (3 mois ou plus) de souris *Topaz1+/+* et *-/-* (4 répliquats biologiques par génotype).

1126 protéines différentes ont été détectées. Pourtant, la protéine TOPAZ1 n'est pas retrouvée dans les extraits testiculaires *Topaz1+/+* ce qui pourrait s'expliquer par un faible niveau d'expression. D'autres protéines impliquées dans la méiose telles que SPO11, DMC1, ne sont également pas retrouvées parmi les 1126 protéines. Par un test statistique de Student, **200 protéines se sont révélées différenciellement exprimées** entre les deux génotypes avec une p-value inférieure à 0,01 (Tableau 1). Parmi ces 200 protéines, **146 protéines sont sous-exprimées dans les testicules *Topaz1-/-* dont 40 sont absentes** dans les testicules *Topaz1-/-* alors qu'elles sont présentes dans le WT et **54 protéines sont surexprimées dans les testicules *Topaz1-/-* dont 13 sont présentes** uniquement dans les testicules *Topaz1-/-*.

L'annotation fonctionnelle des 40 protéines absentes dans les testicules mutants par le logiciel David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) met en évidence, avec la plus haute stringence le cluster "spermatogenesis" avec des protéines spécifiques des spermatides comme SPATA20; TDRD6, ce qui confirme l'arrêt de la spermatogenèse avant le stade spermatide observé chez les mutants, et le cluster "microtubule" (comportant entre autres les protéines Dynactin; Dynein light chain LC8-type 2) montrant que les processus biologiques basés sur les microtubules, tels que le désassemblage des microtubules du cytosquelette suivi de la formation du fuseau indispensable à la division méiotique (O'Donnell and O'Bryan, 2014), pourraient être perturbés dans les testicules de souris *Topaz1-/-*. De plus, les microtubules constituent l'un des composants fondamentaux du flagelle du spermatozoïde. La dynactine ou complexe activateur de la dynéine est une protéine constituée de plusieurs sous-unités que l'on retrouve dans les cellules eucaryotes et qui aide au transport intracellulaire bidirectionnel en se liant à la dynéine et à la kinésine-2 et en les reliant à la vésicule ou l'organelle à transporter. En transcriptome, la dynactine 2 et 4 ainsi que la dynéine light chain LC8-type 2 sont différenciellement exprimées entre 15 et 20jpp mais leur expression n'est pas statistiquement différentielle ni à 15 ni à 20jpp entre les testicules *Topaz1+/+* et *Topaz1-/-*. Sur les 40 protéines non exprimées dans les testicules *Topaz1-/-*, 20 protéines ont été décrites comme étant exprimées dans les cellules germinales haploïdes mâles ou comme pouvant avoir un rôle dans la fonction ou la morphologie des spermatozoïdes. L'absence des 20 protéines restantes pourraient soit être la

Bag6	Large proline-rich protein BAG6	1,05E-03	7	23
Ybx2	Y box protein 2	1,06E-03	45	76
Ybx3	Isoform 2 of Y-box-binding protein 3	1,06E-03	45	76
Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1,06E-03	36	54
Ppid	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1,06E-03	36	54
Wdr62	Isoform 3 of WD repeat-containing protein 62	1,06E-03	1	10
Nasp	Nuclear autoantigenic sperm protein	1,15E-03	31	60
Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	1,24E-03	15	47
Pdha2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial	1,25E-03	13	40
Rsph1	Radial spoke head 1 homolog	1,45E-03	11	32
Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	1,63E-03	31	65
Psmc1	26S protease regulatory subunit 4	1,63E-03	31	65
Psmc5	26S protease regulatory subunit 8	1,63E-03	31	65
Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	1,63E-03	31	65
Psmc7	Proteasome subunit alpha type-7	2,02E-03	14	20
Psmc8	Psmc8 protein	2,02E-03	14	20
Psmc8	Proteasome subunit alpha type	2,02E-03	14	20
Tmed10	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	2,02E-03	6	12
Nrd1	Nardilysin	2,03E-03	1	32
Lztf1	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	2,07E-03	5	19
Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	2,24E-03	11	32
Acyp1	Acylphosphatase	2,45E-03	4	14
Arl3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	2,45E-03	2	12
Clgn	Calmegin	2,57E-03	11	41
Gps1	COP9 signalosome complex subunit 1	2,66E-03	7	18
Mtco2	Cytochrome c oxidase subunit 2	2,66E-03	2	13
Dync1h1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	2,80E-03	82	152
Ppp2r4	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	3,34E-03	1	14
Eif4g3	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	3,58E-03	1	11
Cs	Citrate synthase, mitochondrial	3,61E-03	26	48
Csl	Citrate synthase	3,61E-03	26	48
Slc2a3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	3,61E-03	18	40
Manf	Putative uncharacterized protein (Fragment)	3,76E-03	3	10
Dpep3	Dipeptidase 3	4,71E-03	12	35
Psmc6	26S protease regulatory subunit 10B	4,71E-03	12	23
Ppp5c	Serine/threonine-protein phosphatase 5	4,93E-03	6	26
Abce1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	5,42E-03	5	11
Eef1g	Elongation factor 1-gamma	6,08E-03	35	55
Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2	6,45E-03	49	78
Serpina1a	Alpha-1-antitrypsin 1-1	6,45E-03	49	78
Serpina1e	Alpha-1-antitrypsin 1-5	6,45E-03	49	78
Serpina1d	Alpha-1-antitrypsin 1-4	6,45E-03	49	78
Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	6,53E-03	60	84
Eif3a	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	1,05E-03	12	30
Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	1,06E-03	2	11
Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	1,06E-03	125	156

conséquence de l'absence de plusieurs types cellulaires dans les testicules adultes mutants, soit résulter d'un effet négatif direct de *Topaz1*.

Parmi les 146 protéines sous-exprimées dans les KO par rapport au WT, on trouve deux protéines de choc thermique HSP110 (une sous-famille de la famille des HSP70) : HSPA4L et HSPA4. La protéine HSPA4L est décrite comme fortement exprimée dans les cellules germinales pendant la spermatogenèse, en particulier dans les spermatocytes en fin de pachytène jusque dans les spermatozoïdes (Held *et al.*, 2006). L'inactivation de *Hspa4l* chez la souris se traduit par un défaut de fertilité chez environ 40% des mâles *Hspa41*<sup>-/-</sup> et par une diminution drastique du nombre de spermatozoïdes matures dans l'épididyme associée à une réduction de la motilité spermatique (alors que les femelles mutantes sont fertiles) (Held *et al.*, 2006). Comme HSPA4L, HSPA4 présente également une expression ubiquiste mais son expression est plus élevée dans les cellules germinales des gonades prénatales dès 13.5jpc chez le mâle. Les souris femelles invalidées pour *Hspa4* sont fertiles tandis que les mâles présentent un nombre réduit de spermatozoïdes (Held *et al.*, 2011). La spermatogenèse des mâles *Hspa4*<sup>-/-</sup> s'arrête en fin de prophase I de première division de méiose (Held *et al.*, 2011).

Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les protéines sous-exprimées dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> sont moins abondantes car spécifiquement exprimées dans les cellules absentes chez le mutant (les cellules germinales post-méiotiques) ou si leur sous-expression s'explique car *Topaz1* intervient dans la régulation de leur expression. Pour tenter d'apporter des réponses, nous pourrions réaliser la même analyse protéomique sur des testicules plus jeunes entre 15jpp et 20jpp, avant l'apparition du phénotype chez les animaux *Topaz1*<sup>-/-</sup>, ou étudier leur profil d'expression au cours du développement testiculaire chez les animaux *Topaz1*<sup>-/-</sup> et *Topaz1*<sup>+/+</sup> pour voir à quel moment l'expression des gènes codant pour ces protéines est perturbée (avant ou après l'arrêt de la spermatogenèse).

Cette analyse protéomique nous a permis d'entrevoir de nouvelles perspectives d'études concernant la fonction de *Topaz1* dans la spermatogenèse murine, la voie de régulation des protéines de choc thermique de type HSP110/HSP70 pourrait être étudiée dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup>. Pour cela nous pourrions étudier l'expression ou la localisation des cibles des protéines HSP70. En effet, les molécules chaperonnes sont indispensables pour le repliement correcte des protéines synthétisées pendant le stade pachytène des spermatocytes, un échec de ce repliement provoquerait l'entrée en apoptose des spermatocytes (Held *et al.*, 2006).

Parmi les 54 protéines sur-exprimées dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> par rapport aux testicules *Topaz1*<sup>+/+</sup>, une majorité de protéines (29) n'ont pas de rôle décrit dans le testicule. Cependant, on retrouve HNRNPL qui serait un régulateur clé de l'apoptose dans les cellules spermatogéniques (Li *et al.*, 2012), la Septin-2 qui est augmentée dans les testicules âgés (Li *et al.*, 2014, *Reprod Med*), la

Prkaca	Isoform 2 of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	7,34E-03	2	13
Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,68E-03	53	67
Aldoa2	Fructose-bisphosphate aldolase	7,68E-03	53	67
Aldob	Fructose-bisphosphate aldolase B	7,68E-03	53	67
Mpi	Mannose-6-phosphate isomerase	8,24E-03	6	26
Ift122	Isoform 2 of Intraflagellar transport protein 122 homolog	8,24E-03	2	12
Prkar1a	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	8,91E-03	8	21
Ddx5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	9,02E-03	145	181
Ddx4	DEAD box polypeptide 4	9,02E-03	145	181
Ddx5	Putative uncharacterized protein	9,02E-03	145	181
Ddx3x	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	9,02E-03	145	181
D1Pas1	Putative ATP-dependent RNA helicase PI10	9,02E-03	145	181
Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	9,02E-03	145	181
Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase	9,51E-03	42	80
Gsta4	Glutathione S-transferase A4	9,51E-03	42	80
Gsta2	Glutathione S-transferase A2	9,51E-03	42	80
Gsta3	Glutathione S-transferase A3	9,51E-03	42	80

<b>Protéines absentes dans les testicules Topaz1+/+</b>				
	<b>Top Protein Description</b>	<b>Ttest</b>	<b>KO</b>	<b>WT</b>
Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1,37E-06	19	0
Parp1	Putative uncharacterized protein	6,51E-05	32	0
Got1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	3,25E-04	12	0
Nono	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	4,23E-04	7	0
Bclaf1	Isoform 2 of Bcl-2-associated transcription factor 1	2,02E-03	6	0
Tra2b	Transformer-2 protein homolog beta	2,02E-03	6	0
Caprin1	Caprin-1	2,08E-03	13	0
Nfatc2ip	NFATC2-interacting protein	2,45E-03	5	0
Mageb4	Expressed sequence CN716893	2,71E-03	8	0
Add1	Isoform 2 of Alpha-adducin	2,71E-03	8	0
Itgb1	Integrin beta-1	2,71E-03	8	0
Prpf8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	3,33E-03	9	0
Mccc1	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	3,33E-03	9	0

Septin-9 ayant un rôle dans le développement des lymphocytes T (Lassen *et al.*, 2013) et Epb4112 impliqué dans les interactions entre cellules germinales et cellules de Sertoli (Terada *et al.*, 2010). L'augmentation d'expression de ces protéines dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> semble donc plutôt refléter l'arrêt de la spermatogenèse et l'apoptose des cellules germinales plutôt qu'une dérégulation directe par l'absence de *Topaz1*<sup>-/-</sup>. On trouve également des protéines dont la fonction n'a pas été décrite mais qui sont sur-exprimées dans d'autres modèles murins de stérilité : *Fads2* dans les testicules invalidés pour le gène codant pour la HSL, lipase hormono-sensible (Casado *et al.*, 2012) et *Tardbp* dans les testicules invalidés pour *Brd1* (bromodomain, testis-specific) (Berkovits *et al.*, 2012). De façon intéressante, on retrouve également la protéine SET décrite comme indispensable pour la séparation des chromatides sœurs durant la méiose II femelle (Chambon *et al.*, 2013) et sa surexpression provoque une séparation précoce des chromatides en première division de méiose dans les ovocytes, chez la souris (Qi *et al.*, 2013).

Les 13 protéines présentes uniquement dans les testicules mutants appartiennent aux clusters "mRNA processing" (NONO, TRA2b et PRPF8) et "intracellular organelle lumen" (PARP1, NONO, PRPF8 et MCCC1) qui semblent indiquer que *Topaz1* pourrait intervenir dans la stabilité ou la fixation d'ARNs. Des études précédemment publiées ont montré le lien fonctionnel entre la mitochondrie et le nuage et suggèrent qu'une signalisation issues des mitochondries pourrait venir réguler l'assemblage et la fonction des composants du nuage (Huang *et al.*, 2011 ; Watanabe *et al.*, 2011).

L'expression de protéines, normalement non exprimées dans le testicule adulte WT, dans le testicule *Topaz1*<sup>-/-</sup> peut être le signe que *Topaz1* réprime directement ou non leur expression en condition normale. L'expression de ces protéines peut également s'expliquer par la perturbation de l'épithélium séminifère causée par l'apoptose des cellules germinales, en effet, certaines protéines sur-exprimées dans le testicule *Topaz1*<sup>-/-</sup> ont été décrites comme impliquées dans l'apoptose (BCLAF1 (Lee *et al.*, 2012)) ou la réponse immunitaire (NFATC2-interacting protein (Hodge *et al.*, 1996)).

En conclusion, il serait intéressant de refaire cette analyse sur des testicules WT et KO entre 15 et 20jpp, stade qui correspond à l'apparition des premières spermatides, cela permettrait de comparer des populations cellulaires similaires entre les deux génotypes et ainsi s'affranchir de l'absence de spermatides allongées dans les testicules KO. Nous pourrions également réaliser une analyse transcriptomique sur des populations de cellules triées, spermatocytes I notamment, obtenues après un tri cellulaire afin d'étudier plus en détail les protéines impliquées dans la première division de méiose.

**Protéines surexprimées dans les testicules Topaz1-/-**

	<b>Top Protein Description</b>	<b>Ttest</b>	<b>KO</b>	<b>WT</b>
Hnrnpl	Putative uncharacterized protein	1,05E-04	20	2
Hnrnpl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	1,05E-04	20	2
Fads2	Fatty acid desaturase 2	1,31E-04	14	4
Rbm39	Isoform 2 of RNA-binding protein 39	1,44E-04	14	1
Bcat2	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	1,47E-04	25	13
Pygb	Glycogen phosphorylase, brain form	4,23E-04	20	6
Hnrnpa1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	4,23E-04	18	4
Hist1h1c	Histone H1.2	4,24E-04	51	10
Hist1h1t	Histone H1t	4,24E-04	51	10
Hist1h1e	Histone H1.4	4,24E-04	51	10
Hist1h1a	Histone H1.1	4,24E-04	51	10
Hspd1	60 kDa heat shock protein	1,18E-03	116	76
Ilf3	Isoform 2 of Interleukin enhancer-binding factor 3	1,31E-03	9	1
Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	2,07E-03	39	25
Gnb2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	2,07E-03	39	25
Gnb4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	2,07E-03	39	25
Impdh2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	2,07E-03	15	1
Ncl	Nucleolin	2,22E-03	63	37
Sptan1	Isoform 2 of Spectrin alpha chain	2,41E-03	30	7
Set	Protein SET	2,45E-03	12	2
Sept2	Septin-2	2,66E-03	30	19
Sept9	Isoform 3 of Septin-9	2,66E-03	30	19
Fasn	Fatty acid synthase	2,98E-03	90	55
Lmnb1	Lamin-B1	3,01E-03	30	3
Aldh6a1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	3,33E-03	30	12
Srsf6	Protein Srsf6	3,33E-03	16	7
Srsf5	Serine/arginine-rich splicing factor 5	3,33E-03	16	7
Kpna2	Importin subunit alpha-1	3,34E-03	23	10
Tmpo	Isoform Epsilon of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma	3,34E-03	15	2
Srsf1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	3,34E-03	14	1
Lrpprc	Leucine-rich PPR motif-containing protein	4,12E-03	19	3
Mcm3	DNA replication licensing factor MCM3	5,12E-03	18	1
Tardbp	TAR DNA-binding protein 43	5,42E-03	15	9
Zadh2	Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	5,42E-03	7	1
Arhgap1	Rho GTPase-activating protein 1	6,92E-03	11	2
Gatm	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	7,68E-03	15	1
Cyp11a1	Cholesterol side-chain cleavage enzyme	7,94E-03	52	27
Gm14569	Protein Gm14569	8,39E-03	77	42
Epb41l2	Band 4.1-like protein 2	8,62E-03	36	19
Epb41l3	Isoform 4 of Band 4.1-like protein 3	8,62E-03	36	19
Anxa2	Annexin A2	9,78E-03	27	9

## Analyse transcriptionnelle au cours du développement gonadique de gènes impliqués dans la répression des rétrotransposons et les mécanismes épigénétiques survenant dans la lignée germinale : comparaison souris-mouton

Le laboratoire travaille également sur le développement gonadique ovin. Au début de ma thèse, parallèlement à la mise en place de la lignée de souris invalidées pour le gène *Topaz1*, j'ai étudié l'expression des gènes impliqués dans la répression des rétrotransposons via la voie des piRNA et de la méthylation de l'ADN au cours du développement, chez le mouton, en comparaison avec la souris. En effet, si l'expression de ces gènes est bien connue pour le testicule murin (Thomson and Lin, 2009), peu de données existent pour les ovaires de souris et aucune étude n'a été réalisée chez le mouton. Connaître le profil d'expression de ces gènes au cours du développement gonadique, nous renseigne sur les similitudes ou les différences du maintien de l'intégrité du génome dans les cellules germinales entre espèces.

L'expression des gènes a été étudiée à différents stades : 45jpc (formation des cordons ovigères), 55jpc (début de la méiose femelle), 60jpc, 65jpc, 75jpc (stade d'initiation de la folliculogenèse), 82jpc (folliculogenèse avec follicules primordiaux), 90jpc (les cellules germinales femelles sont quasiment toutes bloquées en fin de prophase), 114jpc (présence de follicules primaires) et adulte.

Chaque stade de développement du profil d'expression ovin correspond à deux réplicas techniques chacun composé d'un pool de 3 gonades ovines.

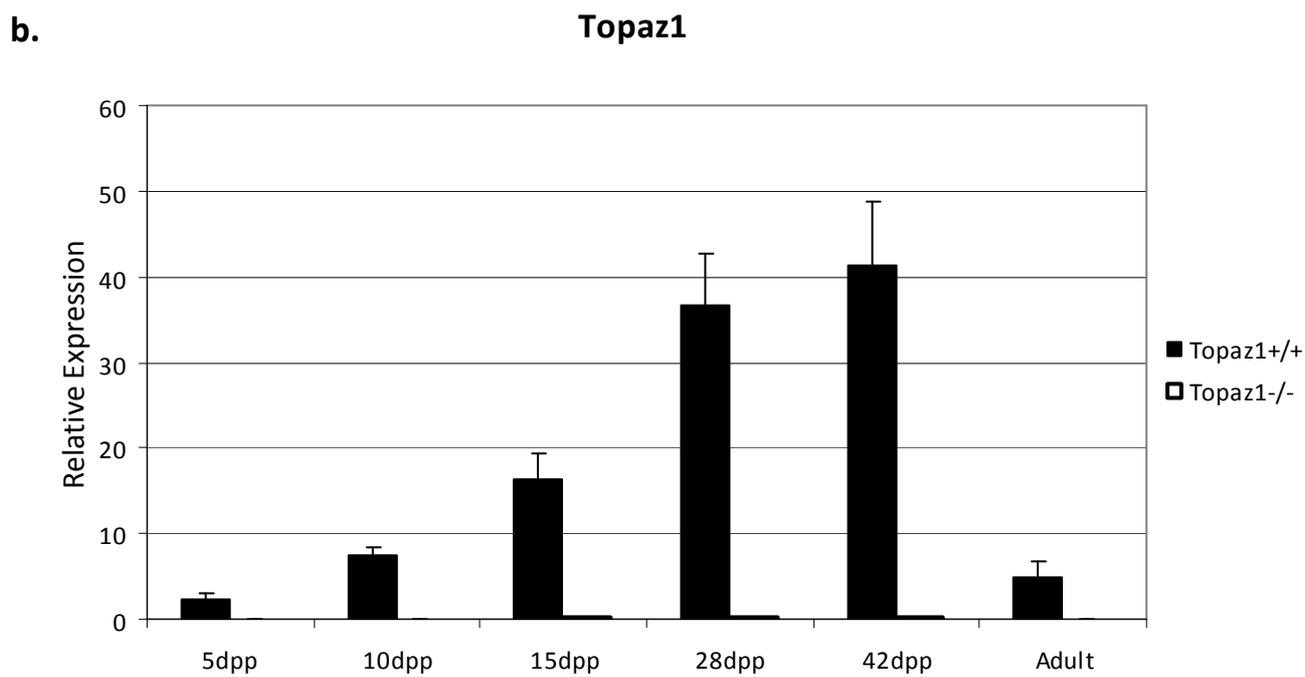
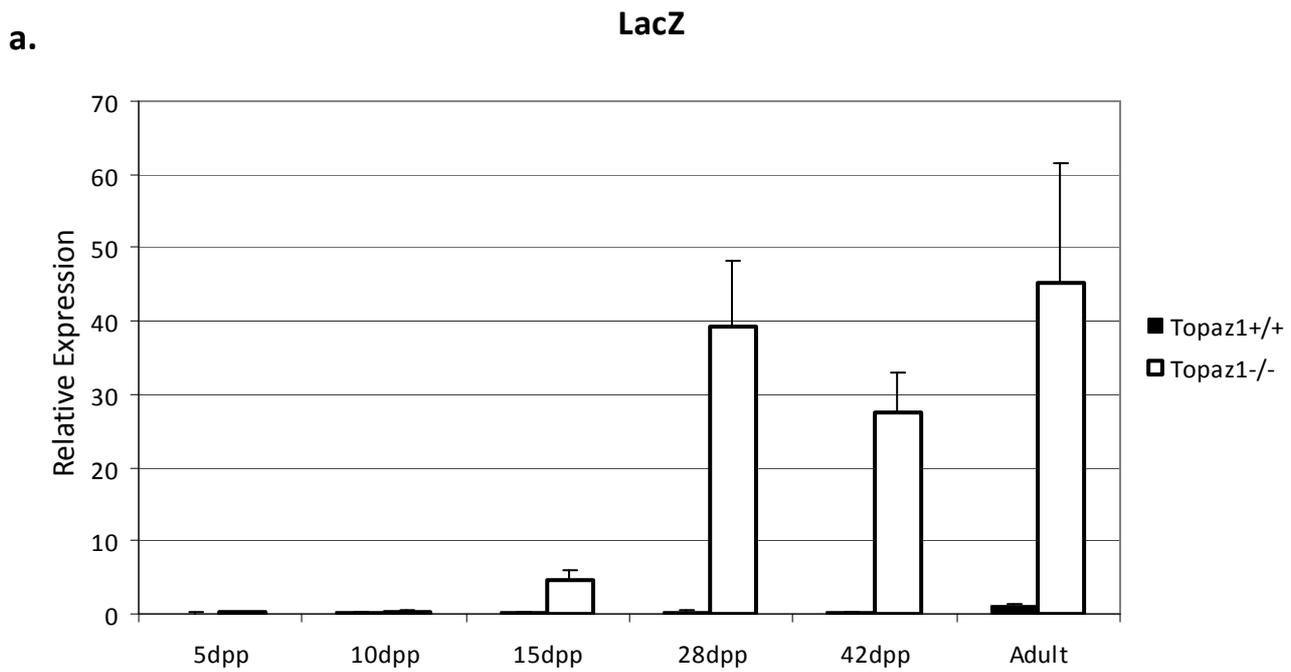
- *Topaz1*

J'ai commencé par comparer l'expression de notre gène d'intérêt, *Topaz1*, chez la souris et le mouton, ainsi que chez le lapin puisque notre laboratoire travaille également sur le développement gonadique de cette espèce.

Chez la souris, le gène *Topaz1* est faiblement exprimé dans l'ovaire fœtal, avec un pic d'expression à 14,5jpc (juste après l'entrée en méiose des cellules germinales) et à 17,5jpc. Dans le testicule murin, *Topaz1* est exprimé à un niveau faible pendant la vie fœtale et il est fortement exprimé pendant la méiose mâle, dans le testicule adulte (Figure 20, a).

Chez le lapin, l'expression de *Topaz1* augmente au moment de la méiose femelle à 31jpc et atteint un pic d'expression à 44jpc, qui correspond au début de la folliculogenèse. Chez le lapin mâle, l'expression de *Topaz1* est la plus forte pendant la méiose, soit dans le testicule adulte (Figure 20, b).

Chez l'ovine, *TOPAZ1* est fortement exprimé dans l'ovaire fœtal à partir de 55jpc qui correspond à l'entrée en méiose des cellules germinales. Son expression reste très importante jusqu'à 90jpc (fin de la méiose). Chez le mâle ovin, *TOPAZ1* est le plus fortement exprimé durant la méiose, à l'âge adulte (Figure 20, c).



**Figure 19 : Profils d'expression des gènes *LacZ* (a.), et *Topaz1* (b.) au cours du développement dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> et *Topaz1*<sup>+/+</sup>**

**Les espèces ovine et lapine présentent donc un profil d'expression de *TOPAZ1* comparable au cours du développement gonadique, avec une forte expression durant la méiose femelle et mâle, ce qui suggère un rôle de *Topaz1* dans la méiose des deux sexes, chez ces espèces.** Ce profil n'est pas retrouvé chez la souris où l'expression de *Topaz1* est beaucoup plus faible dans l'ovaire fœtal comparé au mâle. *TOPAZ1* pourrait donc avoir un rôle dans la méiose femelle chez l'ovine et le lapin différent de chez la souris.

- **Gènes *PIWI***

Les gènes *PIWI* sont exprimés spécifiquement dans les cellules germinales et codent pour des protéines capables de se lier avec les piARNs (Chuma and Nakano, 2012). Chez la souris, il existe 3 protéines *PIWI*: *Miwi*, *Mili* et *Miwi2*. Chez le mouton, il en existe une: supplémentaire: *PIWIL3*. Chez l'Homme, on retrouve également quatre protéines *PIWI*: *PIWIL1/HIWI*, *PIWIL2/HILI*, *PIWIL3* et *PIWIL4/HIWI2*. Une étude récente a identifié de nombreux et divers piARNs dans les ovaires ovins suggérant une régulation de la fonction ovarienne par la voie des piwi RNA chez l'ovine (Di *et al.*, 2014).

Conformément à la littérature (Deng *et al.*, 2002), chez la souris, le gène *Miwi* est fortement exprimé dans le testicule après la naissance dès 15jpp tandis qu'il ne l'est pas dans les gonades fœtales mâles et femelles, ni dans l'ovaire adulte (Figure 21 a. et b.).

De façon similaire, *PIWIL1*, l'orthologue de *Miwi* murin, est également exprimé fortement dans le testicule adulte chez le mouton. Une faible expression de *PIWIL1* dans l'ovaire fœtal ovine est observée pendant la méiose femelle (à partir de 55-60 jpc) et la mise en place des follicules (75-90jpc) (Figure 21 c.). **Les espèces murine et ovine présentent donc pour *Miwi/PIWIL1* un profil comparable dans le testicule, avec une expression caractéristique au cours de la méiose mâle, ce qui suggère un rôle de *PIWIL1* lors de la spermatogenèse ovine.** Il reste à déterminer si la faible expression de *PIWIL1* dans l'ovaire fœtal ovine pourrait avoir un rôle lors de la mise en place de l'ovaire de brebis. Contrairement à la souris et à la brebis, *PIWIL1/HIWI* est exprimé dans l'ovaire humain adulte, *PIWIL1* est également retrouvé dans l'ovaire d'ornithorynque (Lim *et al.*, 2013) mais pas dans l'ovaire de poulet (Lim *et al.*, 2013).

Les protéines *MILI* et *MIWI2* agissent ensemble pour réprimer l'expression des rétrotransposons via la méthylation de l'ADN. Concernant le gène *Mili* de souris, son expression dans le testicule commence dès 13,5jpc et augmente jusqu'à la fin de la gestation. Son expression est faible à la naissance mais augmente à nouveau de façon importante jusqu'à atteindre son expression maximale dans le testicule adulte (Figure 22 b.). Dans l'ovaire murin, *Mili* est exprimée de façon faible mais non négligeable à partir de 13,5jpc (début de la méiose femelle) jusqu'à 8jpp. *Mili* n'est pas exprimé dans l'ovaire de souris adulte (Figure 22 a.) (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004).

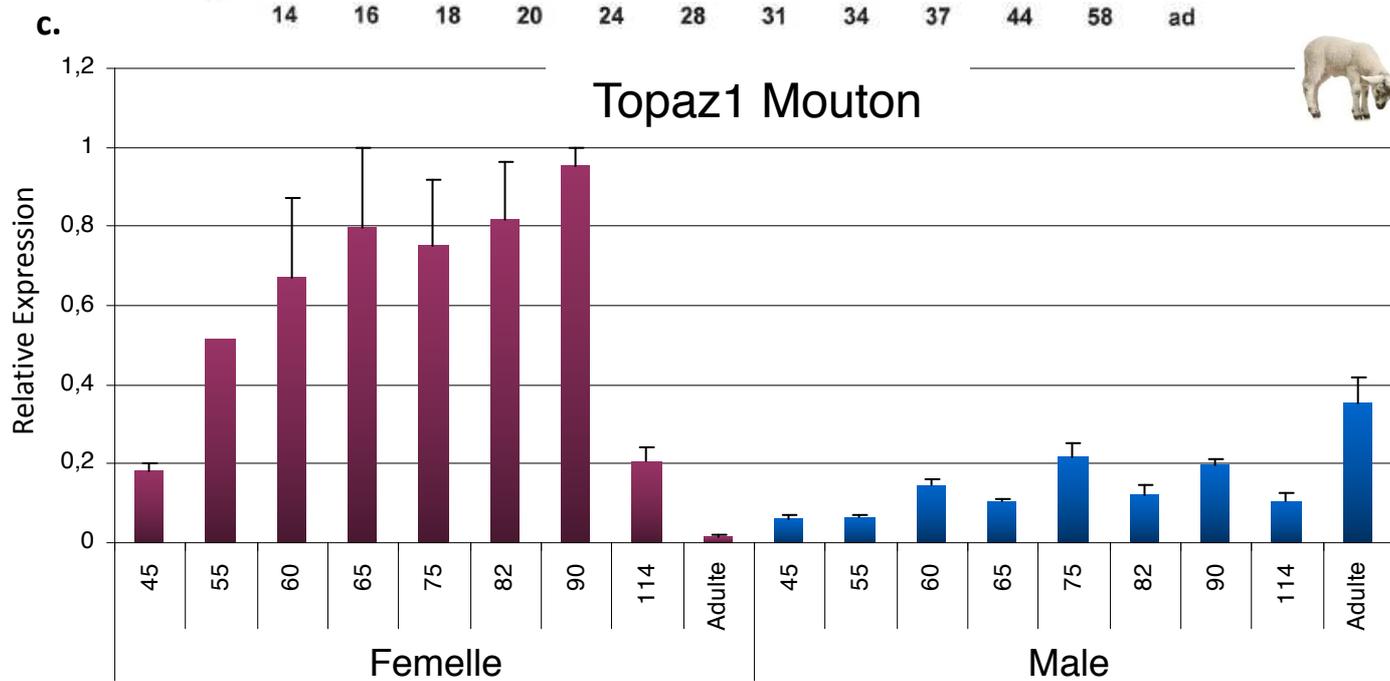
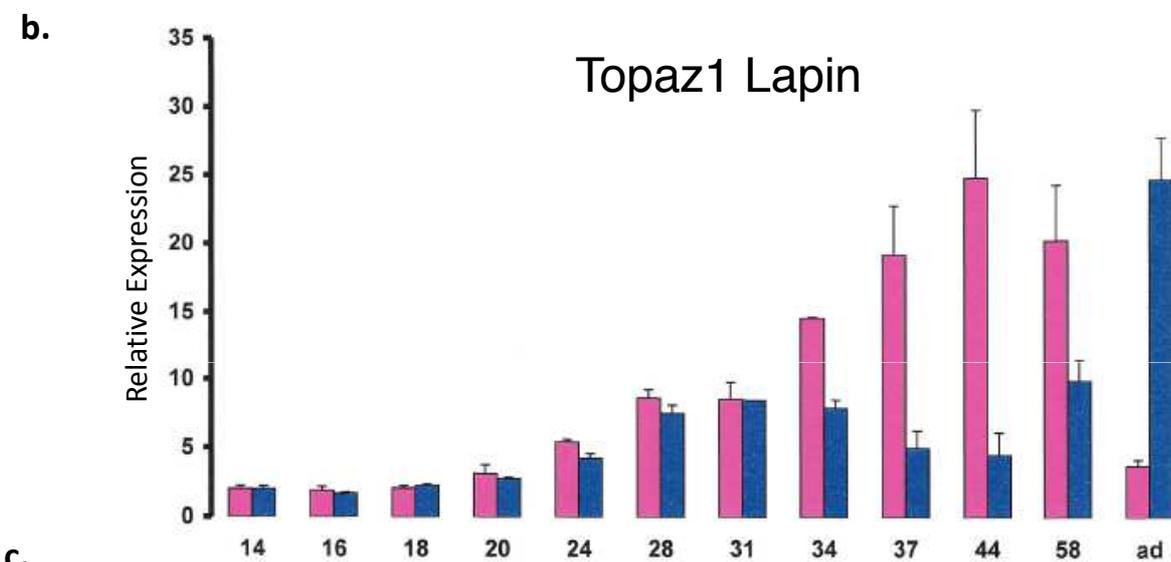
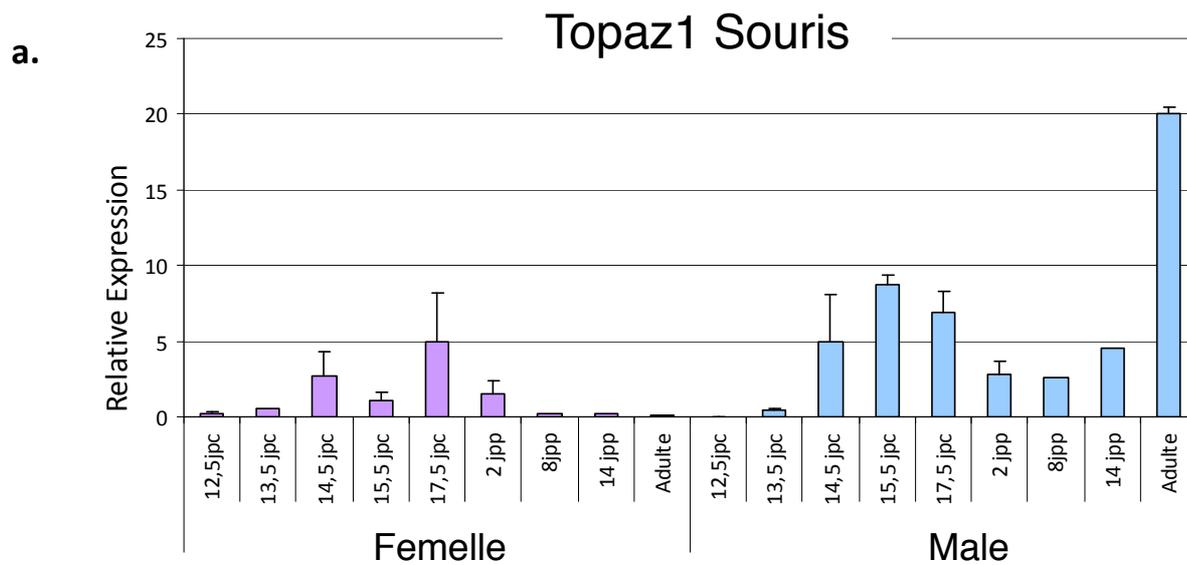


Figure 20 : Analyse par RT-qPCR du gène *Topaz1* dans les gonades murines (a.), lapines (b.) et ovines (c.) mâles et femelles (a.) au cours du développement

Différemment, chez le mouton, *PIWIL2*, l'orthologue de *Mili* murin, est exprimé à un niveau plus élevé dans l'ovaire fœtal comparé au testicule fœtal. On observe deux pics d'expression, l'un à 60jpc autour de la méiose et l'un autour de 82-90 jpc à la formation des follicules. Chez le mâle, *PiwiL2* est exprimé de façon relativement constante pendant la vie fœtale puis maximale dans le testicule adulte (Figure 22 c.).

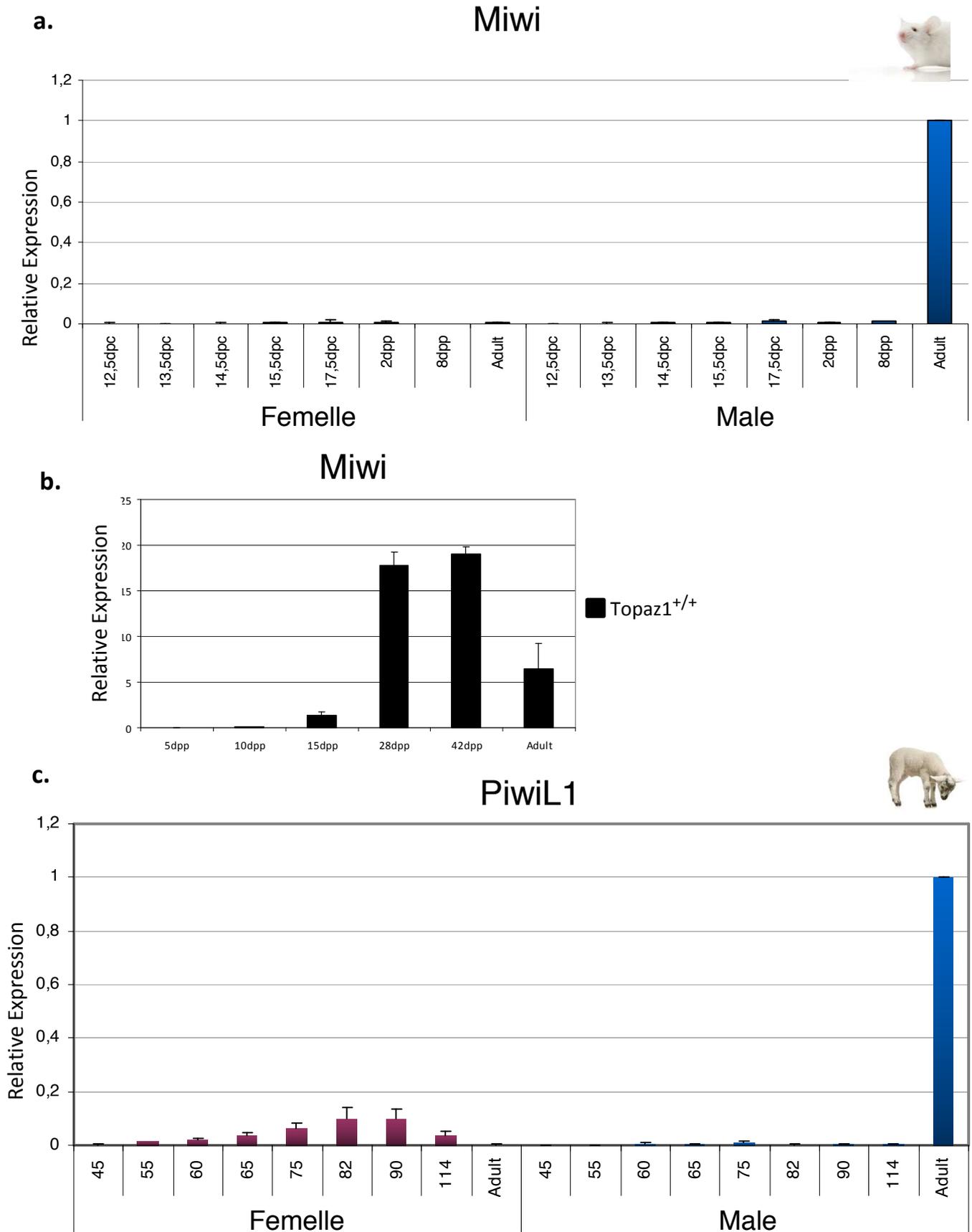
La troisième protéine PIWI est codée par le gène *Miwi2* chez la souris et *PiwiL4* chez l'ovine. *Miwi2* n'est pratiquement pas exprimé dans l'ovaire. *Miwi2* est très fortement exprimé dans le testicule en périnatal (entre 15jpc à 3jpp), comme décrit dans la littérature (Figure 23 a. et b.) (Carmell *et al.*, 2007). Ce profil sexuellement dimorphique n'est pas retrouvé chez l'ovine où l'expression de *PIWIL4* est importante à la fois dans les ovaires et testicules fœtaux avec, pour les deux sexes, un pic d'expression autour de 70jpc (Figure 23 c.).

**Le profil d'expression des gènes *Mili/PIWIL2* et *Miwi2/PIWIL4* chez la souris et l'ovine est comparable dans le testicule, ce qui laisse supposer un rôle analogue lors de la spermatogénèse.**

Comme chez l'ovine, on observe une expression faible de *PiwiL4* dans le testicule adulte chez l'humain et l'ornithorynque (Lim *et al.*, 2013). **L'expression de ces deux gènes étant très faible dans l'ovaire murin mais importante dans l'ovaire fœtal ovine, on peut faire l'hypothèse que la voie des Piwi aurait un rôle fonctionnel chez la brebis en période fœtale à la différence de l'espèce murine où l'inactivation de *Mili* et *Miwi2* n'induit pas de phénotype ovarien** (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004 ; Carmell *et al.*, 2007). Bien que nous montrions une expression très faible par qPCR de *PiwiL2* et *PiwiL4* dans les ovaires adultes ovins et murins, la littérature décrit une expression de *PiwiL2* et *PiwiL4* dans les ovocytes et les cellules de support dans les ovaires adultes de souris, d'humain et d'ornithorynque (Lim *et al.*, 2013). Contrairement à la souris et à l'ovine, *PiwiL4* est exprimé dans le testicule adulte de porc (Kowalczykiewicz *et al.*, 2012), de l'ornithorynque et humain (Lim *et al.*, 2013).

Le gène *PiwiL3* est trouvé chez les espèces mammaliennes eutheriennes mais a été perdu chez la souris (Figure 24). Chez l'ovine, il est exprimé dans l'ovaire fœtal de façon croissante au cours du développement, avec un pic en fin de gestation lors de la formation des follicules, mais pas dans l'ovaire adulte. Chez le mâle, l'expression de *PiwiL3* est faible dans le testicule fœtal mais importante dans le testicule adulte (Figure 25). **Chez le mouton, *PIWIL3* pourrait donc avoir un rôle dans la gonade femelle en fin de gestation et dans le testicule adulte.** Pour le moment, bien qu'existant chez de nombreuses espèces mammaliennes eutheriennes étudiées (bovin, singe, lapin, rat-taupe...), le gène *PIWIL3* et son expression ne semblent pas avoir été étudiés chez d'autres espèces que l'humain et la souris et donc maintenant le mouton.

**Notre étude montre que, contrairement à la souris où les gènes des Piwi sont principalement exprimés dans les testicules à différents stades de développement, chez le mouton, l'ovaire fœtal**



**Figure 21 : Analyse par RT-qPCR du gène *Miwi* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL1* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement**

**présente une expression importante de ces gènes aux deux étapes clés de développement ovarien que sont la méiose et la formation des follicules.** Ces résultats suggèrent un rôle supplémentaire des protéines Piwi dans l'ovaire fœtal ovin qui n'existerait pas dans le modèle murin. Dans l'optique de poursuivre cette étude des gènes Piwi chez l'ovine, nous pourrions réaliser, dans un premier temps, des expériences d'immunohistochimie sur des ovaires fœtaux et des testicules adultes ovins afin d'étudier l'expression et la localisation des protéines PIWI dans les gonades de cette espèce faisant ainsi un lien avec la voie des piARN chez l'ovine.

- **Gènes *DNMT***

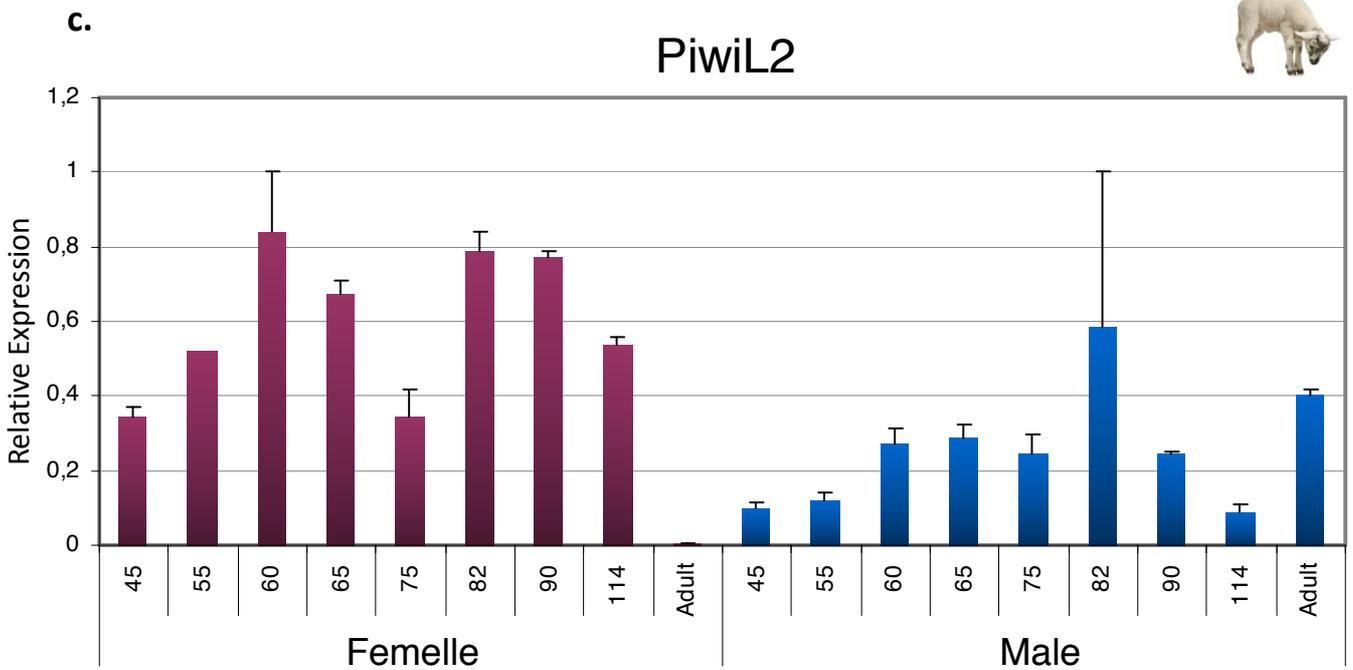
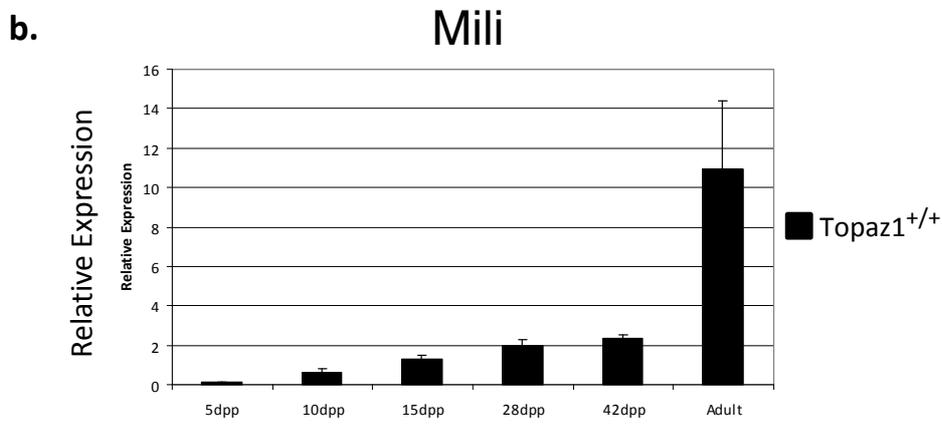
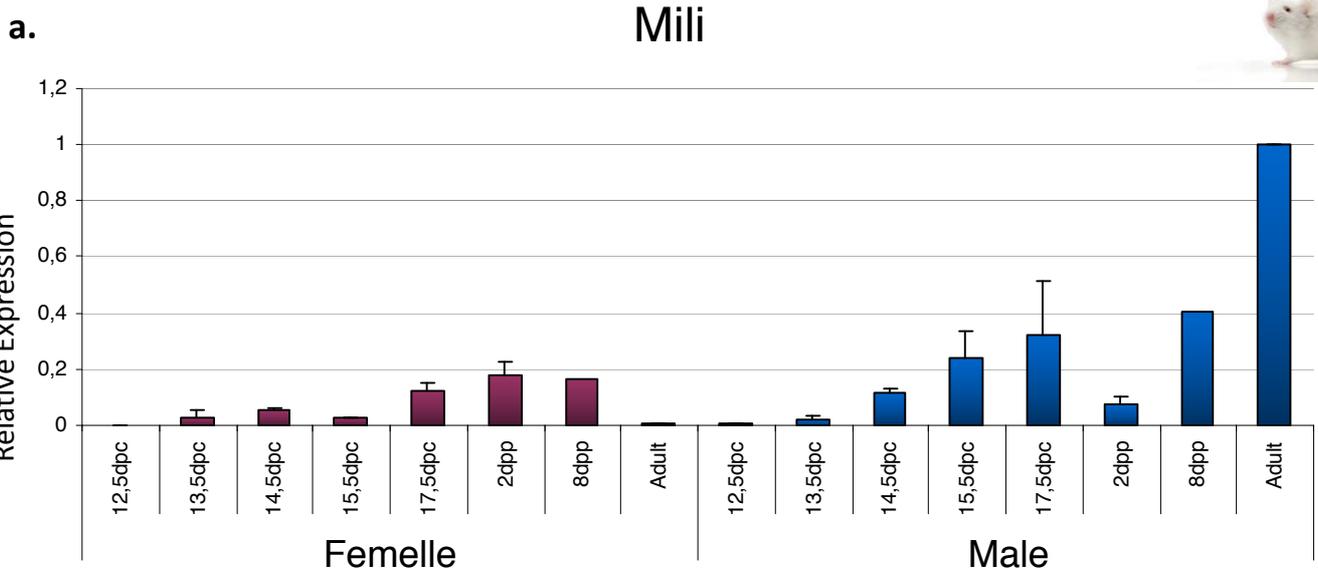
Les ADN méthyltransférases sont des enzymes qui interviennent dans la méthylation de l'ADN. Chez les mammifères, il existe une méthylation de maintenance et une méthylation *de novo* faisant intervenir des enzymes différentes. Nous avons donc étudié l'expression des *DNMT* (*DNA (cytosine5-) methyltransferase*) au cours du développement gonadique mâle et femelle, chez le mouton en comparaison avec la souris.

**Le gène *DNMT1*, codant pour une DNMT de maintenance, est exprimé dans l'ovaire et le testicule pendant tout le développement jusqu'à l'âge adulte dans les deux espèces** (Figure 26 a. et b.).

**Le gène *DNMT3a* qui code pour une DNMT impliquée dans la méthylation *de novo*, présente le même profil d'expression assez constant au cours du développement gonadique mâle et femelle chez les espèces murine et ovine** (Figure 27 a. et b.).

La deuxième DNA-méthyltransferase *de novo* qui méthyle préférentiellement les séquences entourant les centromères est codée par le gène *DNMT3b*. Ce gène est exprimé de façon graduelle tout au long du développement fœtal gonadique des deux sexes chez le mouton et persiste à l'âge adulte (Figure 28 a.). Chez la souris, *Dnmt3b* présente un profil sexuellement dimorphique puisqu'il est exprimé à partir de 8jpp dans l'ovaire, soit après la formation des premiers follicules ovariens et dans le testicule il présente une forte expression autour de 16,5jpc puis dans le testicule adulte (Figure 28 b.). **Le profil d'expression de *Dnmt3b* est donc différent entre les espèces ovine et murine. Il est en effet exprimé pendant tout le développement gonadique dans les deux sexes chez le mouton alors qu'il n'est exprimé que pendant une fenêtre précise et sexuellement dimorphique chez la souris.** *Dnmt3b* est exprimé au moment de la méthylation *de novo* dans l'ovaire post-natal murin et au moment de la méthylation *de novo* dans le testicule fœtal de souris et durant la méiose mâle.

Chez la souris, le gène *Dnmt3L* est exprimé dans les prospermatogonies en prénatal, au moment de la mise en place de l'empreinte paternelle (Davis *et al.*, 1999). Contrairement aux autres DNMT qui ont une fonction catalytique, DNMT3L joue davantage un rôle de régulation de la méthylation de l'ADN (Bourc'his *et al.*, 2004). Chez l'ovine, *DNMT3L* est exprimé à partir de 60jpc dans le testicule et



**Figure 22 : Analyse par RT-qPCR du gène *Mili* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL2* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement**

son expression est forte jusqu'à 114jpc (Figure 29). **Le profil d'expression de *Dnmt3L* est différent entre les deux espèces étudiées puisque, chez la souris, *Dnmt3L* est exprimé dans l'ovaire post-natal, au moment de la méthylation *de novo*, dans le testicule foetal en fin de gestation et durant la méiose mâle. Alors que chez l'ovine, l'expression de *DNMT3L* est très faible dans l'ovaire quel que soit le stade tandis qu'il est fortement exprimé dans le testicule foetal.**

Il est à noter que DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L ont un degré de similitude structurale entre l'humain et le bovin plus grand qu'entre l'humain et la souris (Rodriguez-Orsorio *et al.*, 2010). L'ovine pourrait donc constituer un modèle animal intéressant pour étudier les mécanismes de méthylation de l'ADN chez les ruminants et ainsi extrapoler à l'espèce humaine.

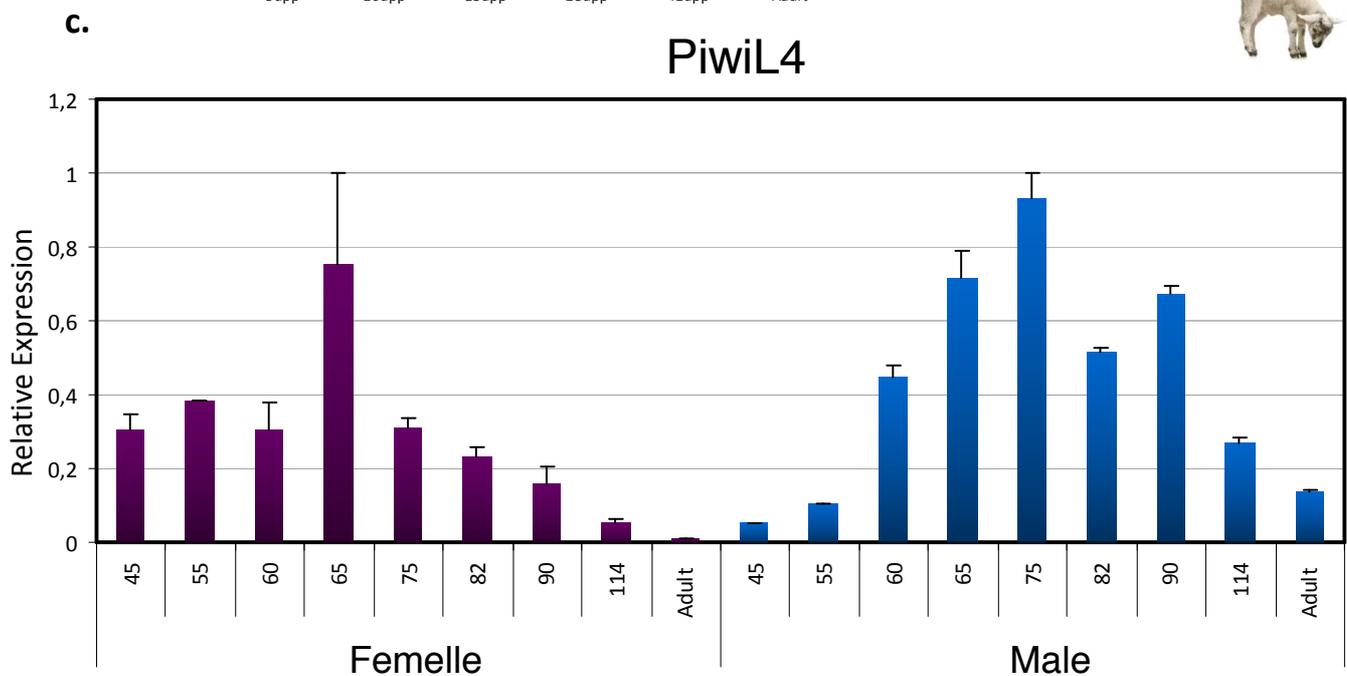
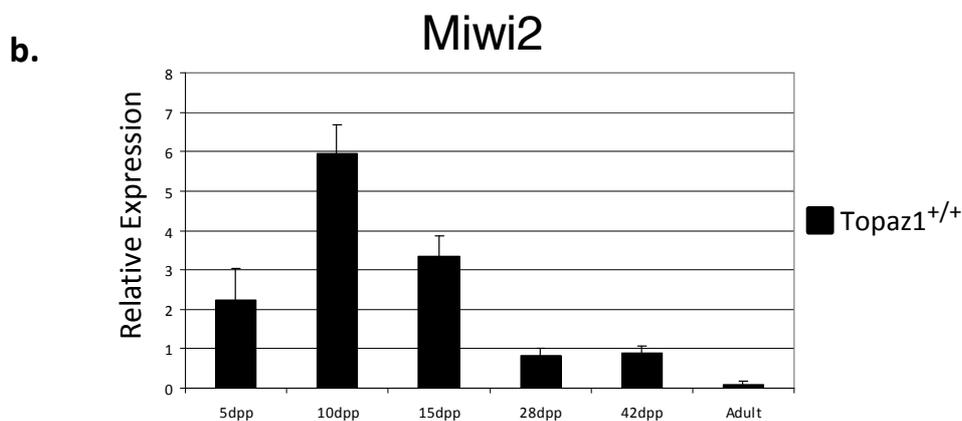
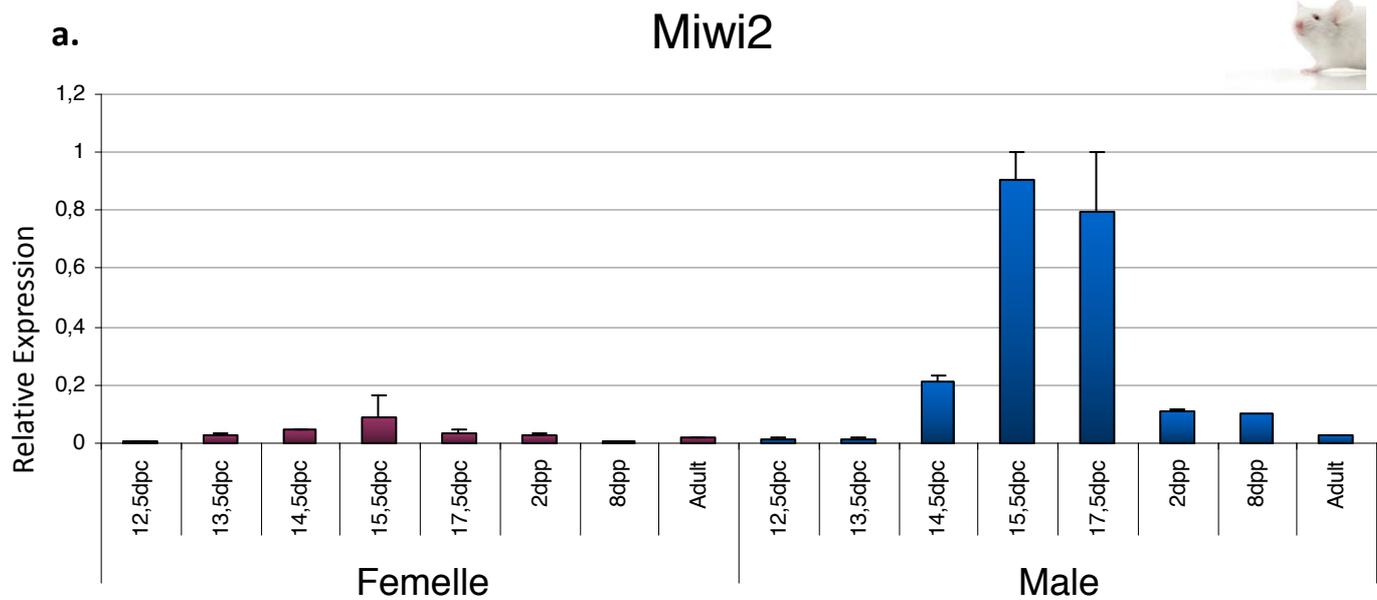
Chez l'humain, les transcrits des gènes *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* sont détectés dans les follicules ovariens et les ovocytes matures (Huntriss *et al.*, 2004). Nos résultats sont en accord avec ces résultats obtenus chez l'Homme et la souris où *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont décrits comme étant exprimés de façon stable dans l'ovaire (La Salle *et al.*, 2004) tandis que *Dnmt1* est décrit dans les ovocytes en croissance (Bao *et al.*, 2000).

- **Gènes impliqués dans le corps chromatoïde appelé Nuage**

Les protéines PIWI n'agissent pas seules dans la voie des piARNs, elles agissent en complexe ribonucléoprotéiques (RNP) avec de nombreux autres composants dont nous avons étudié l'expression chez la souris et l'ovine. Les composants de la voie des Piwi sont localisés dans une structure conservée au cours de l'évolution appelée le nuage ou corps chromatoïde. Le nuage correspond à un compartiment cytoplasmique ribonucléoprotéique spécifique de la lignée germinale.

Le gène *Mov10L1* code pour une protéine à domaine hélicase indispensable à l'inhibition des rétrotransposons au cours de la spermatogenèse (Frost *et al.*, 2010). Chez le mouton, le gène *Mov10L1* est exprimé plus fortement dans l'ovaire foetal dès la méiose puis diminue en fin de gestation pour ne plus avoir d'expression quantifiable au stade adulte. Dans le testicule foetal l'expression de *Mov10L1* est très faible, seule la gonade mâle adulte exprime fortement ce gène (Figure 30). **Le profil d'expression de *Mov10L1* est comparable entre les deux espèces, dans les gonades des deux sexes mais l'expression de *Mov10L1* est plus forte dans l'ovaire foetal ovine que dans l'ovaire foetal murin.**

**Chez l'ovine, les profils d'expression gonadiques des gènes *VASA* (Figure 31 b.), *GASZ* (Figure 32 b.), *Maelstrom* (Figure 33 b.), *TDRD1* (Figure 34 b.), gènes codants pour des protéines localisées dans le nuage des cellules germinales et participants à la régulation des rétrotransposons dans les cellules germinales (Chuma and Nakano, 2012), sont globalement similaires à celui de *MOV10L1* avec une forte expression de ces gènes au moment de la formation des follicules dans l'ovaire foetal ovine.**



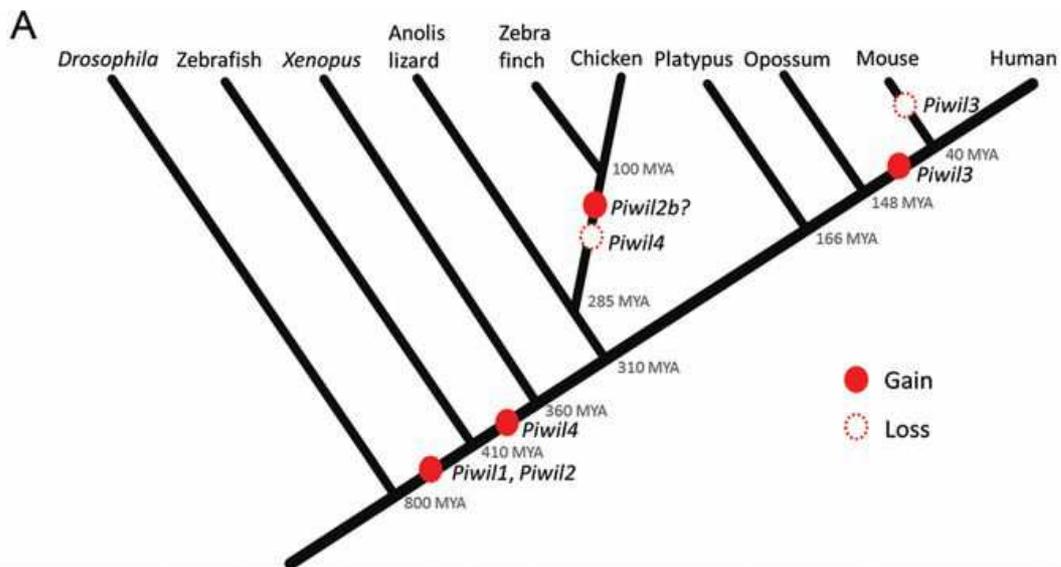
**Figure 23 : Analyse par RT-qPCR du gène *Miwi2* dans les gonades murines mâles et femelles (a.) et mâles (b.) et son homologue *PIWIL4* dans les gonades ovines mâles et femelles (c.) au cours du développement**

Ces gènes sont en général peu étudiés dans les gonades femelles par rapport aux mâles, ce qui fait l'originalité de notre étude. Chez plusieurs espèces mammaliennes, dont l'humain, *Vasa* est exprimé de façon faible à indétectable dans les ovaires après la naissance (Hickford *et al.*, 2011 ; Castrillon *et al.*, 2000) mais présente un pic d'expression dans le deuxième trimestre de grossesse chez la femme (début de formation des follicules) (Anderson *et al.*, 2007). En ce qui concerne le gène *MAELSTROM*, une expression est décrite dans les ovocytes et les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et pré-antraux chez l'humain (Lim *et al.*, 2013). Le gène *TDRD1* est exprimé dans l'ovaire murin adulte (dans les ovocytes primaires) (Chuma *et al.*, 2006) et dans l'ovaire adulte d'ornithorynque (Lim *et al.*, 2013). Donc, même si le rôle de ces ribonucléoprotéines est étudié principalement dans les cellules germinales mâles, on observe une expression de ces gènes dans les cellules germinales femelles de mammifères. Il serait donc intéressant d'étudier précisément leurs fonctions biologiques et la régulation des rétrotransposons notamment pendant la prophase I méiotique femelle. L'expression des rétrotransposons dans l'ovaire foetal ovin pourrait être réalisée et des expériences d'immunohistochimie avec des anticorps dirigés comme ces protéines nous permettraient de voir si, comme dans le testicule murin, ces protéines sont localisées dans une structure cytoplasmique particulière, le nuage, et si elles interagissent entre elles.

- **Gènes *TET***

Les enzymes TET (*Ten-Eleven Translocation*) sont capables de catalyser l'oxydation des 5-méthylcytosine (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC). Les CGP subissent un processus complexe de reprogrammation épigénétique incluant l'effacement de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome. Beaucoup d'énergie est nécessaire pour retirer un groupement méthyl alors qu'il est plus facile de retirer un groupement méthyl oxydé. Le groupement 5-hmC est donc un intermédiaire clé de la déméthylation active de l'ADN, il peut être reconnu par des protéines spécifiques de liaison à l'ADN. Les TET ont donc un rôle clé dans la déméthylation des cytosines et dans le contrôle de la différenciation cellulaire (Tahiliani *et al.*, 2009). Dans la littérature, il est montré que *TET1* et *TET2* sont exprimés pendant la reprogrammation des CGP chez la souris, mais seule l'expression de *TET1* est augmentée dans les cellules germinales en cours de reprogrammation. **Chez l'ovine, les gènes *TET1*, *TET2* et *TET3* sont exprimés tout au long du développement gonadique des deux sexes, en quantité cependant supérieure dans l'ovaire avec un maximum d'expression autour de 90 jpc lors de la formation des follicules primaires pour *TET2* et 3 (Figure 35). Il pourrait donc y avoir un processus actif de modification épigénétique dans l'ovaire et le testicule foetal chez le mouton.**

Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes de déméthylation active de l'ADN chez l'ovine. Pour cela, nous pourrions quantifier les résidus 5-hmC de l'ADN au cours du développement



**Figure 24 : Schéma de l'évolution des gènes *Piwi* au cours de l'évolution animale (Lim *et al.*, 2013)**

*PiwiL1* et *PiwiL2* sont présent chez tous les vertébrés étudiés. *PiwiL4* apparait chez les vertébrés après la divergence des poissons mais n'est pas présent chez les oiseaux (d'après les séquences disponibles actuellement). *PiwiL3* est retrouvé chez les mammifères euthériens mais est perdu chez la souris.

gonadique, par analyse ELISA 5methylCytosine sur ADN purifié, par exemple, afin de comparer le niveau d'ADN déméthylé avec l'expression des protéines TET. Cette technique permet de quantifier les 5-mC dans les échantillons d'ADN par un anticorps monoclonal anti-5-Methylcytosine. Le pourcentage de 5-mC de l'échantillon génomique est quantifié grâce à une courbe standard générée avec des contrôles internes.

D'une manière générale, il serait intéressant d'étudier les mécanismes de méthylation/déméthylation dans les gonades fœtales chez l'ovine, car ils pourraient être différents de ceux décrits chez la souris. Ces données d'expression génique liées à la répression des rétrotransposons et des mécanismes épigénétiques au cours du développement gonadique normal chez l'ovine (Récapitulés dans la Figure 36) nous permettra d'analyser les effets de différentes conditions expérimentales développées dans l'unité (régime alimentaire perturbé, perturbateurs endocriniens ou particules polluantes par exemple) sur les mécanismes épigénétiques.

## PiwiL3

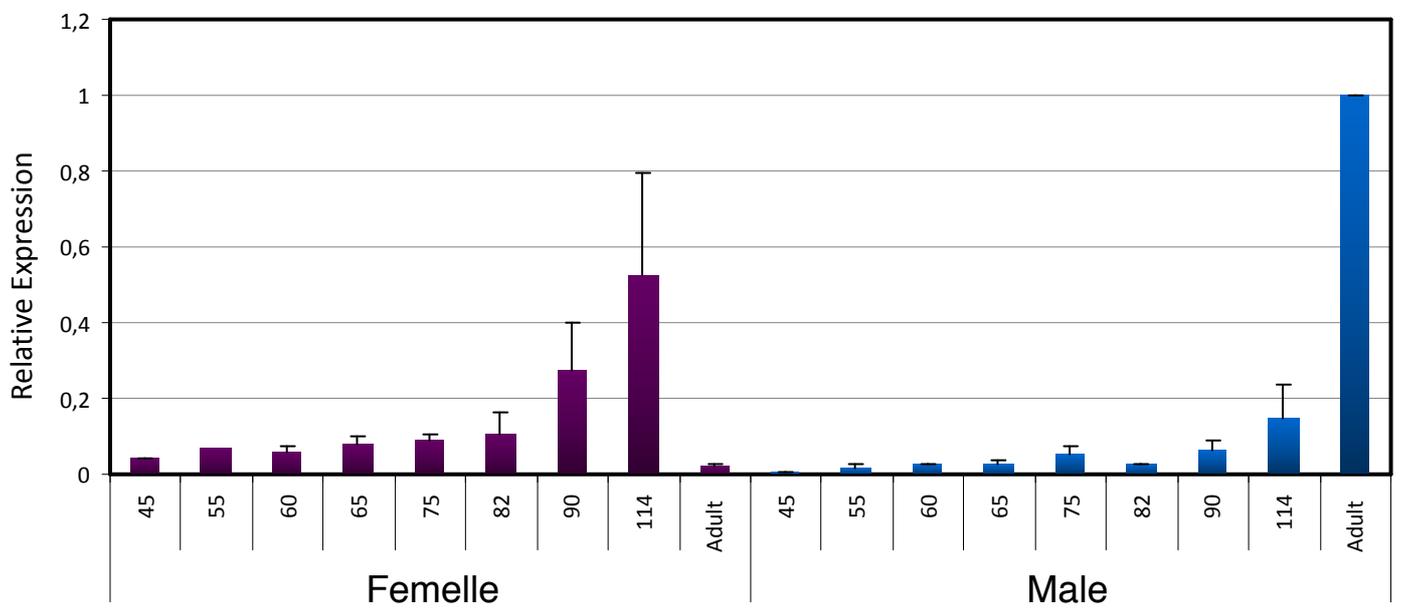
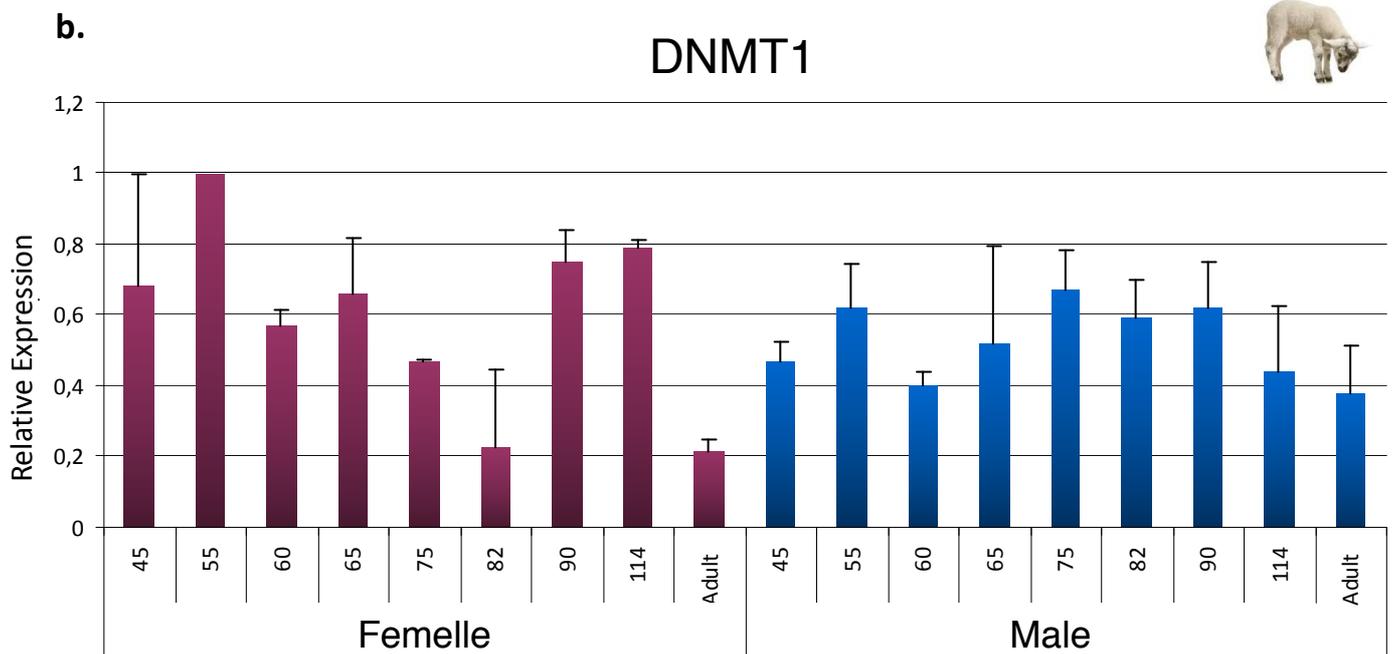
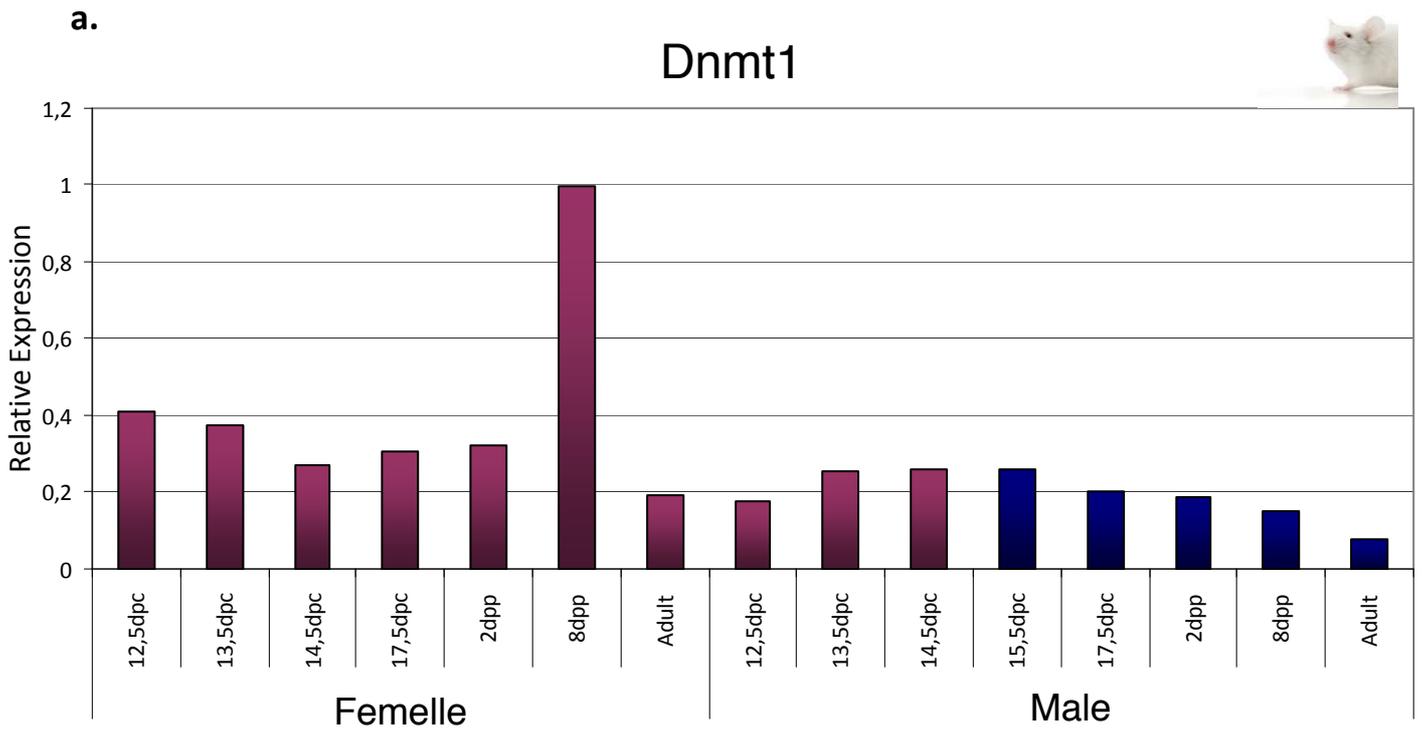
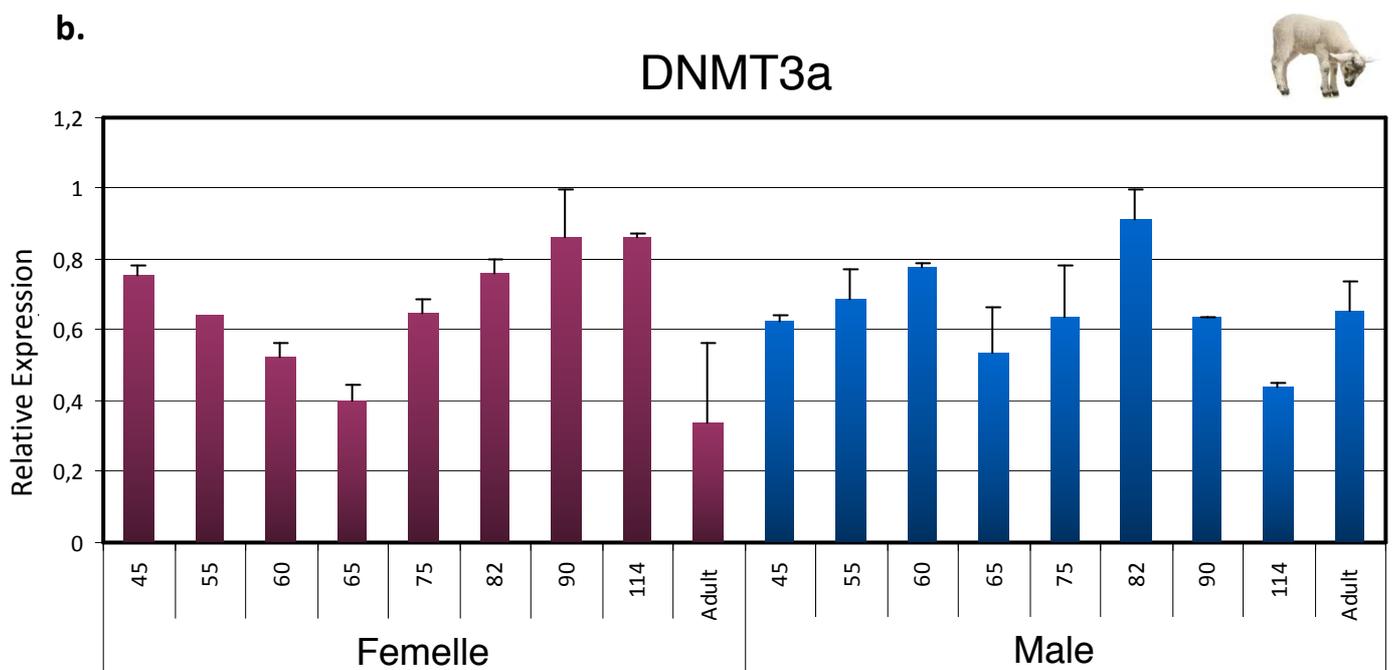
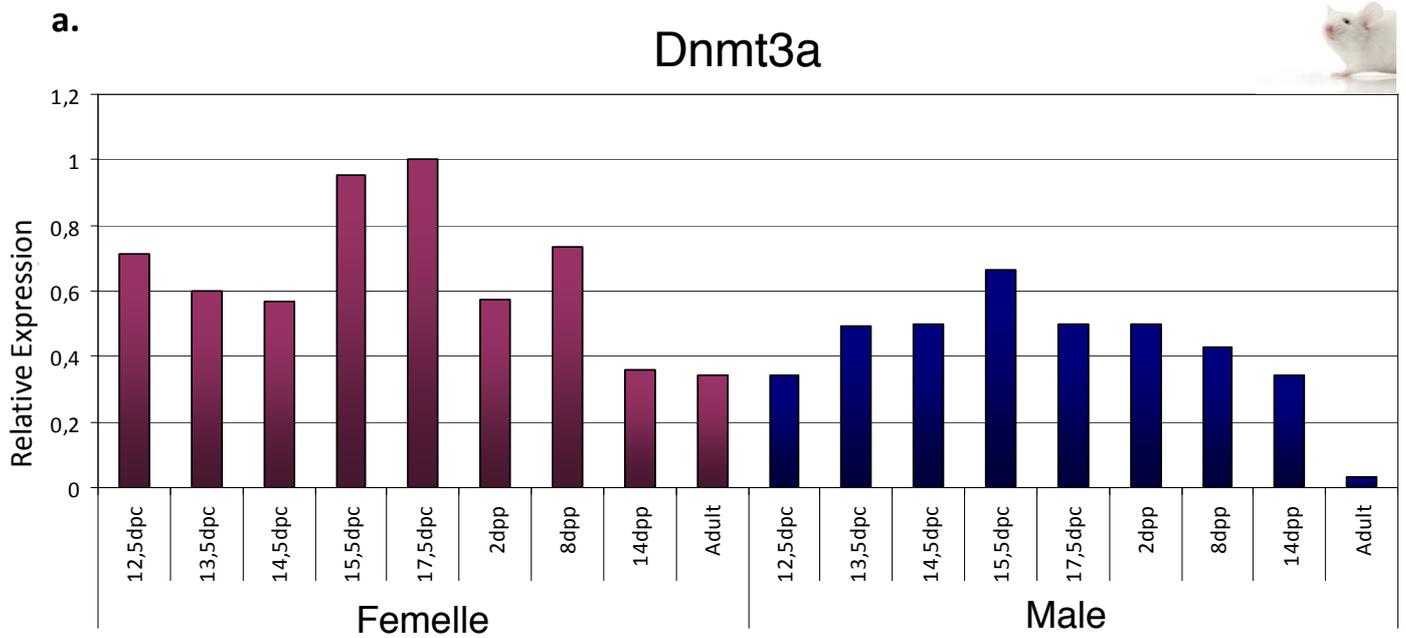


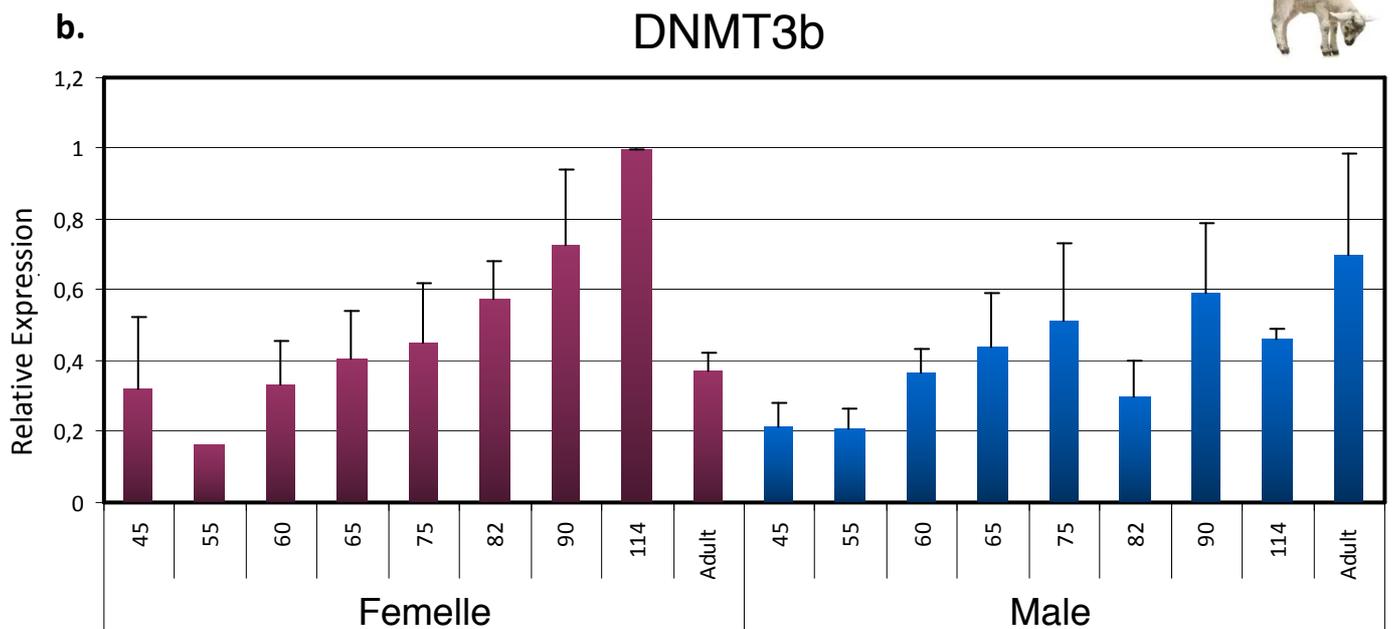
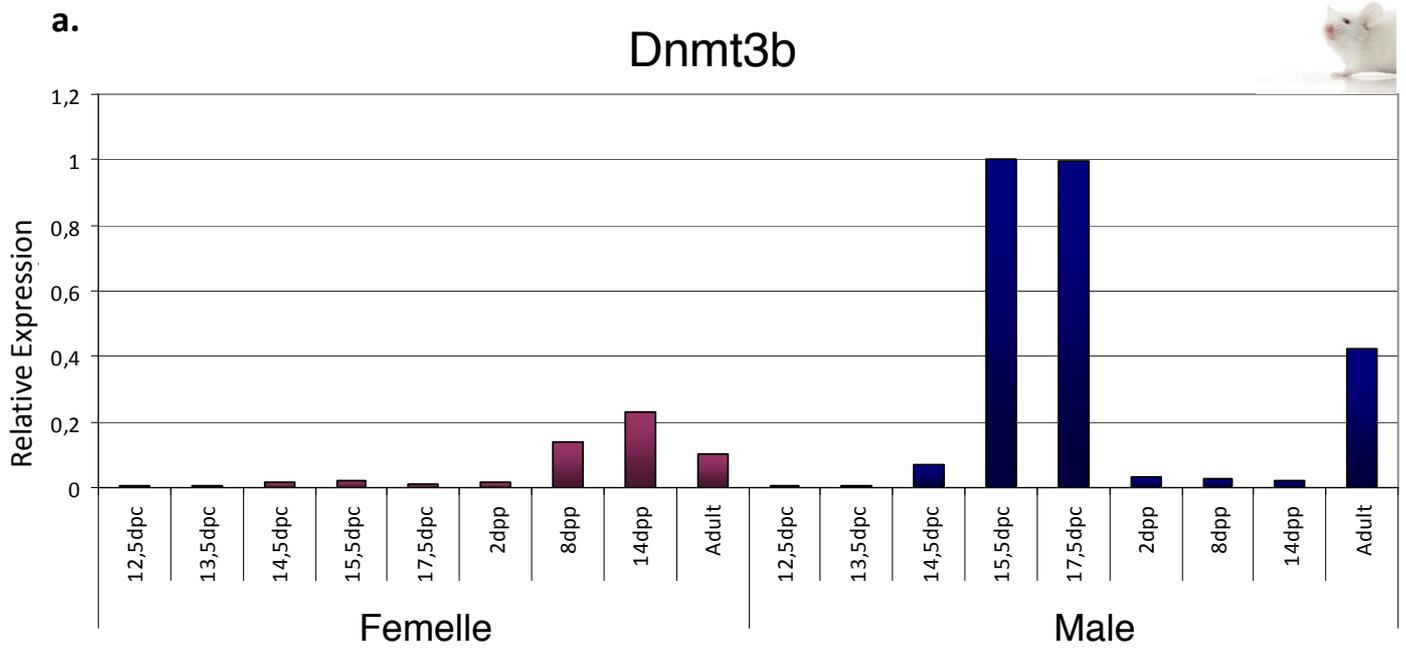
Figure 25 : Analyse par RT-qPCR *PIWIL3* dans les gonades ovines au cours du développement



**Figure 26 : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt1* dans les gonades murines (a.) et *DNMT1* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement**



**Figure 27 : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3a* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3a* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement**



**Figure 28 : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3b* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3b* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement**

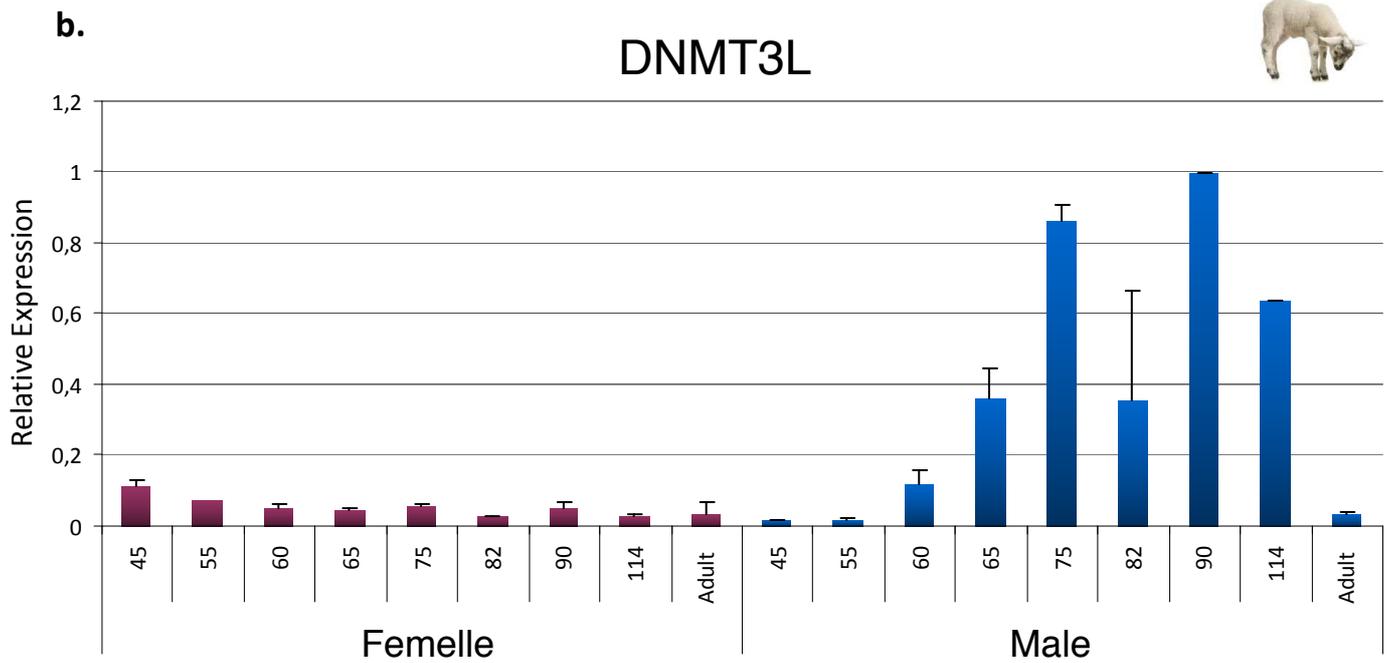
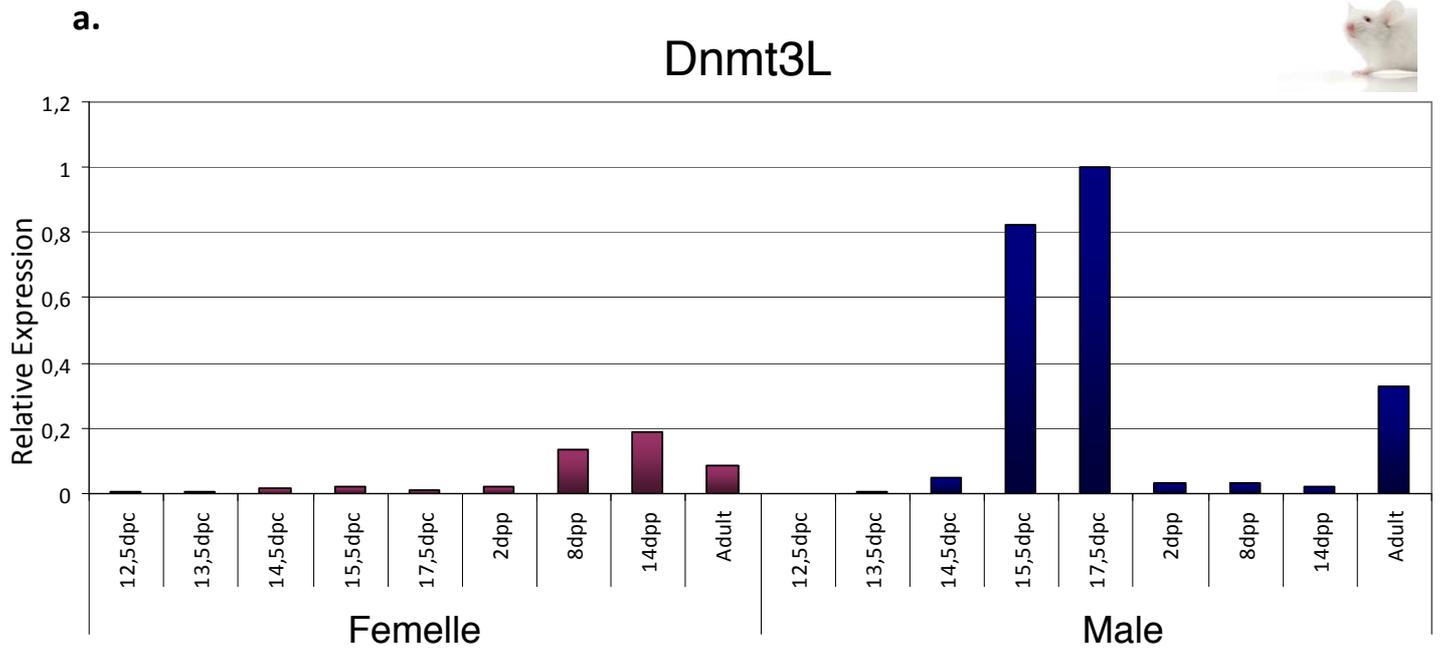
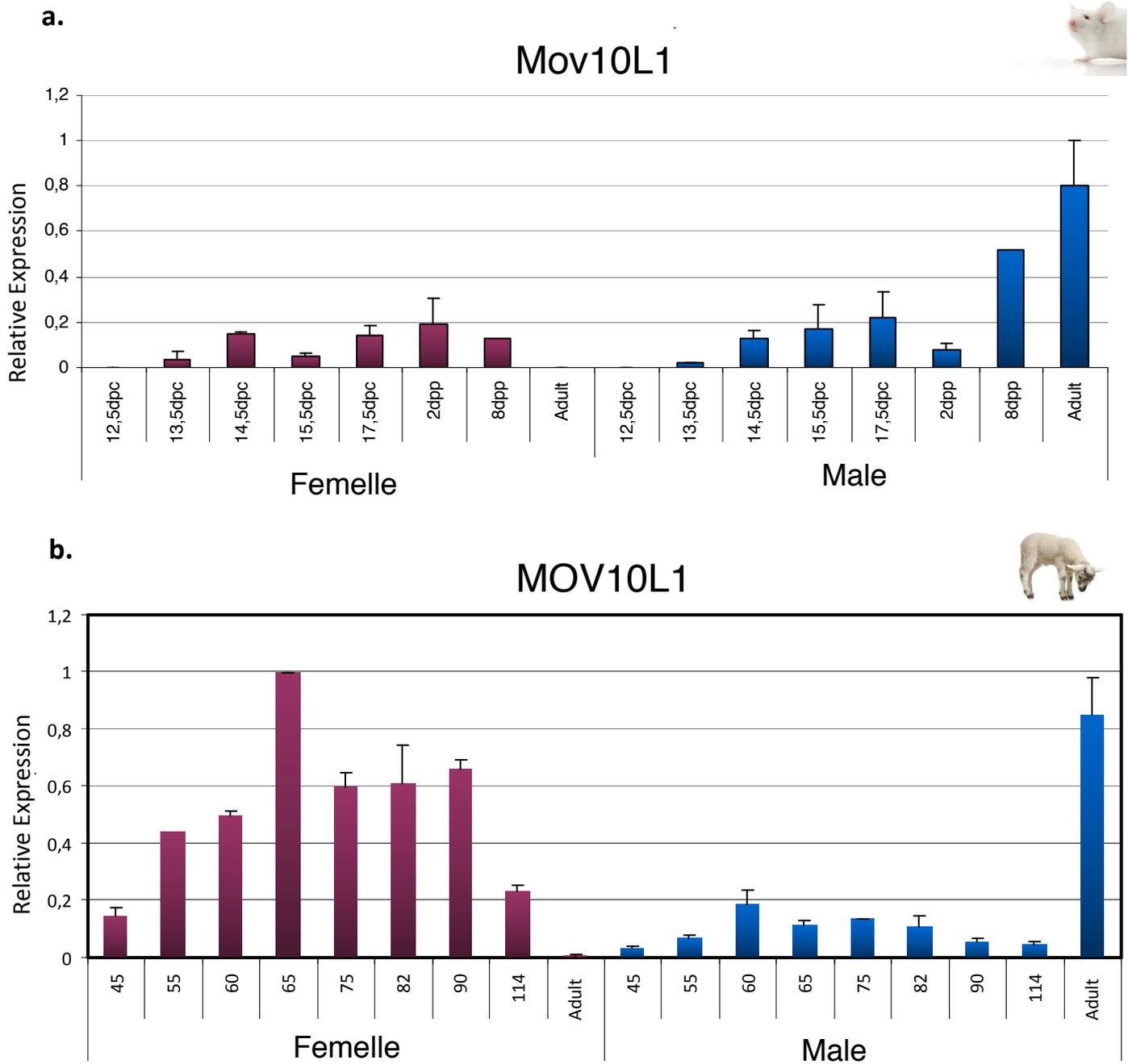
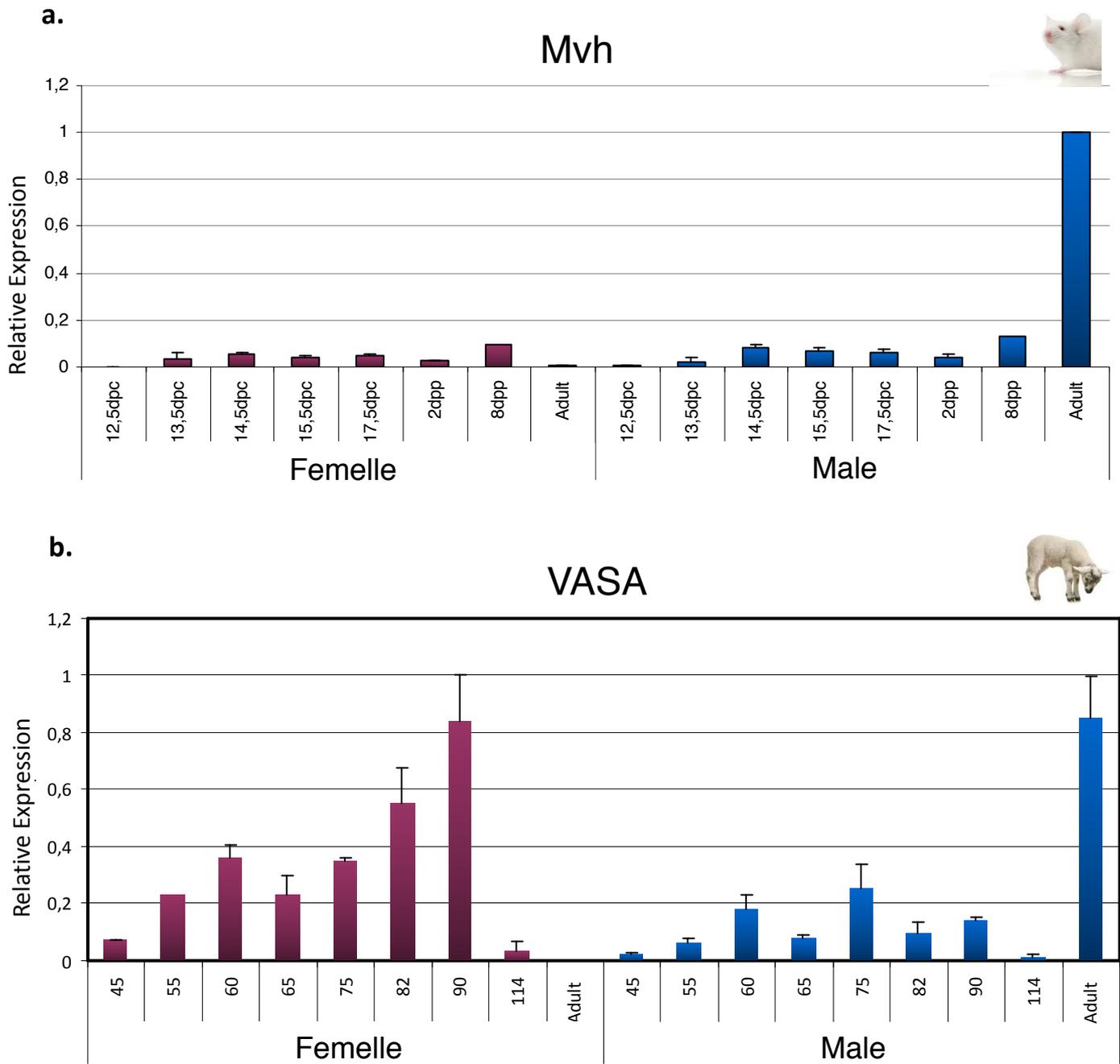


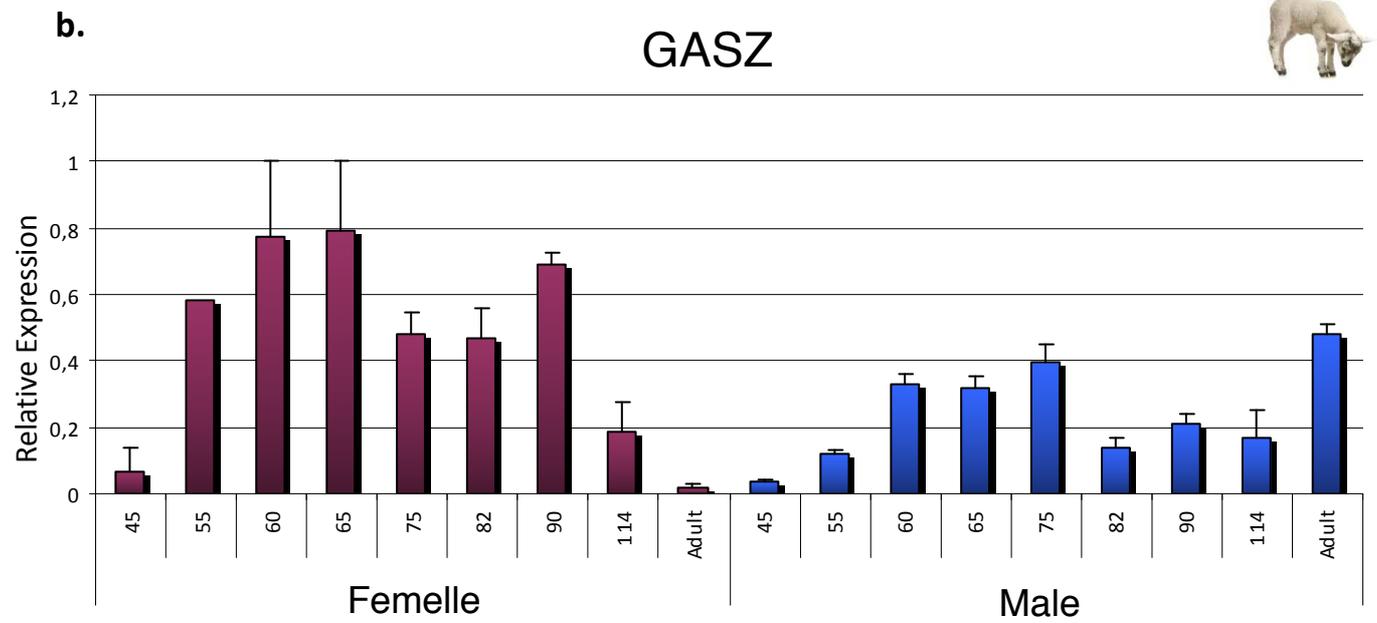
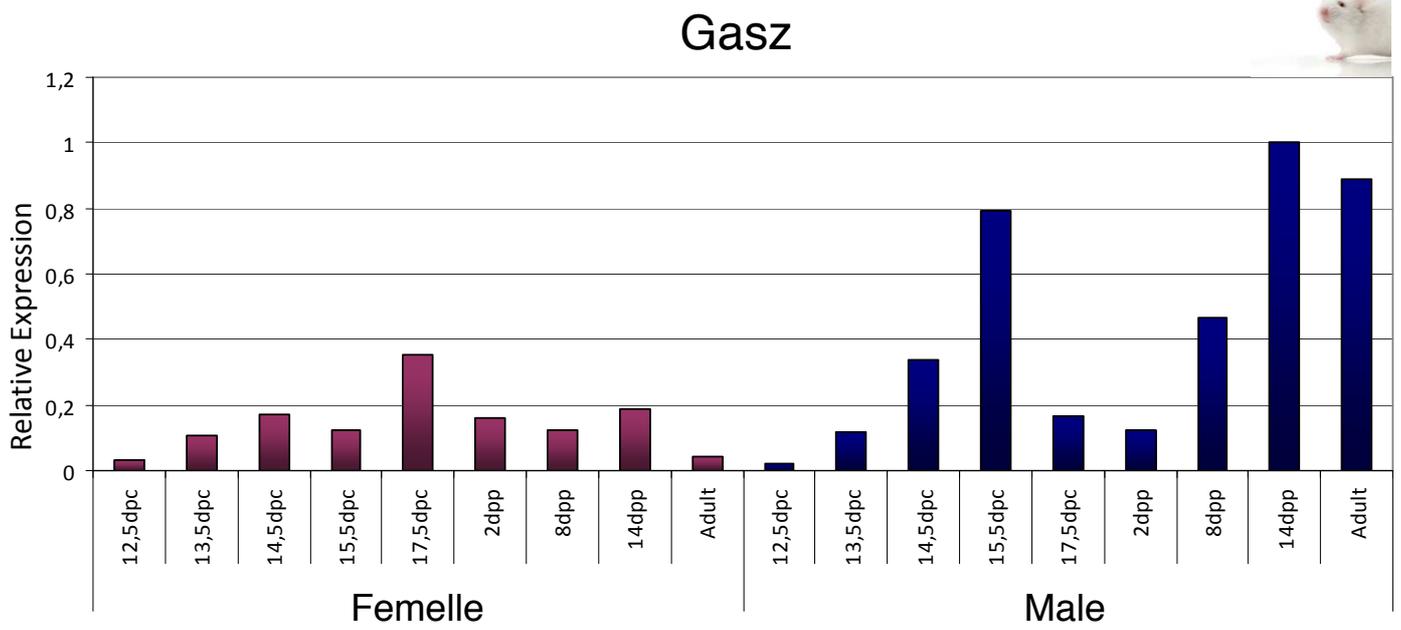
Figure 29 : Analyse par RT-qPCR du gène *Dnmt3L* dans les gonades murines (a.) et *DNMT3L* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement



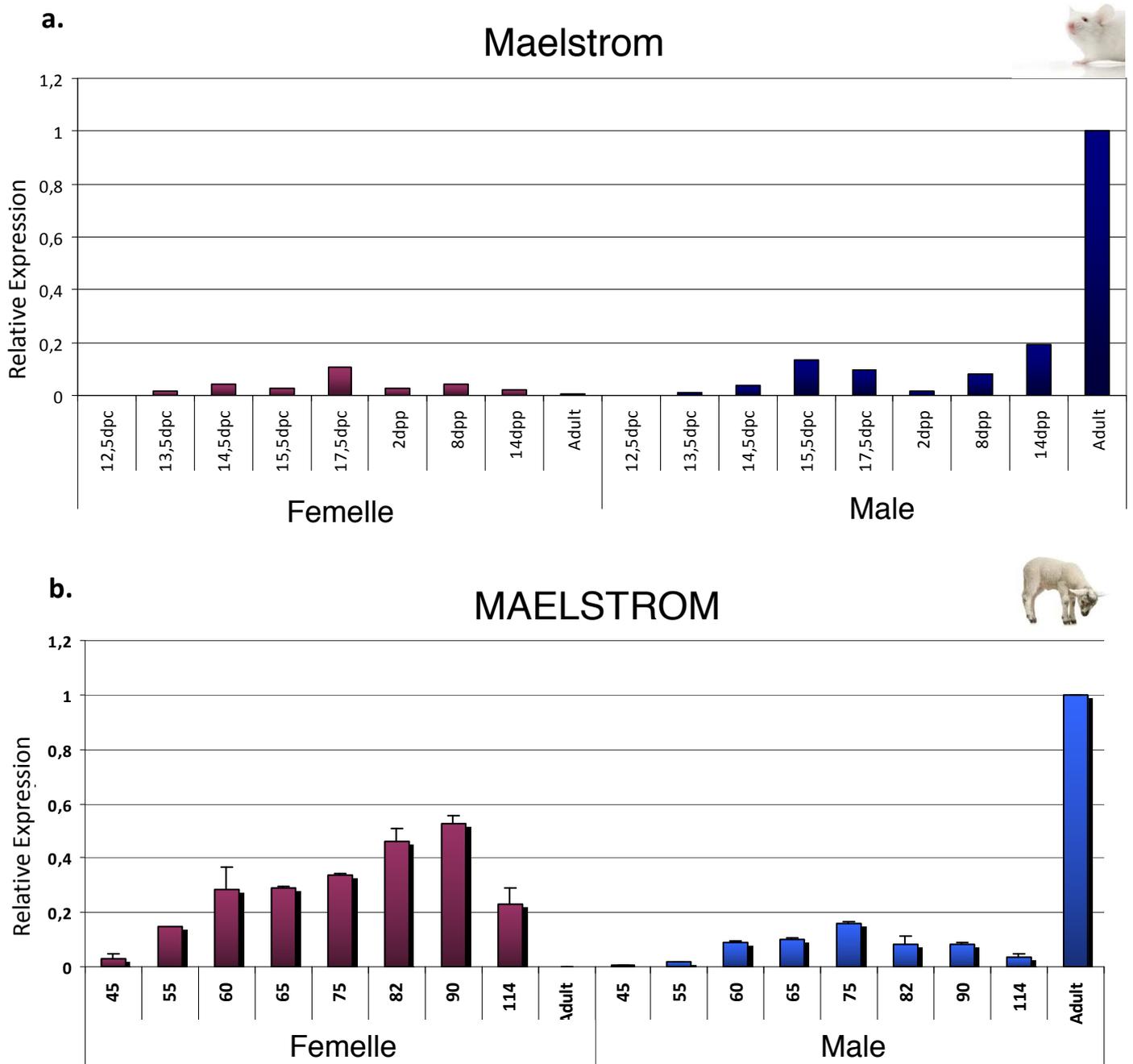
**Figure 30 : Analyse par RT-qPCR du gène *Mov10L1* dans les gonades murines (a.) et *MOV10L1* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement**



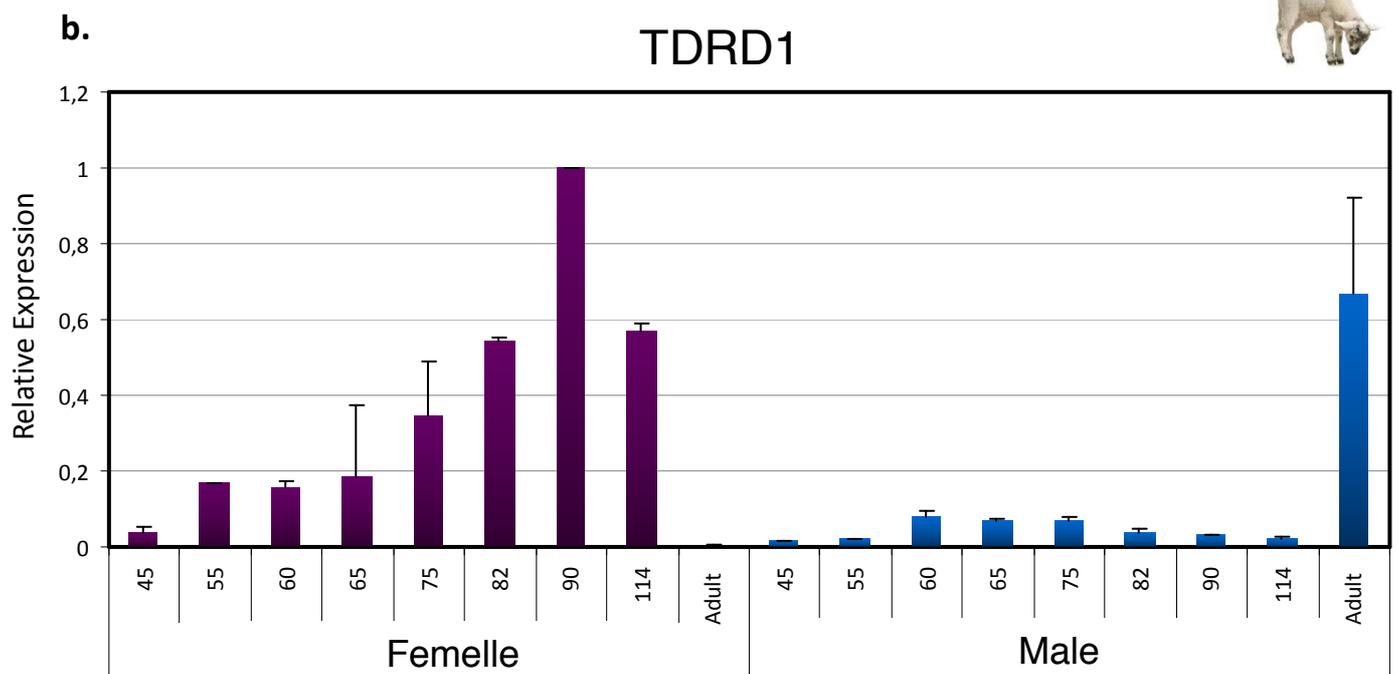
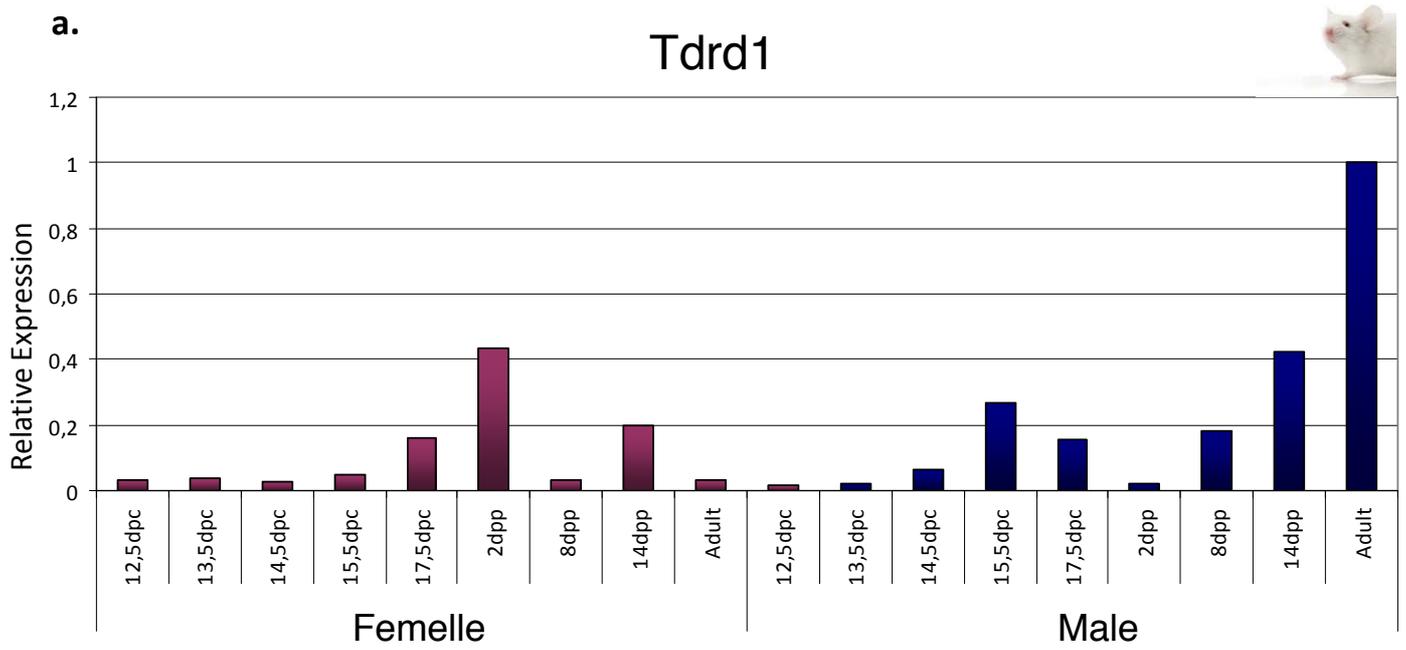
**Figure 31: Analyse par RT-qPCR du gène *Mvh* dans les gonades murines (a.) et *VASA* dans les gonades ovines (b.) au cours du développement**



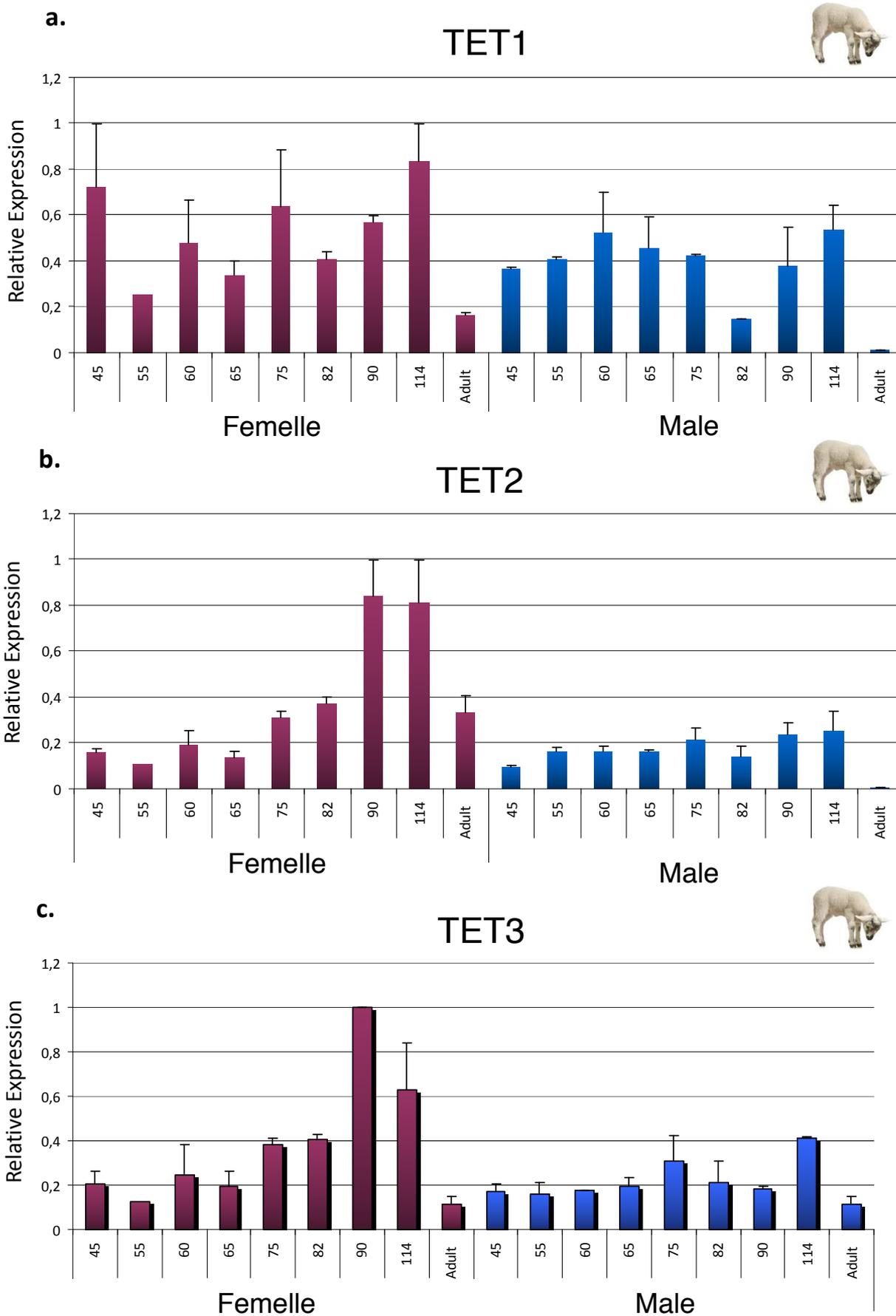
**Figure 32 : Analyse par RT-qPCR du gène *GASZ* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement**



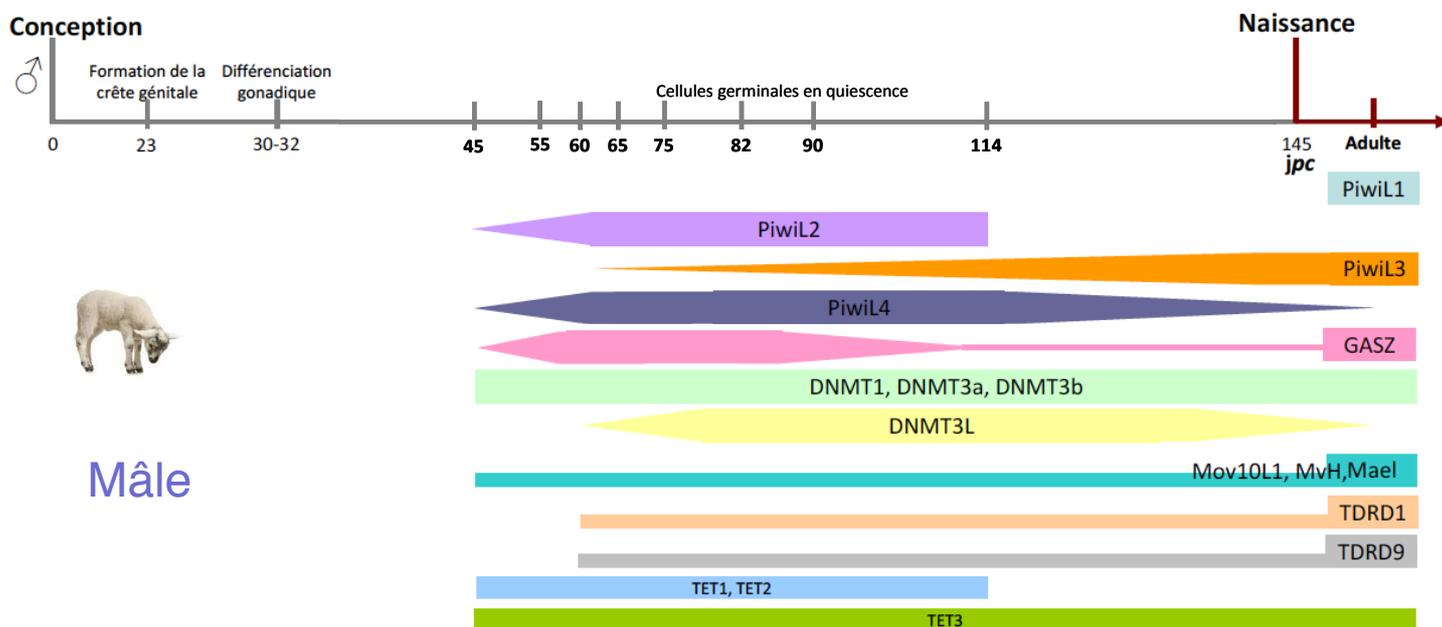
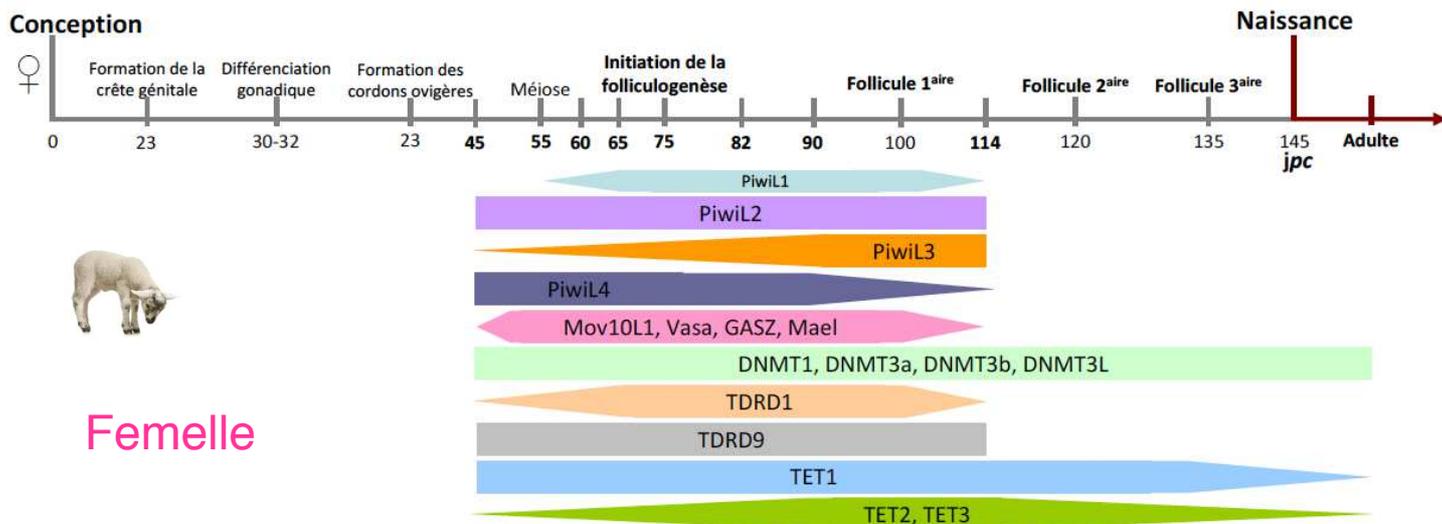
**Figure 33 : Analyse par RT-qPCR du gène *MAELSTROM* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement**



**Figure 34 : Analyse par RT-qPCR du gène *TDRD1* dans les gonades murines (a.) et ovines (b.) au cours du développement**



**Figure 35 : Profils d'expression des gènes *TET1* (a.), *TET2* (b.) et *TET3* (c.) au cours du développement gonadique ovin, par RT-qPCR**



**Figure 36 : Schémas récapitulatifs de l'expression des gènes étudiés au cours du développement gonadique mâle et femelle, dans l'espèce ovine**

# **Matériel & Méthodes**

## Matériel & Méthodes

### Marquage à la $\beta$ -galactosidase

Le marquage à la  $\beta$ -galactosidase a été réalisé selon quatre protocoles différents sur des organes (testicules, épидидyme, cerveau et rein) *Topaz1+/+* et *Topaz1+/-*.

Le premier protocole de coloration est issu de Young *et al.*, 2011. Brièvement, le tissu frais est fixé dans une solution Lac Z Fix (0.2% de glutaraldehyde, 5mM d'EGTA dans du PBS 1X) pendant 4h. L'organe est ensuite incubé dans du sucrose 20% pendant une nuit puis inclus dans du Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek France SAS, Villeneuve d'Ascq, France), stocké à -80°C, puis coupé au CryoStat (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Les coupes sont fixées en LacZ Fix puis lavées dans un Detergent Wash (2 mM de  $MgCl_2$ , 0.01% de  $C_{24}H_{39}NaO_4$ , 0.02% NP-40 dans du PBS 1X). Les lames sont ensuite colorées avec du LacZ Stain (2mM  $MgCl_2$ , 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 5mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 20mM Tris Buffer, pH 7.3, 1mg/mL X-Gal dans du PBS 1X) à 37°C pendant une nuit. Les lames sont ensuite lavées, séchées et montées Eukitt (Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France).

Le deuxième protocole consiste à fixer les organes frais dans du PAF 4%, puis à l'incuber dans du sucrose 10% puis 30% avant de les inclure dans du Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek France SAS, Villeneuve d'Ascq, France) et de les couper au CryoStat (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Les coupes sont fixées au PAF 0.2% puis lavées dans du PBS- $MgCl_2$  (2mM) et du detergent rinse (0.1M tampon phosphate, 2mM  $MgCl_2$ , 0.01% Na Deoxycholate, 0.02% NP-40). Elles sont ensuite incubées à 37°C, plusieurs heures, dans une solution de coloration (5mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 1mg/mL X-Gal dilué dans le detergent rinse). Les lames sont ensuite montées en Eukitt (Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France).

Le troisième protocole suit les recommandations fournies par Millipore (mcproto058, 2007) et utilise les solutions Tissue Fixative (#BG-5-C, Millipore, Billerica, MA), Tissue Rinse Solution A (#BG-6-B, Millipore, Billerica, MA), Tissue Rinse Solution B (#BG-7-B, Millipore, Billerica, MA) et Tissue Stain Base Solution (#BG-8-C, Millipore, Billerica, MA).

Un protocole est réalisé sur des organes inclus directement dans le Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek France SAS, Villeneuve d'Ascq, France) et stockés à -80°C. Ils sont ensuite coupés à l'aide d'un CryoStat (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) et montées sur lame. Les lames sont séchées puis incubées dans du GalFix + EGTA (PAF 4%, 25% glutaraldéhyde, 10% NP-40, 10% NaDC, 250mM EGTA PH 8, 1M  $MgCl_2$  dans du PBS 1X). Les lames sont lavées puis incubées une nuit dans du XGal Stain (0.1mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 0.1mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 1M  $MgCl_2$ , 40mg/mL X-Gal - DMF dans du

**Tableau 2 : Primers utilisés en RT-qPCR**

Primers de RT-qPCR - Murin

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Dnmt1</i>	5' – TTAACCCCTTTGAGCCCCATC- 3'	5' –CAGCTTGGTCACAAAACAAACC- 3'
<i>Dnmt3a</i>	5' – TGAAGTGGGTGCAGTTTACG- 3'	5' –TTGAACCAAACCTCCCTCTGC- 3'
<i>Dnmt3b</i>	5' – TCAGATGAGCAAGGTCAAGG- 3'	5' –TGTACCAAAGCAAGGGGAAG- 3'
<i>Dnmt3L</i>	5' – CCTGACCCCAAAGGAAGAAG- 3'	5' –GAGAAGGCAGTTCTTCACCAG- 3'
<i>Gasz</i>	5' – GCAGAATGAGCGGGAAAATGACCCA- 3'	5' –GCAGCAGCCCGAATCCACACA- 3'
<i>LacZ</i>	5' – TTCAACATCAGCCGCTACAG- 3'	5' –CGTCGATATTCAGCCATGTG- 3'
<i>Mael</i>	5' – GAGCATCTCAAACCTCTCCAAC- 3'	5' –GAGGAGAAAGGTTTGTACCCATC- 3'
<i>Mili</i>	5' – ATGGGTCTTGACACAGCATT- 3'	5' – AAGGATCAGGCAAAGAGGAAC- 3'
<i>Miwi</i>	5' – TGGAGTGGCTGCAATGAATA- 3'	5' – TTGACACGCTTCTTCACCAC- 3'
<i>Miwi2</i>	5' – AACCGGTGGTACAGACACAA- 3'	5' – CGAGCCGCACTCTGTTACAC- 3'
<i>Mov10L1</i>	5' – AGCCTCTGAGGTACAAGCGTGT- 3'	5' –CAAGGAGTCCAGGCTGAAGAAG- 3'
<i>mVh</i>	5' – GCCAGAGGGCTTGATATTGA- 3'	5' – CGCTCTGCCAGTATTTCCAC- 3'
<i>Tdrd1</i>	5' – CTTTGGTTCCTTGCTTCTGG- 3'	5' –GATGAAAAGCCAAGCCATCC- 3'
<i>Topaz1</i>	5' – ACATTGCGTGGCTGTGAGC- 3'	5' – CTCAGGCACATGGACAAACTTG- 3'
<i>Gapdh</i>	5' – GCATCTCCCTCACAATTTCCA- 3'	5' – TGCAGCGAACTTTATTGATGGT- 3'
<i>Mapk1</i>	5' – CCTTCAGAGCACTCCAGAAAGT- 3'	5' – ACAACACCAAAAAGGCATCC- 3'
<i>Ywhaz</i>	5' – GGAGCCCGTAGGTCATCTTG- 3'	5' – CTCGAGCCATCTGCTGTTTTT- 3'

Primers de RT-qPCR - Lapin

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Topaz1</i>	5' – CAAATGTGAATATTGCAGCAGAA- 3'	5' –CCATGGTGGTGTTATTGATTATCCA- 3'
<i>Cpr2</i>	5' – TCACCCTGCCTCACCTGTG- 3'	5' –TCGTGCACCAGGCTGAAGA- 3'
<i>H2AFX</i>	5' – ACCTGACGCGCAGATCCT- 3'	5' –CGCCCAGCAGCTTGTTGAG- 3'
<i>Ywhaz</i>	5' – AGCAATGGCTTCATCAAAAAGC- 3'	5' –AGCAATGGCTTCATCAAAAAGC- 3'

Primers de RT-qPCR- Ovin

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
<i>DNMT1</i>	5' – CTCAGAAGGGAGACGTGGAG- 3'	5' –AAGGAGACCACCAGGGAGTT- 3'
<i>DNMT3a</i>	5' – GTGAGGGCAAATCGAGGTAG- 3'	5' –TCTCCATCCTCACGTTGTTG- 3'
<i>DNMT3b</i>	5' – ATCTTCGGCTTCTCTGTGC- 3'	5' –GAAGAGGTGTCCGATGACAG- 3'
<i>DNMT3L</i>	5' – ATGAGCAACTGGGTCTGCTT- 3'	5' – GCCTCCCGTCCATAGAAGG- 3'
<i>GASZ</i>	5' – GGGGTTCTTCTTTTCATCTGC- 3'	5' –TGGCAAAGAAGGTAGTTACAGTG- 3'
<i>MAEL</i>	5' – ACCCATCTGGGGTGAATAATC- 3'	5' –GATATTGCTGGAGGAAGTGGAG- 3'
<i>MOV10L1</i>	5' – TTTGGGATTCTGTCCAACCTC- 3'	5' –TGACAAGGACATGAGGGTTTT- 3'
<i>PIWIL1</i>	5' – ATTCGTGTTCTGCTCCTTG- 3'	5' –TGACAGTGACAGATTGTTCTC- 3'
<i>PIWIL2</i>	5' – TACCGTGACGGAGTGTCTGA- 3'	5' –ACACCACCATCTTGGGATGA- 3'
<i>PIWIL4</i>	5' – TGTGCTTGCTCAGACGTTGA- 3'	5' –GCTCACCCCGAGTTTACAG- 3'
<i>PIWIL3</i>	5' – GTATCATCCGAGTTCCTGCTC- 3'	5' –CAGAGATTGCTGTGTTGTTG- 3'
<i>TET1</i>	5' – CCTTGGGAGTATGGAAAACC- 3'	5' –GCTTTTGCACCAGAAATGTG- 3'
<i>TET2</i>	5' – CCTGGGCTTTTGAATCAGAG- 3'	5' –GAGGCTGGGGAGAATAGGAG- 3'
<i>TET3</i>	5' – TAAGGAGAAGAAGGGGATGG- 3'	5' –TGACCTTCGTGTAGGCATAGG- 3'
<i>TDRD1</i>	5' – CGGTGTCAGTTGAGAAGTGTTC- 3'	5' –TTGCCAGACCATACATCACC- 3'
<i>TOPAZ1</i>	5' – TTCATTAAGCATGACCGTCAA- 3'	5' –CCGGCCCACTTCATATTCTCT- 3'
<i>VASA</i>	5' – CGAGGGCTGGATATTGAAAA- 3'	5' –TGCCAGTATTTCCACAACGA- 3'
<i>GAPDH</i>	5' – CACTACCATGGAGAAGGCTGG- 3'	5' –GTGGTTCACGCCCATCAC A- 3'
<i>HPRT1</i>	5' – GAACGGCTGGCTCGAGATGT- 3'	5' –TCCAACAGGTCGGCAAAGAA- 3'
<i>YWHAZ</i>	5' – GGAGCCCGTAGGTCATCTTG- 3'	5' – CTCGAGCCATCTGCTGTTTTT- 3'

PBS 1X). Les lames sont ensuite lavées et montées en Eukitt (Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France).

Le dernier protocole est réalisé sur coupes incluses en paraffine, traitées comme pour l'histologie (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, soumis). Les coupes sont lavées dans du 10% Tween-20/PBS 1X puis fixées dans du PAF 4%. Après lavage, les coupes sont incubées dans (4mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 4mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 0.1% Triton X-100, 4mM  $MgCl_2$ , 20mg/mL X-Gal dans du PBS 1X) à 32°C pendant une nuit. Les coupes sont ensuite lavées, fixées au PAF 4% une nuit puis traitées dans des bains de méthanol progressifs avant d'être montées en Eukitt (Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France).

Pour chaque protocole, nous avons utilisé la X-Gal Stock Solution (#BG-3-G, Millipore, Billerica, MA) ou de la 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside en poudre (B4252, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

### **Etude protéomique par LC MS/MS**

L'étude LC-MS/MS a été réalisée sur des testicules adultes de souris *Topaz1+/+* et *Topaz1/-* (n=4). L'extraction protéique a été réalisée comme décrit dans Luangpraseuth-Prosper *et al.*, soumis. Cette étude a été réalisée sur la plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) du centre de Jouy-en-Josas, à l'aide d'un ORBITRAP Discovery (ThermoFinnigan).

### **RT-qPCR ovin, lapin et murin**

Les RT-qPCR ont été réalisées sur des profils d'expression ovin contenant 9 stades de 45jpc à l'adulte, pour chaque sexe. Chaque stade correspond à deux pools de 3 gonades.

Le profil lapin est composé de 12 stades par sexe, de 14jpc à l'adulte. Chaque stade correspond à au moins 3 individus.

Le profil murin présente 7 stades par sexe, de 12.5jpc à l'adulte. Chaque stade correspond à un ou deux pool de 3 gonades.

L'extraction d'ARN et la transcription inverse sont réalisées comme décrit dans l'article Luangpraseuth *et al.*, soumis. La PCR quantitative est réalisée avec du Master Mix Sybr Green (Thermo Scientific, Illkirch, France). Pour les profils ovins et murins, la qPCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur RealPlex (Eppendorf France SAS, Montesson, France), le profil lapin est lui réalisé avec un thermocycleur Step One. Les gènes de référence utilisés afin d'étudier l'expression relative des gènes sont *Ywhaz*, *Gapdh* et *Mapk1* pour la souris, *Gapdh*, *Ywhaz* et *Hprt1* pour l'ovine et *Ywhaz*, *Cpr2* et *H2AX* pour le lapin.

La liste des primers est donnée dans le **Tableau 2**.

Les résultats sont analysés et traités comme décrit dans l'article.

## **Discussion générale**

## Discussion Générale

### I. Expression de *TOPAZ1* dans les cellules germinales mâles

#### A. Données chez l'homme et le rat

Le gène *Topaz1* est exprimé spécifiquement dans les cellules germinales avec une forte expression pendant la méiose mâle. Des études par HIS montrent que les transcrits *Topaz1* sont retrouvés spécifiquement dans les spermatocytes. Comme chez la souris, *TOPAZ1* est spécifiquement exprimé dans le testicule humain, il n'est pas exprimé dans le cerveau, le foie et le placenta (communication personnelle de F. Chalmel, Inserm U1085, Université de Rennes 1). De plus, chez l'homme et la souris, l'expression des transcrits *Topaz1* est spécifique des spermatocytes en pachytène et est également retrouvé, à un niveau beaucoup plus faible, dans les spermatides (communication personnelle de F. Chalmel). Chez le rat, les transcrits *Topaz1* ne sont retrouvés que dans les spermatocytes en pachytène (communication personnelle de F. Chalmel, issue de GermOnline; <http://www.germonline.org/>).

De part son expression très spécifique au cours de la spermatogenèse chez l'homme, il serait intéressant d'étudier le gène *TOPAZ1* chez l'humain et en particulier chez des hommes infertiles azoospermiques. En collaboration avec des cliniciens, il pourrait être recherché des mutations dans le gène *TOPAZ1* chez ces patients. En effet, *TOPAZ1* pourrait être un bon gène candidat pour expliquer certaines azoospermies non obstructives.

#### B. Profils d'expression chez le mouton et le lapin

Le profil d'expression ovin de *TOPAZ1* (Baillet *et al.*, 2011, Article en annexe) présente une forte expression de ce gène dans l'ovaire fœtal au moment de la méiose. Cette forte expression ovarienne, comparable à celle d'un gène de méiose comme *DMC1*, n'est pas retrouvée dans l'ovaire murin. *TOPAZ1* pourrait donc avoir un rôle également dans l'ovaire chez l'espèce ovine. En effet, l'inactivation ou des mutations de gènes impliqués dans le développement ovarien, comme *FoxL2*, *Bmp15* et *Gdf9*, n'ont pas le même effet chez la souris et les ruminants. Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'absence d'expression du gène *FoxL2* conduit à une inversion sexuelle de type mâle XX chez la chèvre (Boulanger *et al.*, 2014) tandis que les souris *FoxL2*<sup>-/-</sup> présentent un défaut de folliculogenèse (insuffisance ovarienne précoce) sans inversion sexuelle (Schmidt *et al.*, 2004 ; Uda *et al.*, 2004). De plus, les invalidations à l'état hétérozygote des gènes ovocytaires *Gdf9* et *Bmp15* impliqués dans la folliculogenèse n'ont pas d'impact sur la fertilité des souris femelles (Dong *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 2001). Chez la brebis, les mutations naturelles de ces deux gènes provoquent, dès l'hétérozygotie, une augmentation du taux d'ovulation (Hanrahan *et al.*, 2004 ; Bodin *et al.*, 2007). A l'état homozygote, la perte de fonction de *Bmp15* entraîne une baisse de fertilité chez la souris (Yan *et al.*, 2001) et une insuffisance ovarienne primaire conduisant à une infertilité chez

certaines races de brebis (Galloway *et al.*, 2000; Bodin *et al.*, 2007; Hanrahan *et al.*, 2004; Martinez-Royo *et al.*, 2008)). Ces résultats montrent que la mutation de certains gènes impliqués dans le développement ovarien peut avoir un effet différent voire contraire chez la souris et la brebis, avec un effet généralement plus drastique chez les ovins. Alors que l'inactivation de *Topaz1* chez la souris n'induit pas de phénotype ovarien, on pourrait supposer qu'il entraîne une perturbation de la fertilité chez la brebis.

Chez le mâle, comme pour l'espèce ovine, on pourrait envisager qu'une mutation du gène *TOPAZ1* chez l'humain puisse avoir un effet sur la spermatogenèse dès l'hétérozygotie. C'est le cas par exemple du gène *SCP3* dont l'inactivation chez la souris provoque un arrêt précoce des spermatocytes tandis que, chez l'homme, ce phénotype est observé dès l'hétérozygotie (Miyamoto *et al.*, 2003). De même, la mutation du gène *CREM* (cAMP Responsive element modulator) se traduit par un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatides rondes à l'état hétérozygote chez l'homme, alors qu'il faut aller jusqu'à l'homozygotie chez la souris pour obtenir ce phénotype (Vouk *et al.*, 2005). Pour explorer cette hypothèse, une inactivation du gène *Topaz1* pourrait être envisagée dans une autre espèce de mammifères. Le coût et le temps de génération étant élevés pour l'espèce ovine, l'inactivation dans cette espèce serait longue et coûteuse. Le lapin, espèce où le développement gonadique est plus proche des ruminants que ne l'est la souris, pourrait être un modèle intéressant car nous avons montré que le profil d'expression de *Topaz1* était comparable à celui de la brebis avec une expression de *Topaz1* qui augmente au moment de la méiose femelle et un pic d'expression pendant la folliculogenèse (niveau comparable à celui atteint pendant la méiose mâle). Cette inactivation pourrait être réalisée en utilisant les nouveaux outils de modification génétique comme des nucléases Crisp/Cas9 dirigée contre *TOPAZ1*. Des inactivations dans chacun des domaines séparément pourraient aussi être testées.

Comme décrit précédemment, le gène *Topaz1* présente un domaine PAZ dans l'exon 2, décrit dans les protéines impliquées dans la répression génique post-transcriptionnelle, ainsi qu'un domaine doigt de zinc CCCH dans l'exon 8, décrit pour se lier à l'ARN (Hall *et al.*, 2005). L'inactivation de *Topaz1* étant totale dans notre modèle murin, nous ne sommes pas en mesure de définir le rôle de chaque domaine dans la spermatogenèse. L'analyse phylogénétique de la protéine TOPAZ1 montre que la séquence peptidique à partir du domaine doigt de zinc CCCH est conservée chez de nombreux Vertébrés dont les poissons (Zebrafish). La séquence du gène *Topaz1* de ces espèces est donc plus courte et ne possède pas de domaine PAZ. Une inactivation de *Topaz1* chez le poisson zébre permettrait donc d'étudier son rôle et plus précisément celui via son domaine CCCH dans la gamétogenèse de cette espèce. Une collaboration a été initiée dans ce sens avec l'équipe de Yann Guiguen (INRA, Rennes).

## II. Rôle de *Topaz1* dans la spermatogenèse

### A. Comparaison avec des modèles murins présentant un phénotype similaire

Dans le but d'ouvrir de nouvelles pistes d'investigation, nous avons cherché, dans la littérature, des gènes dont l'inactivation chez la souris produit un phénotype reproductif correspondant à une stérilité complète, spécifique du mâle, causant une perturbation en fin de prophase I ou lors de la première division méiotique avec des défauts cellulaires comparables à ceux observés dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup>.

#### 1. Stérilité liée à la régulation des ARNs

La protéine TOPAZ1 possède un domaine PAZ et un domaine doigt de zinc CCCH. Ces types de domaine ont été décrits comme liants les ARNs et pouvant ainsi réguler différentes étapes du métabolisme des ARNm (épissage des pré-ARNm, stabilité, transport d'ARNm ...) (Brown, 2005 ; Tanaka Hall, 2005). Parmi les protéines contrôlant la stabilité et la traduction des ARNm, on distingue les RNA-binding protéines (RBP) qui gouvernent le destin des ARNm au cours de la spermatogenèse et ce contrôle de l'expression des ARNm est crucial. En effet, durant la spermatogenèse et grâce aux protéines de transition et aux protamines, la chromatine se compacte, ce qui cause une répression de la transcription (Kimmins and Sassone-Corci, 2005). Or, la différenciation des spermatides en spermatozoïdes nécessite la synthèse de protéines, cette synthèse est basée sur le stockage et le contrôle traductionnel d'ARNm transcrits dès les étapes précoces de méiose ou bien en post-méiose (Steger *et al.*, 1999, 2001). Ainsi, de nombreux ARNm sont stockés dans des ribonucléoprotéines (RNP) puis dans des polysomes où ils seront activement traduits (Iguchi *et al.*, 2006).

Dans les cellules germinales, les ARNm seraient stockés et traités dans une structure cytoplasmique périnucléaire appelée le nuage, ou chromatoid body (Parvinen *et al.*, 2005). Dans le nuage, on retrouve la protéine MIWI, l'une des RBP décrite dans la littérature comme ayant un rôle crucial dans la différenciation des spermatides et dont l'inactivation cause un arrêt de la spermatogenèse aboutissant à une stérilité mâle (Deng *et al.*, 2002). MIWI présente, comme TOPAZ1, un domaine PAZ mais son expression est plus tardive (en spermatides rondes).

Une autre RBP composant le nuage est HUR/ELAVL1 (Human antigen R ou Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1). Cette protéine HUR/ELAVL1 s'accumule dans les spermatocytes en pachytène, disparaît aux stades diplotène-métaphase et est à nouveau observée dans les spermatides rondes (Nguyen Chi *et al.*, 2011). L'inactivation conditionnelle de *HuR* dans les cellules germinales se traduit par une stérilité mâle avec perte complète des spermatozoïdes. Comme pour les souris *Topaz1*<sup>-/-</sup>, les testicules ainsi invalidés pour *HuR* présentent des spermatocytes en pachytène normaux, sans perturbation ni de l'appariement des chromosomes, ni de la formation du sex body (Nguyen Chi *et al.*, 2011). Le site putatif de liaison par HUR/ELAVL1 serait constitué de

pentamères AUUUA en 3'UTR et de séquences riches en U. On retrouve ces sites putatifs de liaison dans les gènes *Hsp70-2* (Mukherjee *et al.*, 2009), *CyclineA1* (Nickerson *et al.*, 2007), *Gal3st1* (Honke *et al.*, 2002), *Dmrt7* (Kawamata and Nishimori, 2006) et *Parp2* (Quenet *et al.*, 2009). Tous ces gènes sont impliqués dans la spermatogenèse.

Cependant, *Topaz1* ne semble pas être une cible potentielle de HUR car sa séquence en 3'UTR ne présente pas de pentamères AUUUA, ni de séquences riches en U. Par contre, l'analyse de nos transcriptomes montre que l'absence de *Topaz1* au cours du développement (de 15 à 20jpp) diminue l'expression de *Hur/Elavl1* par rapport à un développement normal. *Topaz1* pourrait donc être important pour la régulation de l'expression de *Hur/Elavl1*. De plus, la présence des deux domaines, PAZ et de type doigt de zinc, suggère que TOPAZ1 pourrait avoir un rôle indispensable dans la liaison d'ARNs et faire partie des RBP indispensables à la spermatogenèse et spermiogenèse, au moins chez la souris.

## 2. Stérilité liée à la perturbation du MPF

L'une des cibles de HUR/ELAVL1 est *Hsp70-2* (*Heat shock protein 2*, HSPA2), une protéine chaperonne (aide à l'assemblage des complexes protéiques), exprimée pendant la phase méiotique chez le mâle (Rosario *et al.*, 1992). Comme pour les souris *Topaz1*<sup>-/-</sup>, l'inactivation du gène *Hsp70-2* conduit à une stérilité mâle complète avec une absence de cellules germinales post-méiotiques (Dix *et al.*, 1996). Les cellules germinales entrent en apoptose en fin de prophase I de méiose, lors de la transition G2/M.

La transition G2/M nécessite la formation du MPF (*Maturation Promoting Factor*) dans les spermatocytes en pachytène. Le MPF est composé d'une sous-unité catalytique Cdc2 et d'une sous-unité régulatrice cycline B1. En cas d'interférence dans la formation ou l'activation du MPF dans le testicule, on observe un blocage en transition G2/M de première division de méiose. Il a été montré que HSP70-2 est nécessaire pour la formation du complexe Cdc2/Cycline B1 et pour activer la fonction kinase de Cdc2 (Zhu *et al.*, 1997).

HSP70-2 appartient à la famille des protéines de choc thermique et, dans le testicule, la moindre élévation de température provoque un arrêt de la spermatogenèse, ce qui doit impliquer des protéines de régulation thermique.

De plus, il a été observé que les composants du MPF (Cdc2 et Cycline B1) sont des partenaires d'une autre protéine de choc thermique : HSP90 $\alpha$  (Munoz *et al.*, 1999 ; Caldas-Lopes *et al.*, 2009). Comme pour l'inactivation d'*Hsp70-2* et de *Topaz1*, la perte de fonction d'*Hsp90 $\alpha$*  se traduit par une stérilité uniquement chez le mâle avec arrêt de la spermatogenèse en fin de prophase I de méiose (Grad *et al.*, 2010).

L'analyse de nos transcriptomes a montré que l'expression de *Hsp70-2* n'est pas perturbée entre 15 et 20jpp dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> (ni celle de *Cdc2* et *CyclineB1*), cependant l'expression d'une autre HSP, *Hspa8*, est diminuée par l'absence de *Topaz1*. *Topaz1* pourrait donc être impliqué directement ou indirectement (via la sous-expression de HuR par exemple) dans l'expression normale de certaines HSP et ainsi, directement ou non, dans la formation et l'activation du MPF permettant la transition G2/M.

Les différentes cibles connues de HuR (*Gal3st1*, *Dmrt7* et *Parp2*) ne sont pas statistiquement différenciellement exprimées dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> en comparaison avec les *Topaz1*<sup>+/+</sup>, à 20jpp.

Il serait donc crucial d'étudier les éventuels partenaires de TOPAZ1 (si nous parvenons à disposer d'un anticorps dirigé contre TOPAZ1 qui le permet) ainsi que l'activité du complexe MPF, par co-immunoprécipitation du complexe Cdc2/cyclineB1 ou par étude de l'activité kinase, dans la lignée de souris *Topaz1*<sup>-/-</sup> afin de préciser la fonction de ce gène.

### **3. Stérilité liée au désappariement des chromosomes**

Par ailleurs, HSP70-2 est un composant de l'élément latéral du complexe synaptonémal chez la souris (Allen *et al.*, 1996) mais il n'est pas indispensable à sa formation. Cependant, le désappariement des chromosomes homologues ne peut pas se faire en fin de pachytène chez les souris *Hsp70-2*<sup>-/-</sup>, ce qui suggère qu'HSP70-2 est indispensable (indirectement ou non) au désassemblage du complexe synaptonémal et ainsi à l'aboutissement de la méiose I.

Le désassemblage du complexe synaptonémal est une étape critique pour acquérir une structure de bivalents (chromosomes homologues liés) fonctionnelle.

Compte tenu de ces résultats, il serait très intéressant d'étudier le désassemblage du complexe synaptonémal ainsi que le désappariement des chromosomes en fin de prophase I de méiose dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup>. Cela pourrait être fait en réalisant un traitement des spermatocytes avec un inhibiteur de la phosphatase, l'acide okadaïque, qui induit l'entrée en métaphase I. Ce protocole permet d'obtenir un nombre élevé de spermatocytes en métaphase I, rendant l'analyse plus aisée. Une immunofluorescence sera ensuite réalisée avec un anticorps anti-Tubuline  $\beta$ , pour marquer le fuseau méiotique, et un anticorps anti-Histone H3 phosphorylé afin de visualiser les chromosomes en métaphase, pour étudier la formation et la structure du fuseau et déterminer si les chromosomes sont correctement alignés sur le fuseau, par imagerie confocale. Il serait également intéressant de connaître la localisation précise de TOPAZ1 au cours de la transition spermatocytes-spermatides et ses éventuels partenaires. Pour cela, il faudrait pouvoir disposer d'un anticorps dirigé contre TOPAZ1 et réaliser des immunohistochimies sur des coupes de testicules murines puis, si TOPAZ1 se localise

dans le noyau, sur des étalements de chromosomes pour voir si TOPAZ1 se localise sur les chromosomes, au niveau du complexe synaptonémal ou au niveau des kinétochores, par exemple.

## **B. Domaines fonctionnels**

Comme décrit précédemment (Baillet *et al.*, 2011, Article en annexe), la protéine putative TOPAZ1 contient deux domaines putatifs : un domaine PAZ et un domaine CCCH. Le domaine PAZ est décrit pour se lier avec l'extrémité 3' des petits ARNs (Yan *et al.*, 2003). On retrouve ce domaine dans les protéines Piwi et Dicer impliquées dans la répression post-transcriptionnelle des gènes. Ce domaine PAZ est hautement conservé entre les différentes espèces étudiées. Cependant, ce domaine n'est retrouvé que chez les mammifères tandis que le domaine CCCH est retrouvé jusque chez les poissons. Ce qui suggère une fonction plus ancestrale de ce domaine que le domaine PAZ. Le domaine CCCH retrouvé dans la protéine TOPAZ1 présente une conformation de domaine zinc-finger de type C-x8-C-x5-C-x3-H chez l'humain, l'ovine et la souris. Les protéines présentant un domaine doigt de zinc de type CCCH sont décrites comme étant des protéines de liaison à l'ARN avec un rôle dans la régulation du métabolisme des ARNs (Tanaka Hall *et al.*, 2005). L'inactivation du gène *Topaz1* chez la souris n'ayant pas d'effet sur l'expression des rétrotransposons, le domaine PAZ de ce gène ne semble pas impliqué dans leur régulation. Ce domaine n'est peut-être pas fonctionnel chez la souris. Le phénotype observé chez les souris *Topaz1*<sup>-/-</sup> pourrait être causé par la perte de fonction du domaine CCCH. En effet, l'inactivation de *Topaz1* conduit à une absence d'expression de certains gènes, dont des lncRNAs tels que *4930463016Rik* par exemple, dès 15jpp, donc avant l'arrêt de la spermatogenèse, ce qui suggère un rôle crucial de TOPAZ1 dans la régulation génique. Le domaine CCCH peut avoir un rôle à tous les stades du métabolisme des ARN : excision des pré-ARNm, transport des ARNm, localisation subcellulaire, stabilité, dégradation... TOPAZ1, via son domaine CCCH, pourrait donc contrôler la stabilité, inhiber la dégradation ou stimuler la transcription de certains ARNs indispensables à la méiose mâle chez la souris.

## **C. Gènes cibles de *Topaz1***

Les études transcriptomiques réalisées à partir de testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> à 15 et 20 jpp comparés avec des testicules *Topaz1*<sup>+/+</sup> aux mêmes stades de développement ont mis en évidence des transcrits susceptibles d'être exprimés en aval du gène *Topaz1* au moment de la première division de méiose dans le testicule murin. Plusieurs de ces transcrits sont uniquement décrits dans la littérature comme des EST issus de banques de testicules murins mais leur fonction n'a jamais été étudiée (comme AK007116 par exemple). D'après nos résultats de transcriptomique et leur profil d'expression testiculaire étudié par qPCR, ces transcrits pourraient avoir un rôle dans la spermatogenèse. Il serait intéressant d'étudier leur spécificité tissulaire et le type cellulaire qui les expriment, avant éventuellement de réaliser des études fonctionnelles de ces gènes. Il serait

également intéressant d'évaluer leur expression dans d'autres modèles de souris KO présentant une stérilité mâle associée à un arrêt de la spermatogenèse précoce afin de confirmer leur éventuelle implication dans la spermatogenèse.

L'expression du gène *ABCG8* et du lncRNA *1700016G14Rik*, par exemple, est fortement réduite dans les testicules de souris invalidées pour le gène *Zfp145* à *7jpp* alors que l'expression du lncRNAs *1700104A03Rik* est augmentée dans ces testicules (GSE 1399 ; Costoya *et al.*, 2004). Le gène *Zfp145* est spécifique des gonocytes et des spermatogonies indifférenciées, son invalidation se traduit par une perte progressive des spermatogonies avec l'âge montrant un rôle de ce gène dans la régulation des cellules germinales souches du testicule (Costoya *et al.*, 2004). Des études complémentaires seraient à réaliser pour savoir si la modification de l'expression de ces gènes est causée par une absence des cellules germinales les exprimant ou par une perturbation de leur voie de régulation.

L'expression du lncRNA *49304630o16Rik* est diminuée dans les testicules invalidés pour *Mybl1* dès *14jpp* (GSE 28025). Les souris mâles *Mybl1*<sup>-/-</sup> sont stériles et présentent un défaut de l'appariement des chromosomes au stade pachytène de première division de méiose (Bolcun-Filas *et al.*, 2011). Comme dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup>, l'expression du lncRNA *49304630o16Rik* et de *1700016G14Rik* est diminuée dans les testicules *Taf7l*<sup>-/-</sup> à 8 semaines (GSE 5510). Le gène *Taf7l* est lui impliqué dans la morphologie des spermatozoïdes (Cheng *et al.*, 2007). L'arrêt de la spermatogenèse est plus tardif que chez notre modèle mutant, il serait donc intéressant d'étudier l'expression de ces gènes dans des modèles murins d'arrêt de la spermatogenèse en première division de méiose.

L'un des transcrits issu de notre étude de transcriptomique est *Chst1*. Il code pour la keratan sulfate galactose 6-O-sulfotransferase (KSGal6ST), une enzyme permettant la sulfatation du galactose en position C6 des keratan sulfate. Son invalidation montre un rôle fondamental de *Chst1* dans le cerveau post-natal précoce (Hoshino *et al.*, 2014). Dans le testicule de souris, l'expression de ce gène augmente à partir de *15jpp* pour atteindre un maximum d'expression à *28jpp*, son patron d'expression correspond donc à un gène de méiose mâle. Deux autres analyses transcriptomiques (Chalmel *et al.*, 2007 et Namekawa *et al.*, 2006) accessibles via le site GermOnline (<http://www.germonline.org>) montre une forte expression de *Chst1* dans les spermatocytes murins. L'expression de *Chst1* est complètement éteinte dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup>, ce qui suggère une relation fonctionnelle entre ces deux gènes. De plus, l'expression de *Chst1* est également diminuée à *14jpp* dans les testicules de souris *Mov10L1*<sup>-/-</sup> (Frost *et al.*, 2010) et *Mybl1*<sup>-/-</sup> (Bolcun-Filas *et al.*, 2011). Le laboratoire ayant réalisé l'invalidation de *Chst1* (Kenji Uchimura, Nagoya University, Japon) nous a communiqué que certaines souris invalidées pour *Chst1* ont des défauts de reproduction, certaines souris (mâles ou femelles) sont stériles. L'étude de l'expression de *Topaz1* chez les souris *Chst1*<sup>-/-</sup> pourrait présenter un intérêt dans la compréhension du lien entre *Chst1* et *Topaz1*, dans les gonades murines.

L'un des transcrit dérégulé dans les testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> dès 15jpp correspond à un long ARN non codant (lncRNA) *4930463o16Rik*, ne contenant pas de cluster de piARNs. L'ADN non codant pour une protéine représente une grande part du nombre de transcrits dans les organismes supérieurs, jusqu'à 98,5% du génome chez l'humain (Amaral *et al.*, 2008). Parmi ces transcrits, on distingue les petits ARNs non codants (sncRNAs) d'une taille inférieure à 200pb (comportant les ARNr, les siARNs, les miARNs et les piARNs) et les lncRNAs d'une taille supérieure à 200pb. Les lncRNAs peuvent être classés selon leur sens de transcription (sens ou anti-sens) et selon leur localisation génomique : associé à un transcrit ou associé à une région intergénique. Contrairement aux piARNs et autres sncRNAs, il n'y a pas de familles protéiques spécifiques identifiées clairement dans le traitement des transcrits des lncRNAs. De plus, les lncRNAs présentent une multitude de rôles de régulation moléculaires qui restent à élucider. Certains lncRNAs pourraient être impliqués dans la régulation de la spermatogenèse comme *Mrhl* (*Meiotic Recombination hot spot locus*). Le transcrit du lncRNA *Mrhl* monoexonique se localise dans le noyau des spermatogonies (Nishant *et al.*, 2004). *Mrhl* régulerait la spermatogenèse selon deux mécanismes possibles : en inhibant la voie Wnt en interaction avec p68 (Arun *et al.*, 2012) ou en étant clivé par la protéine Drosha pour donner un ARN intermédiaire qui pourrait interagir avec la chromatine (Ganesan and Rao, 2008). L'invalidation du lncRNA *4930463o16Rik* serait une méthode pour définir son rôle. Un autre lncRNA, *Tsx* (*Testis-specific X linked*) est exprimé spécifiquement dans les spermatocytes en pachytène et son invalidation se traduit par une augmentation de l'apoptose de ce type cellulaire mais les mâles mutants sont fertiles (Anguera *et al.*, 2011). *Tsx* aurait donc un rôle crucial pour la progression de la méiose. Compte tenu de son profil d'expression, *4930463o16Rik* pourrait, comme *Mrhl* et *Tsx*, avoir un rôle dans la méiose des cellules germinales dans le testicule murin.

Nous n'avons pas trouvé de motifs connus conservés entre les différents gènes codant pour des lncRNAs dont l'expression est abolie en absence de *Topaz1*. Et ces gènes ne semblent pas correspondre à des clusters de piARNs.

Les lncRNAs peuvent réaliser leur fonction de régulation selon plusieurs mécanismes moléculaires (Luk *et al.*, 2014 ; Cheng and Weng, 2011). Le premier mécanisme fonctionne par concurrence : un lncRNA peut s'associer à une protéine de liaison à l'ADN et inhiber son attachement à son ADN cible ou un lncRNA peut se lier par complémentarité de séquence à l'ADN cible ce qui perturbe la liaison de la protéine de liaison à l'ADN. Le second mécanisme de régulation est de type activateur : un lncRNA peut recruter des méthylases sur des sites spécifiques de l'ADN ou activer des modifications épigénétiques. Les lncRNAs peuvent également jouer le rôle de chaperon pour rassembler plusieurs protéines et former des complexes ribonucléoprotéiques afin de stabiliser par exemple des complexes de signalisation. Enfin, les lncRNAs peuvent agir comme des précurseurs s'ils sont modifiés par des RNases (Dicer ou Drosha par exemple) pour former des ARNs courts fonctionnels.

### III. Perspectives

#### A. La protéine TOPAZ1

L'une des difficultés concernant l'étude de la protéine TOPAZ1 réside en l'absence d'un bon anticorps. Un premier anticorps anti-TOPAZ1, généré contre un peptide de 15 acides aminés correspondant à l'exon 2 de *Topaz1*, a été obtenu (fabriqué à la demande par la société Eurogentec). Cet anticorps semblait reconnaître spécifiquement les cellules germinales par immunohistochimie (Baillet *et al.*, 2011, Article en annexe). Cependant cet anticorps, bien qu'aliquoté en petite quantité et précieusement conservé à -20°C, ne s'est apparemment pas conservé, si bien que tous les marquages réalisés par la suite se sont révélés non spécifiques. Nous avons ensuite testé presque une dizaine d'anticorps (commerciaux ou produit par Proteogenix), et aucun ne s'est révélé spécifique puisque nous disposions maintenant d'un bon tissu témoin négatif (testicule de souris *Topaz1*<sup>-/-</sup>). Nous n'avons donc pas pu étudier la localisation précise de TOPAZ1 au cours de la prophase I de méiose, ni même réaliser des études de co-immunoprécipitation. L'inactivation du gène *Topaz1* a été réalisée par suppression et insertion d'un gène rapporteur *LacZ* avec un signal nls, mais nous n'avons pas réussi à obtenir un marquage à la  $\beta$ -galactosidase spécifique.

En vue de vérifier la présence d'une protéine TOPAZ1 dans le testicule murin, nous avons fait réaliser une analyse comparative LC MS/MS entre des testicules adultes WT et KO. Aucun peptide correspondant à TOPAZ1 n'a pu être mis en évidence par cette technique. Cependant, cette technique n'est pas très sensible puisque, des peptides correspondant à la protéine SOX9 n'ont pas été retrouvés au cours de cette analyse chez l'adulte, alors que le gène *Sox9* est exprimé dans les cellules de Sertoli à ce stade (Morais da Silva *et al.*, 1996). L'une des hypothèses pour expliquer la difficulté à étudier TOPAZ1 est que cette protéine est exprimée à un faible niveau.

Il serait intéressant de réaliser un tri des cellules testiculaires afin d'isoler les cellules germinales et même les spermatocytes pour réaliser une étude protéomique avec recherche de la protéine TOPAZ1. Pour réaliser un tri des différentes cellules du testicule, on peut utiliser la technique du FACS (Fluorescence-activated cell sorting) combinée avec une coloration au Hoechst 33342 (colorant des acides nucléaires qui émet une fluorescence bleue quand il se lie à l'ADN double brin) (Getun *et al.*, 2011). Il a été montré qu'en combinant plusieurs stratégies de cytométrie de flux, on pouvait obtenir un enrichissement de haute pureté en spermatocytes au stade pré-leptotène, leptotène, zygotène, pachytène et diplotène de méiose I. La technique repose sur une dissociation du testicule pour obtenir une suspension testicule de cellules uniques, suivie d'un protocole de sélection des différents stades cellulaires de la prophase de méiose I utilisant une discrimination basée sur la fluorescence du colorant de Hoechst et enfin une restriction concernant la teneur en ADN afin de minimiser la contamination en cellules non-méiotiques (Gaysinskaya *et al.*, 2014). Cette

technique permet d'obtenir des cellules purifiées qui peuvent être analysées en transcriptomique ainsi qu'en protéomique.

Le clonage de l'ADNc *Topaz1* murin (environ 5000 pb) puis la production *in vitro* de la protéine TOPAZ1 est en cours au laboratoire dans le but d'obtenir une protéine complète contre laquelle pourra être produit un anticorps spécifique. Cet anticorps devrait nous permettre d'étudier la localisation précise de la protéine TOPAZ1 dans les cellules germinales murines. Cet anticorps ouvrira également des perspectives de recherche d'éventuels co-facteurs par des expériences de co-immunoprécipitation (CoIP) ou d'analyser les possibles interactions de TOPAZ1 avec l'ADN ou l'ARN par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

### **B. Sauvetage du phénotype des souris *Topaz1*<sup>-/-</sup> et surexpression de *Topaz1***

Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser un sauvetage du phénotype avec une protéine TOPAZ1 ne possédant que le domaine PAZ ou que le domaine CCCH afin d'étudier l'implication de chacun des domaines de la protéine TOPAZ1 dans l'arrêt de la spermatogenèse et plus globalement dans la fonction de *Topaz1*. Pour cela, il faudrait produire des souris transgéniques *Mvh-Topaz1* (ou *Maelstrom-Topaz1*) puis réaliser des croisements entre des souris *Topaz1*<sup>-/-</sup> et ces souris transgéniques *Mvh-Topaz1* exprimant l'ADNc d'une partie de *Topaz1* (sans l'exon deux contenant le domaine PAZ ou sans l'exon 8 contenant le domaine CCCH).

D'autre part, nous pourrions réaliser une surexpression de ce gène permettant d'étudier les éventuelles voies qui seraient sur-stimulées par un trop fort taux de *Topaz1*. On pourra surexprimer le gène *Topaz1* complet ou ne surexprimer que le domaine PAZ ou le domaine CCCH afin d'étudier les phénotypes que cela induit.

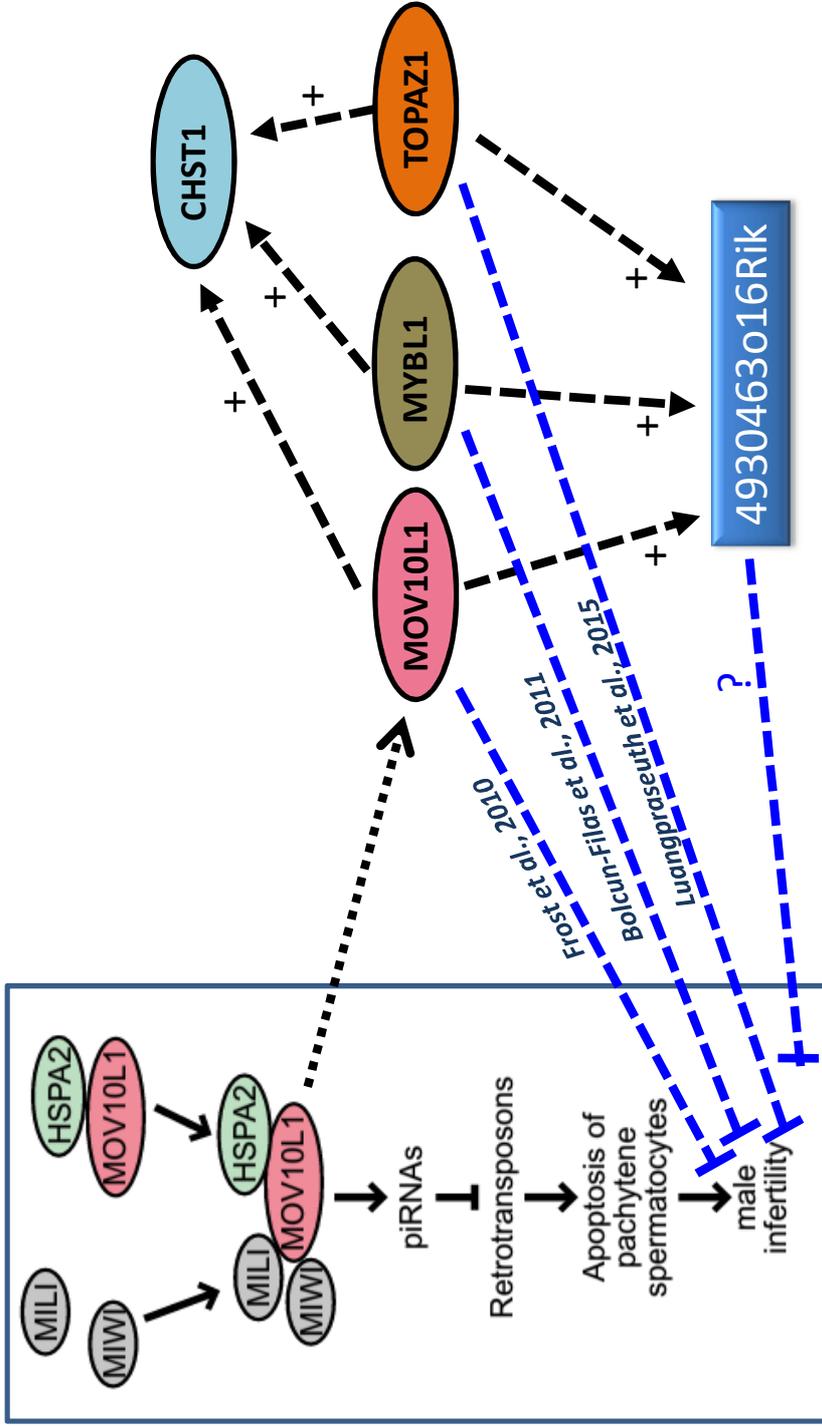
### **C. Test *in vitro* de liaison de *Topaz1* aux lncRNAs ou à l'ADN**

Afin d'élucider les interactions entre *Topaz1* et les lncRNAs issus de l'étude par microArray, nous pouvons réaliser une immunoprécipitation de l'ARN (RIP : RNA Immunoprecipitation). Cette technique est basée sur l'utilisation d'un anticorps pour immunoprécipiter une protéine spécifique de liaison à l'ARN (une RBP, ici TOPAZ1) et un ARN associé. Cet ARN associé peut être ensuite détecté par microarrays ou par séquençage. Nous pourrions également utiliser la technique de REMSA (RNA electromobility shift assay), cette technique de retard sur gel permet de visualiser les complexes protéines-ARN en comparant la migration de l'ARN en absence ou en présence de la protéine d'intérêt. Pour cela, un ARN d'intérêt marqué est transcrit *in vitro* ou synthétisé chimiquement avec un tag fluorescent. Cet ARN marqué est incubé avec ou sans la protéine d'intérêt (ici TOPAZ1) et le mélange réactionnel est mis à migrer par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. Le complexe ARN-Protéine va migrer plus lentement comparé à l'ARN libre.

Nous pourrions également déterminer le potentiel site de liaison de TOPAZ1 par un test de sélection et d'amplification de liaison (SAAB) comme utilisé par Steadman *et al.*, 2000. Pour cela, on utilise des oligonucléotides marqués constitués d'une séquence aléatoire de 15bp flanquée par deux régions de 20bp. Les sondes marquées sont incubées avec la protéine d'intérêt TOPAZ1. Les sondes non-liées sont séparées des sondes liées à la protéine par un tampon TBE/PAGE. L'ADN lié à la protéine est détecté par autoradiographie et les bandes représentant les complexes protéines-ADN sont découpées du gel. Après avoir été extrait du gel, l'ADN est amplifié en utilisant des primers complémentaires aux séquences non-aléatoires de 20bp. Après la dernière amplification et purification sur gel, le fragment obtenu est cloné dans un vecteur et séquencé. Ce protocole permettrait de connaître la séquence consensus de fixation à l'ADN de TOPAZ1.

On pourra également réaliser ce même test avec un peptide correspondant au domaine PAZ ou au domaine CCCH de TOPAZ1 afin d'étudier la séquence consensus de fixation de ces domaines.

## **Conclusion**



*Frost et al., 2010*

**Figure 37 : Modèle schématique résumant la potentielle implication de l'ARN non codant long 4930463o16Rik dans la spermatogenèse**

L'absence de MOV10L1, MYBL1 et TOPAZ1 diminue l'expression de 4930463o16Rik et Chst1 dès 14-15jpp. L'invalidation de *Mov10L1*, *Mybl1* et *Topaz1* conduit à une stérilité mâle.

## Conclusion

Même si la fonction précise de *Topaz1* n'a pas été complètement élucidée au cours de cette thèse, nous avons démontré que *Topaz1* est un gène indispensable à la spermatogenèse, chez la souris. L'absence de *Topaz1* induit un arrêt de la méiose mâle avant la première division et donc une stérilité mâle. Plusieurs pistes peuvent donc être proposées pour poursuivre cette étude et notamment:

- L'analyse du rôle de TOPAZ1 dans la transition G2/M et la formation du MPF et plus particulièrement l'expression et la localisation des protéines HSP,
- L'étude de la mise en place du fuseau méiotique et de la répartition des chromosomes sur la plaque équatoriale,
- L'implication de TOPAZ1 dans le désappariement des chromosomes homologues en fin de prophase I,
- L'étude de l'expression spatio-temporelle des gènes inconnus mis en évidence par nos analyses transcriptomiques,
- L'étude du rôle des ARN non codants longs au cours de la prophase I de meiose.

A la suite de nos résultats et des données disponibles dans la littérature, nous proposons le modèle présenté dans la **figure 37** comme hypothèse de travail futur. L'ARN non codant long *4930463o16Rik* pourrait intervenir dans la spermatogenèse et sa délétion apporterait des éléments de réponse sur son rôle.

Par ailleurs, l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la répression des éléments rétrotransposables et dans les mécanismes épigénétiques au cours du développement gonadique normal montre des différences importantes entre les espèces et notamment entre le mouton et la souris. Ces différences entre espèces ouvrent elles aussi de nouvelles pistes pour comprendre les régulations épigénétiques chez les espèces autres que la souris.

Ce travail offre de nombreuses perspectives et ouvre un nouveau champ d'investigation, notamment avec l'étude du rôle des lncRNAs dans la méiose.

## **Références bibliographiques**

## Bibliographie

- Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P.G., and Charlton, H.M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* *141*, 1795–1803.
- Abel, M.H., Baker, P.J., Charlton, H.M., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Guillou, F., and O'Shaughnessy, P.J. (2008). Spermatogenesis and Sertoli Cell Activity in Mice Lacking Sertoli Cell Receptors for Follicle-Stimulating Hormone and Androgen. *Endocrinology* *149*, 3279–3285.
- Adams, I.R., and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* *129*, 1155–1164.
- Adham, I.M., Nayernia, K., and Engel, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* *46*, 370–376.
- Aliabadi, E., Soleimani Mehranjani, M., Borzoei, Z., Talaei-Khozani, T., Mirkhani, H., and Tabesh, H. (2012). Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iran J Reprod Med* *10*, 77–82.
- Amaral, P.P., Dinger, M.E., Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* *319*, 1787–1789.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M., and Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 14976–14980.
- Anderson, R.A., Fulton, N., Cowan, G., Coutts, S., and Saunders, P.T. (2007). Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Developmental Biology* *7*, 136.
- Anguera, M.C., Ma, W., Clift, D., Namekawa, S., Kelleher, R.J., and Lee, J.T. (2011). Tsx Produces a Long Noncoding RNA and Has General Functions in the Germline, Stem Cells, and Brain. *PLoS Genetics* *7*, e1002248.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 5319–5323.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Molecular Cell* *31*, 785–799.
- Ariyaratne, H.B., and Chamindrani Mendis-Handagama, S. (2000). Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol. Reprod.* *62*, 680–690.
- Ariyaratne, H.B., Mendis-Handagama, S.M., and Mason, J.I. (2000). Effects of tri-iodothyronine on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal Rat. *Biol. Reprod.* *63*, 493–502.
- Arun, G., Akhade, V.S., Donakonda, S., and Rao, M.R.S. (2012). mrhl RNA, a Long Noncoding RNA, Negatively Regulates Wnt Signaling through Its Protein Partner Ddx5/p68 in Mouse Spermatogonial Cells. *Molecular and Cellular Biology* *32*, 3140–3152.
- Assinder, S.J., Rezvani, A., and Nicholson, H.D. (2002). Oxytocin promotes spermiation and sperm transfer in the mouse. *International Journal of Andrology* *25*, 19–26.
- Ayer-LeLievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Hallböök, F., and Persson, H. (1988). Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 2628–2632.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H., and Grootegoed, J.A. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* *207*, 322–333.

Baarends, W.M., Wassenaar, E., van der Laan, R., Hoogerbrugge, J., Sleddens-Linkels, E., Hoeijmakers, J.H.J., de Boer, P., and Grootegoed, J.A. (2005). Silencing of Unpaired Chromatin and Histone H2A Ubiquitination in Mammalian Meiosis. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1041–1053.

Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Jayakody, I., Taketo, M.M., Scherer, G., and Harley, V.R. (2008). Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Developmental Biology* 314, 71–83.

Baillet, A., Mandon-Pépin, B., Cabau, C., Poumerol, E., Pailhoux, E., and Cotinot, C. (2008). Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. *BMC Genomics* 9, 436.

Baillet, A., Le Bouffant, R., Volff, J.N., Luangpraseuth, A., Poumerol, E., Thépot, D., Pailhoux, E., Livera, G., Cotinot, C., and Mandon-Pépin, B. (2011). TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates. *PLoS ONE* 6, e26950.

Baillie, H.S., Pacey, A.A., Warren, M.A., Scudamore, I.W., and Barratt, C.L. (1997). Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Human Reproduction* 12, 1985–1992.

Baker, P.J., and O’Shaughnessy, P.J. (2001). Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122, 227–234.

Baker, S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., et al. (1995). Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82, 309–319.

Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., et al. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat. Genet.* 13, 336–342.

Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.-C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., and Page, D.C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics* 38, 1430–1434.

Bao, S., Obata, Y., Carroll, J., Domeki, I., and Kono, T. (2000). Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. *Biol. Reprod.* 62, 616–621.

Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, C., Guillou, F., Wegner, M., and Scherer, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Developmental Biology* 327, 301–312.

Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., Paronetto, M.P., Di Siena, S., Geremia, R., Rossi, P., De Felici, M., Jannini, E.A., and Dolci, S. (2010). Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science* 123, 871–880.

Bartlett, J.M., Charlton, H.M., Robinson, I.C., and Nieschlag, E. (1990). Pubertal development and testicular function in the male growth hormone-deficient rat. *J. Endocrinol.* 126, 193–201.

Behringer, R.R., Finegold, M.J., and Cate, R.L. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415–425.

Belleannée, C., Thimon, V., and Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research* 349, 717–731.

Bergh, A., Damber, J.E., and van Rooijen, N. (1993). Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J. Endocrinol.* 136, 407–413.

Berkovits, B.D., Wang, L., Guarnieri, P., and Wolgemuth, D.J. (2012). The testis-specific double bromodomain-containing protein BRDT forms a complex with multiple spliceosome components and is required for mRNA splicing and 3’-UTR truncation in round spermatids. *Nucleic Acids Research* 40, 7162–7175.

Bernard, P., and Harley, V.R. (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 31–43.

Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J.-J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos. *Development* 122, 3023–3033.

Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., and Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.

Beumer, T.L., Roepers-Gajadien, H.L., Gademan, I.S., Kal, H.B., and de Rooij, D.G. (2000). Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biol. Reprod.* 63, 1893–1898.

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., and Schoenle, E.J. (2004). A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N. Engl. J. Med.* 351, 792–798.

Bishop, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., Agoulnik, A.I., Agoulnik, I.U., Harrison, W.R., Behringer, R.R., and Overbeek, P.A. (2000). A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* 26, 490–494.

Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69, 439–456.

Bitgood, M.J., and McMahon, A.P. (1995). Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell–Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Developmental Biology* 172, 126–138.

Blobel, C.P. (2000). Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev. Reprod.* 5, 75–83.

Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., and Mulsant, P. (2007). A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology* 148, 393–400.

Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D.G., and Cooke, H.J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *The Journal of Cell Biology* 176, 741–747.

Bolcun-Filas, E., Bannister, L.A., Barash, A., Schimenti, K.J., Hartford, S.A., Eppig, J.J., Handel, M.A., Shen, L., and Schimenti, J.C. (2011). A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Development* 138, 3319–3330.

Le Bouffant, R., Guerquin, M.J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R., and Livera, G. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Human Reproduction* 25, 2579–2590.

Le Bouffant, R., Souquet, B., Duval, N., Duquenne, C., Herve, R., Frydman, N., Robert, B., Habert, R., and Livera, G. (2011). Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation. *Development* 138, 5393–5402.

Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck, N.B., et al. (2014). FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Current Biology* 24, 404–408.

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

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., et al. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596–600.

Brennan, J. (2003). Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes & Development* 17, 800–810.

Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* *128*, 1089–1103.

Brown, R.S. (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Current Opinion in Structural Biology* *15*, 94–98.

Bullejos, M., and Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development* *68*, 422–428.

Caldas-Lopes, E., Cerchietti, L., Ahn, J.H., Clement, C.C., Robles, A.I., Rodina, A., Moulick, K., Taldone, T., Gozman, A., Guo, Y., et al. (2009). Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 8368–8373.

Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell* *12*, 503–514.

Casado, M.E., Pastor, O., Mariscal, P., Canfrán-Duque, A., Martínez-Botas, J., Kraemer, F.B., Lasunción, M.A., Martín-Hidalgo, A., and Busto, R. (2013). Hormone-sensitive lipase deficiency disturbs the fatty acid composition of mouse testis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* *88*, 227–233.

Cattanach, B.M., Iddon, C.A., Charlton, H.M., Chiappa, S.A., and Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* *269*, 338–340.

Cavicchia, J.C., Fóscolo, M., Ibañez, J., Lillig, C., and Capani, F. (2011). The actin filament network associated to Sertoli cell ectoplasmic specializations. *Biocell* *35*, 81–89.

Chaboissier, M.-C. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* *131*, 1891–1901.

Chalmel, F., Rolland, A.D., Niederhauser-Wiederkehr, C., Chung, S.S.W., Demougin, P., Gattiker, A., Moore, J., Patard, J.-J., Wolgemuth, D.J., Jégou, B., et al. (2007). The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 8346–8351.

Chambon, J.-P., Touati, S.A., Berneau, S., Cladière, D., Hebras, C., Groeme, R., McDougall, A., and Wassmann, K. (2013). The PP2A Inhibitor I2PP2A Is Essential for Sister Chromatid Segregation in Oocyte Meiosis II. *Current Biology* *23*, 485–490.

Chapman, D.L., and Wolgemuth, D.J. (1994). Regulation of M-phase promoting factor activity during development of mouse male germ cells. *Dev. Biol.* *165*, 500–506.

Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1264–1277.

Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.* *82*, 825–874.

Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews* *64*, 16–64.

Cheng, Y., Buffone, M.G., Kouadio, M., Goodheart, M., Page, D.C., Gerton, G.L., Davidson, I., and Wang, P.J. (2007). Abnormal Sperm in Mice Lacking the Taf71 Gene. *Molecular and Cellular Biology* *27*, 2582–2589.

Chi, M.N., Auriol, J., Jégou, B., Kontoyiannis, D.L., Turner, J.M.A., de Rooij, D.G., and Morello, D. (2011). The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2875–2885.

Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., Anderson, R.A., and Saunders, P.T.K. (2011). Retinoic Acid Signalling and the Control of Meiotic Entry in the Human Fetal Gonad. *PLoS ONE* *6*, e20249.

Cho, C. (2003). Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice. *Biology of Reproduction* *69*, 211–217.

- Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., and Myles, D.G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* *281*, 1857–1859.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* *28*, 82–86.
- Chuma, S., and Nakano, T. (2012). piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *368*, 20110338–20110338.
- Chuma, S., Hosokawa, M., Kitamura, K., Kasai, S., Fujioka, M., Hiyoshi, M., Takamune, K., Noce, T., and Nakatsuji, N. (2006). *Tdrd1/Mtr-1*, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 15894–15899.
- Clark, J.M., and Eddy, E.M. (1975). Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev. Biol.* *47*, 136–155.
- Clark, A.M., Garland, K.K., and Russell, L.D. (2000). Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* *63*, 1825–1838.
- Cobb, J., Cargile, B., and Handel, M.A. (1999). Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. *Dev. Biol.* *205*, 49–64.
- Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* *104*, 875–889.
- Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology* *326*, 112–120.
- Combes, A.N., Spiller, C.M., Harley, V.R., Sinclair, A.H., Dunwoodie, S.L., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2010). Gonadal defects in *Cited2*-mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 683–689.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of *brca1* in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* *286*, 1162–1166.
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of *Plzf* in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics* *36*, 653–659.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., et al. (2001). The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* *27*, 159–166.
- Dacheux, J.-L., Castella, S., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* *63*, 319–341.
- Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* *306*, 45–50.
- Davis, B.K. (1980). Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* *5*, 249–254.
- Davis, T.L., Trasler, J.M., Moss, S.B., Yang, G.J., and Bartolomei, M.S. (1999). Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* *58*, 18–28.
- Davydenko, O., Schultz, R.M., and Lampson, M.A. (2013). Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *The Journal of Cell Biology* *202*, 221–229.
- De, S.K., Chen, H.L., Pace, J.L., Hunt, J.S., Terranova, P.F., and Enders, G.C. (1993). Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* *133*, 389–396.

- Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2007). Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of Cell Biology* 176, 749–755.
- Deininger, P.L., Moran, J.V., Batzer, M.A., and Kazazian, H.H. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 651–658.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819–830.
- Di, R., He, J., Song, S., Tian, D., Liu, Q., Liang, X., Ma, Q., Sun, M., Wang, J., Zhao, W., et al. (2014). Characterization and comparative profiling of ovarian microRNAs during ovine anestrus and the breeding season. *BMC Genomics* 15, 899.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E.H., and Eddy, E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 3264–3268.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D.R., Brown, P.R., Goulding, E.H., Strong, B.D., and Eddy, E.M. (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124, 4595–4603.
- Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B., and Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *Journal of Cell Science* 107, 2749–2760.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531–535.
- Drevet, J.R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250, 70–79.
- DYM, M., and FAWCETT, D.W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction* 3, 308–326.
- Dym, M., Kokkinaki, M., and He, Z. (2009). Spermatogonial stem cells: Mouse and human comparisons. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 87, 27–34.
- Eaker, S., Cobb, J., Pyle, A., and Handel, M.A. (2002). Meiotic Prophase Abnormalities and Metaphase Cell Death in MLH1-Deficient Mouse Spermatocytes: Insights into Regulation of Spermatogenic Progress. *Developmental Biology* 249, 85–95.
- Eddy, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43, 229–280.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., Kolodner, R., Pollard, J.W., and Kucherlapati, R. (1999). Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat. Genet.* 21, 123–127.
- Eicher, E.M., and Washburn, L.L. (2001). Does one gene determine whether a C57BL/6J-Y(POS) mouse will develop as a female or as an hermaphrodite? *J. Exp. Zool.* 290, 322–326.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* 2, 163–171.
- Fantoni, G., Morris, P.L., Forti, G., Vannelli, G.B., Orlando, C., Barni, T., Sestini, R., Danza, G., and Maggi, M. (1993). Endothelin-1: a new autocrine/paracrine factor in rat testis. *Am. J. Physiol.* 265, E267–E274.
- De Fazio, S., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Abreu-Goodger, C., Sankar, A., Funaya, C., Antony, C., Moreira, P.N., Enright, A.J., and O'Carroll, D. (2011). The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 480, 259–263.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2004). In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* 25, 811–818.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.

Feschotte, C., and Pritham, E.J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics* 41, 331.

Florman, H.M., Jungnickel, M.K., and Sutton, K.A. (2008). Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* 52, 503–510.

França, L.R., Auharek, S.A., Hess, R.A., Dufour, J.M., and Hinton, B.T. (2012). Blood-tissue barriers: morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 763, 237–259.

Frost, R.J.A., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 11847–11852.

Gaemers, I.C., van Pelt, A.M., van der Saag, P.T., and de Rooij, D.G. (1996). All-trans-4-oxo-retinoic acid: a potent inducer of in vivo proliferation of growth-arrested A spermatogonia in the vitamin A-deficient mouse testis. *Endocrinology* 137, 479–485.

Gaemers, I.C., Sonneveld, E., van Pelt, A.M., Schrans, B.H., Themmen, A.P., van der Saag, P.T., and de Rooij, D.G. (1998). The effect of 9-cis-retinoic acid on proliferation and differentiation of a spermatogonia and retinoid receptor gene expression in the vitamin A-deficient mouse testis. *Endocrinology* 139, 4269–4276.

Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., et al. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25, 279–283.

Gan, H., Lin, X., Zhang, Z., Zhang, W., Liao, S., Wang, L., and Han, C. (2011). piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *RNA* 17, 1191–1203.

Ganesan, G., and Rao, S.M.R. (2008). A novel noncoding RNA processed by Droscha is restricted to nucleus in mouse. *RNA* 14, 1399–1410.

Gaysinskaya, V., Soh, I.Y., van der Heijden, G.W., and Bortvin, A. (2014). Optimized flow cytometry isolation of murine spermatocytes: Flow Cytometry Isolation of Murine Spermatocytes. *Cytometry Part A* 85, 556–565.

De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., et al. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 1327–1332.

Gérard, N., and Jégou, B. (1993). In-vitro influence of germ cells on Sertoli cell-secreted proteins: a two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Int. J. Androl.* 16, 285–291.

Gerton, J.L., and Hawley, R.S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Reviews Genetics* 6, 477–487.

Getun, I.V., Torres, B., and Bois, P.R.J. (2011). Flow Cytometry Purification of Mouse Meiotic Cells. *Journal of Visualized Experiments*.

Geyer, C.B., Inselman, A.L., Sunman, J.A., Bornstein, S., Handel, M.A., and Eddy, E.M. (2009). A missense mutation in the Capza3 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice. *Developmental Biology* 330, 142–152.

Di Giacomo, M., Comazzetto, S., Saini, H., De Fazio, S., Carrieri, C., Morgan, M., Vasiliauskaite, L., Benes, V., Enright, A.J., and O'Carroll, D. (2013). Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. *Mol. Cell* 50, 601–608.

- Godet, M., Thomas, A., Rudkin, B.B., and Durand, P. (2000). Developmental changes in cyclin B1 and cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) levels in the different populations of spermatogenic cells of the post-natal rat testis. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 816–823.
- Grad, I., Cederroth, C.R., Walicki, J., Grey, C., Barluenga, S., Winssinger, N., De Massy, B., Nef, S., and Picard, D. (2010). The Molecular Chaperone Hsp90 $\alpha$  Is Required for Meiotic Progression of Spermatocytes beyond Pachytene in the Mouse. *PLoS ONE* 5, e15770.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., and Bartel, D.P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455, 1193–1197.
- Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 411–416.
- Gubbay, J., Vivian, N., Economou, A., Jackson, D., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1992). Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7953–7957.
- Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587–1590.
- Hales, B.F., Grenier, L., Lalancette, C., and Robaire, B. (2011). Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 91, 652–665.
- Hall, T.M.T. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 367–373.
- Hamer, G. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science* 119, 4025–4032.
- Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M.C., and Schedl, A. (2001). Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106, 319–329.
- Han, C., Choi, E., Park, I., Lee, B., Jin, S., Kim, D.H., Nishimura, H., and Cho, C. (2009). Comprehensive Analysis of Reproductive ADAMs: Relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM Complex Required for Fertilization in Mice. *Biology of Reproduction* 80, 1001–1008.
- Handel, M. (2004). The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Experimental Cell Research* 296, 57–63.
- Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* 11, 124–136.
- Hanrahan, J.P. (2003). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 70, 900–909.
- Happel, N., and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431, 1–12.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2, 280–291.
- Hassold, T., Sherman, S., and Hunt, P. (2000). Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2409–2419.
- Hawkins, J.R., Taylor, A., Goodfellow, P.N., Migeon, C.J., Smith, K.D., and Berkovitz, G.D. (1992). Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 979–984.
- Hedger, M.P. (2002). Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 57, 19–34.

- Held, T., Paprotta, I., Khulan, J., Hemmerlein, B., Binder, L., Wolf, S., Schubert, S., Meinhardt, A., Engel, W., and Adham, I.M. (2006). Hspa4l-Deficient Mice Display Increased Incidence of Male Infertility and Hydronephrosis Development. *Molecular and Cellular Biology* 26, 8099–8108.
- Held, T., Barakat, A.Z., Mohamed, B.A., Paprotta, I., Meinhardt, A., Engel, W., and Adham, I.M. (2011). Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis. *Reproduction* 142, 133–144.
- Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.
- Hickford, D.E., Frankenberg, S., Pask, A.J., Shaw, G., and Renfree, M.B. (2011). DDX4 (VASA) Is Conserved in Germ Cell Development in Marsupials and Monotremes. *Biology of Reproduction* 85, 733–743.
- Höck, J., and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* 9, 210.
- Hodges, C.A., LeMaire-Adkins, R., and Hunt, P.A. (2001). Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J. Cell. Sci.* 114, 2417–2426.
- Honke, K., and Taniguchi, N. (2002). Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Medicinal Research Reviews* 22, 637–654.
- Hoshino, H., Foyez, T., Ohtake-Niimi, S., Takeda-Uchimura, Y., Michikawa, M., Kadomatsu, K., and Uchimura, K. (2014). KSGal6ST is essential for the 6-sulfation of galactose within keratan sulfate in early postnatal brain. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 145–156.
- Houston, C.S., Opitz, J.M., Spranger, J.W., Macpherson, R.I., Reed, M.H., Gilbert, E.F., Herrmann, J., and Schinzel, A. (1983). The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am. J. Med. Genet.* 15, 3–28.
- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (2011). piRNA-Associated Germline Nuage Formation and Spermatogenesis Require MitoPLD Profusogenic Mitochondrial-Surface Lipid Signaling. *Developmental Cell* 20, 376–387.
- Huang, H.F., Marshall, G.R., Rosenberg, R., and Nieschlag, E. (1987). Restoration of spermatogenesis by high levels of testosterone in hypophysectomized rats after long-term regression. *Acta Endocrinol.* 116, 433–444.
- Huhtaniemi, I.T. (1996). Polymorphism of gonadotropin action; molecular mechanisms and clinical implications. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 56, 743–752.
- Huhtaniemi, I.T., and Aittomäki, K. (1998). Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor: effects on gonadal function. *Eur. J. Endocrinol.* 138, 473–481.
- Huntriss, J., Hinkins, M., Oliver, B., Harris, S.E., Beazley, J.C., Rutherford, A.J., Gosden, R.G., Lanzendorf, S.E., and Picton, H.M. (2004). Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Molecular Reproduction and Development* 67, 323–336.
- Iguchi, N., Tobias, J.W., and Hecht, N.B. (2006). Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7712–7717.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5834–5847.
- Ishiguro, K., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S., and Watanabe, Y. (2011). A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep.* 12, 267–275.
- Ivell, R., Hunt, N., Hardy, M., Nicholson, H., and Pickering, B. (1992). Vasopressin biosynthesis in rodent Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89, 59–66.

- Jablonski, S.A., Chan, G.K., Cooke, C.A., Earnshaw, W.C., and Yen, T.J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* 107, 386–396.
- Jacobs, P.A., and Ross, A. (1966). Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 210, 352–354.
- Jacobs, P.A., and Strong, J.A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183, 302–303.
- Jan, S.Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Vormer, T.L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 1838–1850.
- Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., Délot, E., Chen, X.N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P.N., Elejalde, B.R., and Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1102–1109.
- Kang-Decker, N., Mantchev, G.T., Juneja, S.C., McNiven, M.A., and van Deursen, J.M. (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* 294, 1531–1533.
- Kauppi, L., Jasin, M., and Keeney, S. (2012). The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis: Kauppi et al. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1267, 18–23.
- Kawamata, M., and Nishimori, K. (2006). Mice deficient in *Dmrt7* show infertility with spermatogenic arrest at pachytene stage. *FEBS Letters* 580, 6442–6446.
- Kazazian, H.H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626–1632.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Schöler, H.R., et al. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Reports* 5, 1078–1083.
- Kerr, J.B., Millar, M., Maddocks, S., and Sharpe, R.M. (1993). Stage-Dependent changes in spermatogenesis and sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *The Anatomical Record* 235, 547–559.
- Keshet, E., Lyman, S.D., Williams, D.E., Anderson, D.M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Parada, L.F. (1991). Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *The EMBO Journal* 10, 2425.
- Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 271–284.
- Kim, J., Ishiguro, K., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A.M., Takeda, N., Sakakibara, Y., et al. (2015). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* 517, 466–471.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biology* 4, e187.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 16558–16563.
- Kimmins, S., and Sassone-Corsi, P. (2005). Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583–589.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91–103.

Kneitz, B., Cohen, P.E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M.F., Hou, H., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R., Pollard, J.W., and Edelman, W. (2000). MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* *14*, 1085–1097.

Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* *348*, 450–452.

Koshimizu, U., Sawada, K., Tajima, Y., Watanabe, D., and Nishimune, Y. (1991). White-spotting mutations affect the regenerative differentiation of testicular germ cells: demonstration by experimental cryptorchidism and its surgical reversal. *Biology of Reproduction* *45*, 642–648.

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 2474–2479.

Kowalczykiewicz, D., Pawlak, P., Lechniak, D., and Wrzesinski, J. (2012). Altered Expression of Porcine Piwi Genes and piRNA during Development. *PLoS ONE* *7*, e43816.

Kramerov, D.A., and Vassetzky, N.S. (2005). Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int. Rev. Cytol.* *247*, 165–221.

Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* *74*, 679–691.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 22323–22328.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of *Stra8* in the mammalian fetal ovary. *Developmental Biology* *356*, 63–70.

Krutskikh, A., Poliandri, A., Cabrera-Sharp, V., Dacheux, J.L., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. (2012). Epididymal protein Rnase10 is required for post-testicular sperm maturation and male fertility. *The FASEB Journal* *26*, 4198–4209.

Kumar, A., Shekhar, S., and Dhole, B. (2014). Thyroid and male reproduction. *Indian J Endocrinol Metab* *18*, 23–31.

Kumar, R., Ghyselinck, N., Ishiguro, K.-I., Watanabe, Y., Kouznetsova, A., Höög, C., Strong, E., Schimenti, J., Daniel, K., Toth, A., et al. (2015). MEI4: a central player in the regulation of meiotic DNA double strand break formation in the mouse. *J. Cell. Sci.*

Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T.J., Zhao, X., and Duester, G. (2011). Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by *Cyp26b1* independent of retinoic acid signalling. *Nature Communications* *2*, 151.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* *15*, 201–204.

Kuramochi-Miyagawa, S. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* *131*, 839–849.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., and Nakano, T. (2001). Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mechanisms of Development* *108*, 121–133.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., et al. (2010). MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev.* *24*, 887–892.

Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C., and Sassone-Corsi, P. (2000). Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4910–4921.

- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome–spindle attachments during cell division. *Nature Cell Biology* 6, 6–237.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lassen, L.B., Füchtbauer, A., Schmitz, A., Sørensen, A.B., Pedersen, F.S., and Füchtbauer, E.-M. (2013). Septin9 is involved in T-cell development and CD8+ T-cell homeostasis. *Cell and Tissue Research* 352, 695–705.
- Lavery, R., Chassot, A.-A., Pauper, E., Gregoire, E.P., Klopfenstein, M., de Rooij, D.G., Mark, M., Schedl, A., Ghyselinck, N.B., and Chaboissier, M.-C. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.* 8, e1003170.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.
- Lee, J. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 116, 2781–2790.
- Lenzi, M.L., Smith, J., Snowden, T., Kim, M., Fishel, R., Poulos, B.K., and Cohen, P.E. (2005). Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis i in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 112–127.
- Li, J. (2006). Saccharomyces cerevisiae Mer2, Mei4 and Rec114 Form a Complex Required for Meiotic Double-Strand Break Formation. *Genetics* 173, 1969–1981.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Li, J., Guo, W., Li, F., He, J., Yu, Q., Wu, X., Li, J., and Mao, X. (2012). HnRNPL as a key factor in spermatogenesis: Lesson from functional proteomic studies of azoospermia patients with sertoli cell only syndrome. *Journal of Proteomics* 75, 2879–2891.
- Li, X.Z., Roy, C.K., Dong, X., Bolcun-Filas, E., Wang, J., Han, B.W., Xu, J., Moore, M.J., Schimenti, J.C., Weng, Z., et al. (2013). An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Mol. Cell* 50, 67–81.
- Libby, B.J., De La Fuente, R., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., Eaker, S., Handel, M.A., Eppig, J.J., and Schimenti, J.C. (2002). The Mouse Meiotic Mutation mei1 Disrupts Chromosome Synapsis with Sexually Dimorphic Consequences for Meiotic Progression. *Developmental Biology* 242, 174–187.
- Lim, S.L., Tsend-Ayush, E., Kortschak, R.D., Jacob, R., Ricciardelli, C., Oehler, M.K., and Grutzner, F. (2013). Conservation and Expression of PIWI-Interacting RNA Pathway Genes in Male and Female Adult Gonad of Amniotes. *Biology of Reproduction* 89, 136–136.
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., and Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* 125, 1157–1163.
- Lin, Y., Gill, M.E., Koubova, J., and Page, D.C. (2008). Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 322, 1685–1687.
- Lin, Y.-N., Roy, A., Yan, W., Burns, K.H., and Matzuk, M.M. (2007). Loss of Zona Pellucida Binding Proteins in the Acrosomal Matrix Disrupts Acrosome Biogenesis and Sperm Morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 27, 6794–6805.
- Lipkin, S.M., Moens, P.B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J.W., Green, E.D., et al. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics*.

- Liu, C.-F., Bingham, N., Parker, K., and Yao, H.H.-C. (2008). Sex-specific roles of  $\beta$ -catenin in mouse gonadal development. *Human Molecular Genetics* 18, 405–417.
- Liu, D., Matzuk, M.M., Sung, W.K., Guo, Q., Wang, P., and Wolgemuth, D.J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* 20, 377–380.
- Luk, A.C.-S., Chan, W.-Y., Rennert, O.M., and Lee, T.-L. (2014). Long noncoding RNAs in spermatogenesis: insights from recent high-throughput transcriptome studies. *Reproduction* 147, R131–R141.
- Luo, M., Zhou, J., Leu, N.A., Abreu, C.M., Wang, J., Anguera, M.C., de Rooij, D.G., Jasin, M., and Wang, P.J. (2015). Polycomb protein SCML2 associates with USP7 and counteracts histone H2A ubiquitination in the XY chromatin during male meiosis. *PLoS Genet.* 11, e1004954.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- Lynn, A., Koehler, K.E., Judis, L., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A., and Hassold, T.J. (2002). Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296, 2222–2225.
- Lyon, M.F., and Hawkes, S.G. (1970). X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227, 1217–1219.
- Ma, L., Buchold, G.M., Greenbaum, M.P., Roy, A., Burns, K.H., Zhu, H., Han, D.Y., Harris, R.A., Coarfa, C., Gunaratne, P.H., et al. (2009). GASZ Is Essential for Male Meiosis and Suppression of Retrotransposon Expression in the Male Germline. *PLoS Genetics* 5, e1000635.
- Maekawa, M., Kamimura, K., and Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 1–13.
- Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27, 271–276.
- Manuylov, N.L., Smagulova, F.O., Leach, L., and Tevosian, S.G. (2008). Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development* 135, 3731–3743.
- Martinerie, L., Manterola, M., Chung, S.S.W., Panigrahi, S.K., Weisbach, M., Vasileva, A., Geng, Y., Sicinski, P., and Wolgemuth, D.J. (2014). Mammalian E-type Cyclins Control Chromosome Pairing, Telomere Stability and CDK2 Localization in Male Meiosis. *PLoS Genetics* 10, e1004165.
- Martinez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., et al. (2008). A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep: A deletion in the BMP15 gene. *Animal Genetics* 39, 294–297.
- De Massy, B. (2013). Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 47, 563–599.
- Mathioudakis, N., Palencia, A., Kadlec, J., Round, A., Tripsianes, K., Sattler, M., Pillai, R.S., and Cusack, S. (2012). The multiple Tudor domain-containing protein TDRD1 is a molecular scaffold for mouse Piwi proteins and piRNA biogenesis factors. *RNA* 18, 2056–2072.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2010). The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Developmental Cell* 19, 612–624.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476, 101–104.
- May, K.M., and Hardwick, K.G. (2006). The spindle checkpoint. *Journal of Cell Science* 119, 4139–4142.

- McElreavy, K., Vilain, E., Abbas, N., Costa, J.M., Souleyreau, N., Kucheria, K., Boucekkine, C., Thibaud, E., Brauner, R., and Flamant, F. (1992). XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 11016–11020.
- McKee, B.D., and Handel, M.A. (1993). Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* *102*, 71–80.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K., and Robertson, D.M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* *57*, 149–179.
- Meeks, J.J. (2003). Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* *130*, 1029–1036.
- Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C., Bucala, R., Wreford, N., Lan, H., Atkins, R., and Hedger, M. (1998). Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol. Reprod.* *59*, 371–378.
- Meistrich, M.L., Bucci, L.R., Trostle-Weige, P.K., and Brock, W.A. (1985). Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev. Biol.* *112*, 230–240.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* *111*, 483–488.
- Mendis-Handagama, S.M., and Ariyaratne, H.B. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.* *65*, 660–671.
- Mendoza-Lujambio, I., Burfeind, P., Dixkens, C., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S., Engel, W., and Neesen, J. (2002). The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1647–1658.
- Menke, D.B., Koubova, J., and Page, D.C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental Biology* *262*, 303–312.
- Meyn, M.S. (1999). Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clinical Genetics* *55*, 289–304.
- Minkina, A., Matson, C.K., Lindeman, R.E., Ghyselinck, N.B., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2014). DMRT1 Protects Male Gonadal Cells from Retinoid-Dependent Sexual Transdifferentiation. *Developmental Cell* *29*, 511–520.
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L., and Behringer, R.R. (1996). Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* *10*, 2577–2587.
- Mital, P., Hinton, B.T., and Dufour, J.M. (2011). The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biology of Reproduction* *84*, 851–858.
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Yogev, L., Maduro, M.R., Ishikawa, M., Westphal, H., and Lamb, D.J. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* *362*, 1714–1719.
- Mochida, K., Tres, L.L., and Kierszenbaum, A.L. (1999). Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the azh/azh mutant mouse. *Molecular Reproduction and Development* *52*, 434–444.
- Moens, P.B., and Spyropoulos, B. (1995). Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma* *104*, 175–182.
- Molyneaux, K.A. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279–4286.
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., et al. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* *136*, 1813–1821.

- Montazer-Torbati, F., Kocer, A., Auguste, A., Renault, L., Charpigny, G., Pailhoux, E., and Pannetier, M. (2010). A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. *Developmental Dynamics* 239, 3324–3335.
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62–68.
- Morelli, M.A., and Cohen, P.E. (2005). Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130, 761–781.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14 *Spec No 1*, R47–R58.
- Moss, S.B., and Orth, J.M. (1993). Localization of a spermatid-specific histone 2B protein in mouse spermiogenic cells. *Biol. Reprod.* 48, 1047–1056.
- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25, 747–806.
- Mukherjee, N., Lager, P.J., Friedersdorf, M.B., Thompson, M.A., and Keene, J.D. (2009). Coordinated posttranscriptional mRNA population dynamics during T-cell activation. *Molecular Systems Biology* 5.
- Muller, S., Raman Pandey, R., and Pillai, R.S. (2013). Les piARN forgent un système immunitaire pour le génome. *Médecine/sciences* 29, 487–494.
- Nair, M., Nagamori, I., Sun, P., Mishra, D.P., Rhéaume, C., Li, B., Sassone-Corsi, P., and Dai, X. (2008). Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Developmental Biology* 320, 446–455.
- Namekawa, S.H., Park, P.J., Zhang, L.-F., Shima, J.E., McCarrey, J.R., Griswold, M.D., and Lee, J.T. (2006). Postmeiotic Sex Chromatin in the Male Germline of Mice. *Current Biology* 16, 660–667.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559–565.
- Nickerson, H.D., Joshi, A., and Wolgemuth, D.J. (2007). Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Developmental Biology* 306, 725–735.
- Nicklas, R.B. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science* 275, 632–637.
- Nishant, K.T., Ravishankar, H., and Rao, M.R.S. (2004). Characterization of a Mouse Recombination Hot Spot Locus Encoding a Novel Non-Protein-Coding RNA. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5620–5634.
- Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., et al. (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 284–287.
- Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., and Baba, T. (2004). Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34957–34962.
- Noblanc, A., Kocer, A., and Drevet, J.R. (2012). Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires: Le rôle de l'épididyme. *Médecine/sciences* 28, 519–525.
- Norton, J.N., and Skinner, M.K. (1989). Regulation of Sertoli cell function and differentiation through the actions of a testicular paracrine factor P-Mod-S. *Endocrinology* 124, 2711–2719.
- Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B., and Trasler, J.M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev. Biol.* 307, 368–379.

- Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., and Oatley, J.M. (2011). Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice. *Biology of Reproduction* *85*, 347–356.
- O'Bryan, M.K., Takada, S., Kennedy, C.L., Scott, G., Harada, S., Ray, M.K., Dai, Q., Wilhelm, D., de Kretser, D.M., Eddy, E.M., et al. (2008). Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Developmental Biology* *316*, 359–370.
- O'Donnell, L., and O'Bryan, M.K. (2014). Microtubules and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *30*, 45–54.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* *1*, 14–35.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* *41*, 528–540.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., et al. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* *436*, 207–213.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature Genetics* *35*, 25–31.
- Orth, J.M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* *203*, 485–492.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., and Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* *122*, 787–794.
- Ortogero, N., Schuster, A.S., Oliver, D.K., Riordan, C.R., Hong, A.S., Hennig, G.W., Luong, D., Bao, J., Bhetwal, B.P., Ro, S., et al. (2014). A novel class of somatic small RNAs similar to germ cell pachytene PIWI-interacting small RNAs. *J. Biol. Chem.* *289*, 32824–32834.
- O'Shaughnessy, P.J. (2005). Neuroendocrine Regulation of Leydig Cell Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1061*, 109–119.
- O'Shaughnessy, P.J. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *29*, 55–65.
- O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., and Abel, M. (2012). Testicular Development in Mice Lacking Receptors for Follicle Stimulating Hormone and Androgen. *PLoS ONE* *7*, e35136.
- Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A., and Schlessinger, D. (2007). Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Human Molecular Genetics* *16*, 2795–2804.
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., Bronner, S., Lutz, Y., and Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *The Journal of Cell Biology* *135*, 469–477.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Serval, N., Taourit, S., Furet, J.P., Fellous, M., Grosclaude, F., Crihiu, E.P., Cotinot, C., et al. (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* *29*, 453–458.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Vaiman, D., Serval, N., Chaffaux, S., Crihiu, E.P., and Cotinot, C. (2002). Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Developmental Dynamics* *224*, 39–50.

- Pakarainen, T., Zhang, F.-P., Mäkelä, S., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. (2005). Testosterone Replacement Therapy Induces Spermatogenesis and Partially Restores Fertility in Luteinizing Hormone Receptor Knockout Mice. *Endocrinology* *146*, 596–606.
- Paniagua, R., and Nistal, M. (1984). Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *Journal of Anatomy* *139*, 535.
- Parra, M.T. (2003). Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *Journal of Cell Science* *116*, 961–974.
- Parra, M.T. (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *Journal of Cell Science* *117*, 1221–1234.
- Parvinen, M. (2005). The chromatoid body in spermatogenesis: Chromatoid body. *International Journal of Andrology* *28*, 189–201.
- Van Pelt, A.M., and De Rooij, D.G. (1990). The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biology of Reproduction* *42*, 677–682.
- Van Pelt, A.M., and de Rooij, D.G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* *128*, 697–704.
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *7*, 644–656.
- Pillai, R.S., and Chuma, S. (2012). piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev. Growth Differ.* *54*, 78–92.
- Pitetti, J.-L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., et al. (2013). An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. *Molecular Endocrinology* *27*, 814–827.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* *1*, 697–705.
- Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrassi, F., Giordano, R., Magnano, A.R., Lorenzini, R., Lavia, P., and Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell. Sci.* *112 ( Pt 20)*, 3537–3548.
- Plug, A.W., Peters, A.H., Keegan, K.S., Hoekstra, M.F., de Boer, P., and Ashley, T. (1998). Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J. Cell. Sci.* *111 ( Pt 4)*, 413–423.
- Pöllänen, P., and Maddocks, S. (1988). Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J. Reprod. Fertil.* *82*, 437–445.
- Pollard, J.W. (1997). Role of colony-stimulating factor-1 in reproduction and development. *Mol. Reprod. Dev.* *46*, 54–60; discussion 60–61.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* *463*, 1101–1105.
- Prieto, I., Suja, J.A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A, C., Rufas, J.S., and Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* *3*, 761–766.
- Qi, S.-T., Wang, Z.-B., Ouyang, Y.-C., Zhang, Q.-H., Hu, M.-W., Huang, X., Ge, Z., Guo, L., Wang, Y.-P., Hou, Y., et al. (2013). Overexpression of SET , a protein localizing to centromeres, causes precocious separation of chromatids during the first meiosis of mouse oocytes. *Journal of Cell Science* *126*, 1595–1603.

Quénet, D., Mark, M., Govin, J., van Dorsselear, A., Schreiber, V., Khochbin, S., and Dantzer, F. (2009). Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: Identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2. *Experimental Cell Research* 315, 2824–2834.

Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839, 155–168.

Ravnik, S.E., and Wolgemuth, D.J. (1996). The Developmentally Restricted Pattern of Expression in the Male Germ Line of a Murine Cyclin A, Cyclin A2, Suggests Roles in Both Mitotic and Meiotic Cell Cycles. *Developmental Biology* 173, 69–78.

Reid, A.T., Redgrove, K., Aitken, R.J., and Nixon, B. (2011). Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl* 13, 88–96.

Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A., and Pillai, R.S. (2009). Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 639–646.

Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., Antony, C., Sachidanandam, R., and Pillai, R.S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* 480, 264–267.

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., and Jessberger, R. (2001). Novel Meiosis-Specific Isoform of Mammalian SMC1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 6984–6998.

Richardson, C., Stark, J.M., Ommundsen, M., and Jasin, M. (2004). Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 23, 546–553.

Richardson, L.L., Kleinman, H.K., and Dym, M. (1995). Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol. Reprod.* 52, 320–330.

Rodriguez-Osorio, N., Wang, H., Rupinski, J., Bridges, S.M., and Memili, E. (2010). Comparative functional genomics of mammalian DNA methyltransferases. *Reproductive BioMedicine Online* 20, 243–255.

Rogacheva, M.V., Manhart, C.M., Chen, C., Guarne, A., Surtees, J., and Alani, E. (2014). Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. *J. Biol. Chem.* 289, 5664–5673.

Rogenhofer, N., Dansranjavin, T., Schorsch, M., Spiess, A., Wang, H., von Schonfeldt, V., Cappallo-Obermann, H., Baukloh, V., Yang, H., Paradowska, A., et al. (2013). The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Human Reproduction* 28, 969–978.

Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* 6, 975–987.

De Rooij, D.G. (1998). Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 79, 67–80.

Rosario, M.O., Perkins, S.L., O'Brien, D.A., Allen, R.L., and Eddy, E.M. (1992). Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Dev. Biol.* 150, 1–11.

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133, 4861–4869.

Russell, L.B. (1990). Patterns of mutational sensitivity to chemicals in poststem-cell stages of mouse spermatogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340C, 101–113.

Russell, L.D., Russell, J.A., MacGregor, G.R., and Meistrich, M.L. (1991). Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am. J. Anat.* 192, 97–120.

- Russell, L.D., Kershaw, M., Borg, K.E., El Shennawy, A., Rulli, S.S., Gates, R.J., and Calandra, R.S. (1998). Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *J. Androl.* *19*, 308–319; discussion 341–342.
- Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* *325*, 1394–1398.
- Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* *21*, 1603–1608.
- Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* *418*, 293–300.
- Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* *139*, 15–31.
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P.B., Bestor, T.H., and Trasler, J.M. (2004). Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Developmental Biology* *268*, 403–415.
- Santucci-Darmanin, S., Walpita, D., Lespinasse, F., Desnuelle, C., Ashley, T., and Paquis-Flucklinger, V. (2000). MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J.* *14*, 1539–1547.
- Sapiro, R., Kostetskii, I., Olds-Clarke, P., Gerton, G.L., Radice, G.L., and Strauss III, J.F. (2002). Male Infertility, Impaired Sperm Motility, and Hydrocephalus in Mice Deficient in Sperm-Associated Antigen 6. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 6298–6305.
- Sarkar, A., Maji, R.K., Saha, S., and Ghosh, Z. (2014). piRNAQuest: searching the piRNAome for silencers. *BMC Genomics* *15*, 555.
- Sasanuma, H., Murakami, H., Fukuda, T., Shibata, T., Nicolas, A., and Ohta, K. (2007). Meiotic association between Spo11 regulated by Rec102, Rec104 and Rec114. *Nucleic Acids Research* *35*, 1119–1133.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* *296*, 2176–2178.
- Schmahl, J., Eicher, E.M., Washburn, L.L., and Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* *127*, 65–73.
- Schmidt, D. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* *131*, 933–942.
- Schultz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K., and Bork, P. (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.* *6*, 249–253.
- Sela, N., Kim, E., and Ast, G. (2010). The role of transposable elements in the evolution of non-mammalian vertebrates and invertebrates. *Genome Biol.* *11*, R59.
- Shamsadin, R., Adham, I.M., Nayernia, K., Heinlein, U.A., Oberwinkler, H., and Engel, W. (1999). Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol. Reprod.* *61*, 1445–1451.
- Shan, L.X., and Hardy, M.P. (1992). Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* *131*, 1107–1114.
- Shannon, M., Richardson, L., Christian, A., Handel, M.A., and Thelen, M.P. (1999). Differential gene expression of mammalian SPO11/TOP6A homologs during meiosis. *FEBS Lett.* *462*, 329–334.
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., et al. (2013). Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Molecular Endocrinology* *27*, 63–73.

Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., et al. (2009). The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev. Cell* *17*, 775–787.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* *346*, 240–244.

Singh, J., O'Neill, C., and Handelsman, D.J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* *136*, 5311–5321.

Skinner, M.K., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology* *100*, 1941–1947.

Smith, F.F., Tres, L.L., and Kierszenbaum, A.L. (1992). Expression of testis-specific histone genes during the development of rat spermatogenic cells in vitro. *Developmental Dynamics* *193*, 49–57.

Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bosl, M.R., and Wegner, M. (2001). Idiopathic Weight Reduction in Mice Deficient in the High-Mobility-Group Transcription Factor Sox8. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 6951–6959.

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., and Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *109*, 323–330.

Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 1026–1032.

Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434–1437.

Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* *34*, 384–390.

Soper, S.F.C., van der Heijden, G.W., Hardiman, T.C., Goodheart, M., Martin, S.L., de Boer, P., and Bortvin, A. (2008). Mouse Maelstrom, a Component of Nuage, Is Essential for Spermatogenesis and Transposon Repression in Meiosis. *Developmental Cell* *15*, 285–297.

Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., Duquenne, C., Messiaen, S., Martini, E., Bernardino-Sgherri, J., et al. (2013). MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet.* *9*, e1003784.

De Sousa Lopes, S.M.C. (2004). BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development* *18*, 1838–1849.

Spiridonov, N.A., Wong, L., Zervas, P.M., Starost, M.F., Pack, S.D., Paweletz, C.P., and Johnson, G.R. (2005). Identification and Characterization of SSTK, a Serine/Threonine Protein Kinase Essential for Male Fertility. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 4250–4261.

Steadman, D.J., Giuffrida, D., and Gelmann, E.P. (2000). DNA-binding sequence of the human prostate-specific homeodomain protein NKX3.1. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2389–2395.

Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol.* *199*, 471–487.

Steger, K. (2001). Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol.* *203*, 323–334.

Stern, L., Kleene, K.C., Gold, B., and Hecht, N.B. (1983). Gene expression during mammalian spermatogenesis: III. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Experimental Cell Research* *143*, 247–255.

- Sun, F., and Handel, M.A. (2008). Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 117, 471–485.
- Sun, Y.T., Irby, D.C., Robertson, D.M., and de Kretser, D.M. (1989). The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 125, 1000–1010.
- Sun, Z., Niu, R., Su, K., Wang, B., Wang, J., Zhang, J., and Wang, J. (2010). Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in sperm from mice: an in vivo study. *Archives of Toxicology* 84, 353–361.
- Suzuki, A., and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & Development* 22, 430–435.
- Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., and Saga, Y. (2008). Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Developmental Biology* 318, 133–142.
- Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R., and Camerino, G. (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat. Genet.* 12, 404–409.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., and Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761–767.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S.E., Hawkins, C.F., Wolgemuth, D.J., and Carrington, M. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* 122, 53–64.
- Syed, V., Gérard, N., Kaipia, A., Bardin, C.W., Parvinen, M., and Jégou, B. (1993). Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology* 132, 293–299.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Takase, M., Tsutsui, K., and Kawashima, S. (1990). Effects of PRL and FSH on LH binding and number of Leydig cells in hypophysectomized mice. *Endocrinologia Japonica* 37, 193–203.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., et al. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534–538.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Toyama, Y., Kitamura, K., Takahashi, T., Kaseda, K., Maekawa, M., and Nishimune, Y. (2004). Mice Deficient in the Axonemal Protein Tektin-t Exhibit Male Infertility and Immotile-Cilium Syndrome Due to Impaired Inner Arm Dynein Function. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7958–7964.
- Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Tsoi, B., Lickert, H., and Tam, P.P.L. (2005). IFITM/Mil/Fragilis Family Proteins IFITM1 and IFITM3 Play Distinct Roles in Mouse Primordial Germ Cell Homing and Repulsion. *Developmental Cell* 9, 745–756.
- Tang, H., Brennan, J., Karl, J., Hamada, Y., Raetzman, L., and Capel, B. (2008). Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development* 135, 3745–3753.
- Tapanainen, J.S., Aittomäki, K., Min, J., Vaskivuo, T., and Huhtaniemi, I.T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat. Genet.* 15, 205–206.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E., and Moens, P.B. (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J. Cell Biol.* 147, 207–220.
- Taylor, S.S., Scott, M.I.F., and Holland, A.J. (2004). The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res.* 12, 599–616.

- Tease, C., and Hultén, M.A. (2004). Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells. *Cytogenet. Genome Res.* *107*, 208–215.
- Terada, N., Ohno, N., Saitoh, S., Saitoh, Y., Komada, M., Kubota, H., and Ohno, S. (2010). Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. *Reproduction* *139*, 883–892.
- Thomson, T., and Lin, H. (2009). The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *25*, 355–376.
- Tripiciano, A., Filippini, A., Ballarini, F., and Palombi, F. (1998). Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* *138*, 143–150.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* *301*, 1239–1241.
- TsUZUKI, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and others (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 6236–6240.
- Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A., Loeser, C.R., and Pereira, B.M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp. Cell Res.* *240*, 151–164.
- Turner, J.M.A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* *134*, 1823–1831.
- Turner, J.M.A., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G.V.R., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S., and Deng, C.-X. (2004a). BRCA1, Histone H2AX Phosphorylation, and Male Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *Current Biology* *14*, 2135–2142.
- Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., and Burgoyne, P.S. (2004b). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics*.
- Uda, M. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics* *13*, 1171–1181.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.-C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., et al. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* *139*, 1130–1142.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., and Zamore, P.D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* *313*, 320–324.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* *397*, 405–409.
- Vanhoutteghem, A., Messiaen, S., Hervé, F., Delhomme, B., Moison, D., Petit, J.-M., Rouiller-Fabre, V., Livera, G., and Djian, P. (2014). The zinc-finger protein basonuclin 2 is required for proper mitotic arrest, prevention of premature meiotic initiation and meiotic progression in mouse male germ cells. *Development* *141*, 4298–4310.
- Verhoeven, G., Deboel, L., Swinnen, J., Rombauts, L., Vanderhoydonc, F., Rosseels, J., Hoeben, E., and Heyns, W. (1995). Effect of androgens on the germ cell-depleted testes of prenatally irradiated rats. *Int. J. Androl.* *18*, 23–34.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* *121*, 1139–1150.
- Vogt, E., Kirsch-Volders, M., Parry, J., and Eichenlaub-Ritter, U. (2008). Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* *651*, 14–29.

- Vouk, K. (2005). Combinations of genetic changes in the human cAMP-responsive element modulator gene: a clue towards understanding some forms of male infertility? *Molecular Human Reproduction* *11*, 567–574.
- De Vries, F.A.T. (2005). Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & Development* *19*, 1376–1389.
- De Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P., and te Riele, H. (1999). Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* *13*, 523–531.
- Walker, W.H., Fucci, L., and Habener, J.F. (1995). Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinology* *136*, 3534–3545.
- Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* *43*, 904–914.
- Wang, J., Wreford, N.G., Lan, H.Y., Atkins, R., and Hedger, M.P. (1994). Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol. Reprod.* *51*, 551–561.
- Wang, P.J., Page, D.C., and McCarrey, J.R. (2005). Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2911–2918.
- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461–464.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* *20*, 1732–1743.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* *453*, 539–543.
- Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., et al. (2011). MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Developmental Cell* *20*, 364–375.
- Waterston, R.H., Lander, E.S., and Sulston, J.E. (2002). On the sequencing of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 3712–3716.
- Welsh, M., Saunders, P.T.K., Atanassova, N., Sharpe, R.M., and Smith, L.B. (2009). Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal* *23*, 4218–4230.
- Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., and Koopman, P. (2007). SOX9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription in Vivo to Ensure Testis Development. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 10553–10560.
- Wiltshire, T., Park, C., Caldwell, K.A., and Handel, M.A. (1995). Induced premature G2/M-phase transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis. *Dev. Biol.* *169*, 557–567.
- Wreford, N.G., Rajendra Kumar, T., Matzuk, M.M., and de Kretser, D.M. (2001). Analysis of the testicular phenotype of the follicle-stimulating hormone beta-subunit knockout and the activin type II receptor knockout mice by stereological analysis. *Endocrinology* *142*, 2916–2920.
- Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto, K., Chuma, S., and Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *The Journal of Cell Biology* *192*, 781–795.

- Yamaguchi, R., Yamagata, K., Ikawa, M., Moss, S.B., and Okabe, M. (2006). Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice. *Biology of Reproduction* 75, 760–766.
- Yamaguchi, R., Muro, Y., Isotani, A., Tokuhiro, K., Takumi, K., Adham, I., Ikawa, M., and Okabe, M. (2009). Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse. *Biology of Reproduction* 81, 142–146.
- Yamamoto, T.S., Takagi, C., Hyodo, A.C., and Ueno, N. (2001). Suppression of head formation by Xmsx-1 through the inhibition of intracellular nodal signaling. *Development* 128, 2769–2779.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., et al. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.* 15, 854–866.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.-M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468–474.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371–372.
- Yang, W.-X. (2003). C-Terminal Kinesin Motor KIFC1 Participates in Acrosome Biogenesis and Vesicle Transport. *Biology of Reproduction* 69, 1719–1729.
- Yang, F., Eckardt, S., Leu, N.A., McLaughlin, K.J., and Wang, P.J. (2008a). Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *The Journal of Cell Biology* 180, 673–679.
- Yang, F., Gell, K., van der Heijden, G.W., Eckardt, S., Leu, N.A., Page, D.C., Benavente, R., Her, C., Hoog, C., McLaughlin, K.J., et al. (2008b). Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes & Development* 22, 682–691.
- Yao, H.H.-C. (2003). Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development* 130, 5895–5902.
- Yao, H.H.C., Matzuk, M.M., Jorgez, C.J., Menke, D.B., Page, D.C., Swain, A., and Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics* 230, 210–215.
- Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K., and Noda, T. (2002). Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11211–11216.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 14, 1053–1063.
- Ying, Y., Qi, X., and Zhao, G.-Q. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 7858–7862.
- Young, R., Bouet, S., Polyte, J., Le Guillou, S., Passet, B., Vilotte, M., Castille, J., Beringue, V., Le Provost, F., Laude, H., et al. (2011). Expression of the prion-like protein Shadoo in the developing mouse embryo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 416, 184–187.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A., and Jameson, J.L. (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20, 353–357.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Hoja, M.-R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., and Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296, 1115–1118.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., and McCabe, E.R. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635–641.

Zhang, T., Murphy, M.W., Gearhart, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2014). The mammalian Doublesex homolog DMRT6 coordinates the transition between mitotic and meiotic developmental programs during spermatogenesis. *Development* *141*, 3662–3671.

Zhu, D., Dix, D.J., and Eddy, E.M. (1997). HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* *124*, 3007–3014.

# **Annexes**

# TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates

Adrienne Baillet<sup>1,2</sup>, Ronan Le Bouffant<sup>3</sup>, Jean Nicolas Volff<sup>4</sup>, Alix Luangpraseuth<sup>1,2</sup>, Elodie Pomerol<sup>1,2</sup>, Dominique Thépot<sup>1,2</sup>, Eric Pailhoux<sup>1,2</sup>, Gabriel Livera<sup>3</sup>, Corinne Cotinot<sup>1,2</sup>, Béatrice Mandon-Pépin<sup>1,2\*</sup>

**1** INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France, **2** ENVA, Maisons Alfort, France, **3** CEA, DSV/DRR/SEGG/LDRG, Laboratory of Differentiation and Radiobiology of the Gonads, Unit of Gametogenesis and Genotoxicity, Fontenay aux Roses, France, **4** Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

## Abstract

**Background:** We had previously reported that the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) approach was relevant for the isolation of new mammalian genes involved in oogenesis and early follicle development. Some of these transcripts might be potential new oocyte and granulosa cell markers. We have now characterized one of them, named *TOPAZ1* for the Testis and Ovary-specific PAZ domain gene.

**Principal Findings:** Sheep and mouse *TOPAZ1* mRNA have 4,803 bp and 4,962 bp open reading frames (20 exons), respectively, and encode putative *TOPAZ1* proteins containing 1,600 and 1,653 amino acids. They possess PAZ and CCCH domains. In sheep, *TOPAZ1* mRNA is preferentially expressed in females during fetal life with a peak during prophase I of meiosis, and in males during adulthood. In the mouse, *Topaz1* is a germ cell-specific gene. *TOPAZ1* protein is highly conserved in vertebrates and specifically expressed in mouse and sheep gonads. It is localized in the cytoplasm of germ cells from the sheep fetal ovary and mouse adult testis.

**Conclusions:** We have identified a novel PAZ-domain protein that is abundantly expressed in the gonads during germ cell meiosis. The expression pattern of *TOPAZ1*, and its high degree of conservation, suggests that it may play an important role in germ cell development. Further characterization of *TOPAZ1* may elucidate the mechanisms involved in gametogenesis, and particularly in the RNA silencing process in the germ line.

**Citation:** Baillet A, Le Bouffant R, Volff JN, Luangpraseuth A, Pomerol E, et al. (2011) TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates. PLoS ONE 6(11): e26950. doi:10.1371/journal.pone.0026950

**Editor:** Renee A. Reijo Pera, Stanford University, United States of America

**Received:** May 2, 2011; **Accepted:** October 6, 2011; **Published:** November 1, 2011

**Copyright:** © 2011 Baillet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by PHASE Division, INRA. AB was supported by a doctoral fellowship from the Ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: beatrice.pepin@jouy.inra.fr

## Introduction

Ovarian development in mammals involves coordinated and multiple and complex molecular, cellular and morphogenetic events. Unlike testis differentiation, where germ cells are dispensable, oocytes are required to induce and maintain ovarian somatic cells [1]. Some key events occur during development of the fetal mammalian ovary, including, colonization of the undifferentiated gonad by primordial germ cells (PGCs) and then their proliferation, the entrance of germ cells into meiosis, atresia of germ cells and the formation of primordial follicles [2]. Although animal germline development varies in different species, some general rules have emerged. During the earliest embryonic stages, PGCs proliferate in a niche supported by somatic cells and then differentiate into germline stem cells, which proliferate through self-renewal. Formation of the germ cell nest (or cyst) is an important step in germline differentiation that has been conserved during evolution from insects to vertebrates [3,4]. Oogonia in nests are clonally derived [5] and germline nest formation occurs through incomplete cytokinesis during mitosis, resulting in the connection of daughter cells by intercellular bridges [6,7]. In the

mouse, the maximum number of germ cell clusters is detected on embryonic day 13.5, just prior to the commitment of PGCs to the oocyte developmental program and entry into meiosis [8]. Within germ cell nests, the oogonia enter meiotic prophase [9,10]. Several global approaches using microarray technologies have been used to isolate the genes involved in meiosis by comparing transcriptional activity in ovaries with or without germ cells in meiotic prophase I [11–15]. Both germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos [16,17]. The RNA-binding protein DAZL (Deleted in AZospermia-like), expressed by both male and female post-migratory germ cells, is one of the first intrinsic factors necessary to enroll germ cells in the meiosis event [17] in response to retinoic acid (RA). Entry into meiosis is then controlled by RA signals that are blocked in the testis by CYP26B1 (cytochrome P450 26B1) [18–20] and fibroblast growth factor 9 (FGF9) [21]. In the fetal ovary, RA signaling acts on germ cells to promote the expression of the cytoplasmic factor Stra8 (Stimulated by Retinoic acid). Stra8 is required for premeiotic DNA synthesis, meiotic initiation and meiotic progression in germ cells [22,23]. Consistent with the central role that RA is believed to play in vertebrate germline development and the sex-specific timing of

entry into meiosis, RA appears to function as one of the principal inducers of Stra8 expression in early germ cells [24–27]. However, another study reported that Stra 8 expression in the mouse fetal ovary does not require RA signaling, and that Stra8 expression is expressed in the absence of physiologically detectable levels of RA [28]. That study demonstrated that another unknown inducer of Stra8 might be involved in Stra8 expression to enable the initiation of mouse meiosis.

Just after birth in the mouse, and during fetal life in ruminants and humans, the nests break down to form individual primordial follicles [8,29,30]. Their formation, and the transition to primary follicles, represents a critical period of follicle formation [31,32]. Ovarian follicles are the functional units within the female gonad that nurture oocyte maturation and enable the production of steroid hormones.

During the past ten years, many of the growth factors and signaling proteins that mediate the early stages of folliculogenesis have been identified using mouse genetic models, *in vivo* injection studies, and *ex vivo* organ culture techniques. These studies revealed important roles for the transforming growth factor beta (*Tgf-beta*) superfamily of proteins in the ovary [33–35]. Moreover, several transcription factors are known to affect the regulation of oocyte-specific genes during early folliculogenesis (**Figure S1**). *Figla* (a factor in the germline alpha) regulates the expression of numerous genes in the ovary, including *Zp2*, *Pou5f1*, *Nlrp14*, *Nlrp4f*, and *Nlrp4b* [36,37]. *Nobox* (newborn ovary homeobox gene) is necessary for the expression of several key oocyte-specific genes, including *Gdf9* and *Pou5f1* [38–40]. *Sohlh1* (spermatogenesis- and oogenesis-specific bHLH transcription factor 1) is another germ cell-specific gene that encodes a bHLH protein [41]. *Sohlh1* lies upstream of *Lhx8*, *Zp1*, and *Zp3* and is preferentially expressed in primordial oocytes [41]. More recently, Rajkovic's team described a novel spermatogenesis- and oogenesis-specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, *Sohlh2* [42,43]. *Sohlh2*-deficient ovaries can form primordial follicles that do not differentiate surrounding granulosa cells into cuboidal and multilayered structures [43].

In addition to these functional relationships, small non-coding RNAs, including microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), and Piwi-interacting RNAs (piRNAs) have been implicated as key regulators, especially in the gonads of eukaryotes [44]. It has been shown that piRNAs become abundant in germ cells at around the pachytene stage of prophase of meiosis I [45], but they may be present at lower levels during earlier stages. It has been shown that piRNAs repress transposable elements (TEs) but their molecular functions are still unknown [46–49]. Unlike

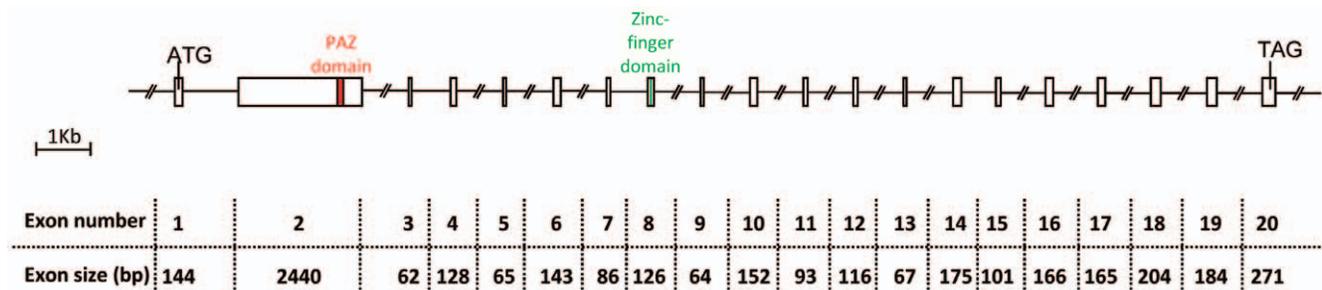
microRNAs, individual piRNAs sequences per se are not conserved.

In order to discover novel genes expressed in the ovary during prophase I meiosis of germ cells and follicle formation, we previously reported on the generation of two sheep fetal ovary cDNA libraries, obtained by applying SSH using mRNAs isolated from 55 and 82 day *post-coitum* (*dpc*) female gonads [50]. In this species, meiosis occurs between days 50 and 75 and the first primordial follicles are observed at around days 75–80 of gestation [51]. In the resulting libraries [50], we found several transcripts with sex or stage-specific patterns of expression, such as *MOV10L1* (EMBL:CU654655), [52–54], *TEX11* (EMBL:CU651916), [55] and Gametocyte-specific factor 1 (*GTSF1*) (EMBL:CU652509), [56]. Among these transcripts, we isolate an EST encoding a putative protein with a PAZ domain (Piwi/Argonaute/Zwille), namely *TOPAZ1* (EMBL: CU654960 and CU655260). During the current study, we characterize the genomic structure of the *TOPAZ1* gene and determine its expression pattern during development in sheep and mouse. We show here that *TOPAZ1/Topaz1* is expressed in both the male and female gonads and is highly conserved among vertebrates, including fish, amphibians, birds and mammals. Furthermore, we demonstrate that *TOPAZ1/Topaz1* mRNA and TOPAZ1 protein are localized in both male and female germ cells lineages.

## Results

### Characterization of *TOPAZ1* transcripts

*CU654960* and *CU655260* ESTs arising from our previously described sheep fetal ovary libraries [50] were aligned with public EST databases and displayed significant similarity with human testis EST (Genbank AI208289): identities = 393/428 (92%); e value = 2e-171. As this sheep EST was expressed in the testis and ovary and contained a PAZ-domain, we decided to call it *TOPAZ1*. In order to characterize the full-length sequence of the *TOPAZ1* transcript in sheep, 5'RACE experiments were performed using mRNA from female fetal ovaries of 60 days *post-coitum* (60 *dpc*). The primers used during the 5'RACE experiments are listed in **Table S1**. Moreover, the rest of the coding sequence of *TOPAZ1* cDNA was cloned by successive PCR procedures from sheep fetal ovaries of 60 *dpc*. The primers used to clone sheep *TOPAZ1* cDNA are listed in **Table S2**. We found that the full length *TOPAZ1* cDNA sequence contained 20 exons with an open reading frame sequence of 4803 bp. The number of nucleotides for each exon is shown in **Figure 1**. The putative TOPAZ1 protein contained 1600 amino acids.



**Figure 1. Structure of the sheep *TOPAZ1* gene.** Sheep *TOPAZ1* cDNA derived from exons 1–20 and contained 4952 nucleotides. *TOPAZ1* was composed of twenty exons in sheep, bovine, human and mouse. The PAZ domain is located in the second exon and the CCCH domain in exon 8. The nucleotide number of each exon of sheep *TOPAZ1* is indicated under the Figure. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g001

By searching for sequences with similarities to sheep *TOPAZ1* gene within public databases, we found the human *TOPAZ1* gene (Official Symbol in GeneBank C3orf77; GeneBank Accession number NM\_001145030, Ensembl ENSG00000173769; UniGene Hs.132125; human hypothetical protein LOC375337). Full length human *TOPAZ1* cDNA (ORF: 5079 bp) was also made up of 20 exons, as in sheep. Moreover, similarity analysis highlighted the mouse *Topaz1* gene (Official Symbol in GeneBank Gm9524; GeneBank Accession number XM\_001474362, UniGene Mm.461223; mouse hypothetical protein LOC100032115) but this predicted gene was much shorter (ORF: 1851 bp) when compared to sheep and human *TOPAZ1*. In order to verify the exact size of the mouse *Topaz1* cDNA, we designed oligonucleotide primers (**Table S3**) and ran successive RT-PCR using mouse adult testis mRNA. We were thus able to deduce the size of the mouse *Topaz1* cDNA ORF as being 4962 bp, which was much longer than the predicted sequence available in public databases (GeneBank Accession number XM\_001474362: 1919 bp, ORF: 1851 bp).

In these three species of mammals, all exons had almost the same nucleotide size, except for exon 1 (see **Figure S2**). Indeed, in its 3' part, the human *TOPAZ1* exon 1 contained 141 bp more than the sheep and mouse genes. Moreover, using RT-PCR and sequencing we showed that the location of the predicted start codon (ATG) differed between sheep and mouse. In the latter species, the beginning of the ORF is at the same position as the human protein start codon (UniProtKB: Q8N9V7).

According to the Vista Genome browser (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>), the nucleotide similarity between the ORF of the *TOPAZ1* mRNA of sheep and of different mammalian species (cattle: BK008402, human: NM\_001145030 and mouse: HM631980) was high, ranging from 79% between sheep and mice and 82% between sheep and human to 97% between sheep and cattle (**Figure 2A**) and the highest degree of similarity across species existed from 3.25 to 5.0 Kb on the *TOPAZ1* cDNA sequences. *TOPAZ1* localized to human chromosome HS 3p21.33, its mouse orthologue to chromosome 9, and the cattle gene to chromosome 22.

We have submitted these sheep and mouse *TOPAZ1/Topaz1* sequences to the GenBank databases and the accession numbers are: HM631979 (*Ovis aries*) and HM631980 (*Mus musculus*). We also submitted the predicted cattle *TOPAZ1* cDNA (*Bos taurus*) to Genbank: nucleotide sequence data reported are available in the Third Party Annotation Section of the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession number TPA: BK008402.

## TOPAZ1 protein contains conserved PAZ and zinc finger domains

**PAZ domain.** TOPAZ1 protein belongs to a functionally uncharacterized protein family (mouse hypothetical protein LOC671232; human hypothetical protein LOC375337) containing an evolutionarily conserved domain named PAZ for Piwi/Argonaut/Zwille (PF02170, Accession IPR003100) located in exon 2 (**Figure 1**) of all aligned sequences (amino acids 688 to 745 in human; 593 to 650 in ovine; 646 to 703 in bovine; 651 to 708 in mouse). This domain was found in two families of proteins that are involved in post-transcriptional gene silencing, namely the Piwi and Dicer families. The conservation of the PAZ domain in different species was high (between 71% and 96%) and is shown in **Figure 2 (Ba)**.

**Other domains.** In addition, TOPAZ1 protein contains a conformation typical zinc-finger domain (amino acids 1097 to 1116 in humans; 1005 to 1024 in sheep (**Figure 1**); 1058 to 1077 in cattle and 1056 to 1075 in mouse) of C-x8-C-x5-C-x3-H type

(PF00642, Accession IPR000571), but which is C-x9-C-x4/5-C-x3-H in the TOPAZ1 proteins of several species (**Figure 2 (Bb)**).

## TOPAZ1 protein is phylogenetically conserved in Vertebrates

To determine whether the TOPAZ1 protein has been conserved during evolution, a phylogenetic analysis was performed on a 620 amino-acid alignment extending from the CCCH zinc finger to the C-terminal end using the neighbor-joining method [57], (1,000 bootstrap replicates). We showed that TOPAZ1 proteins were phylogenetically very close between sheep and cattle, and neighbors with horse and dog orthologs (**Figure 3**). Moreover, these 620 TOPAZ1 amino acids were aligned within several classes of vertebrates such as fish, amphibians and birds, and displayed a high degree of conservation within the Vertebrate Subphylum. Thus TOPAZ1 proteins are highly conserved across Vertebrate phylogeny.

## TOPAZ1 is specifically expressed in gonads

The tissue specificity of both sheep and mouse *TOPAZ1/Topaz1* transcripts was tested by semi-quantitative RT-PCR analyses on different adult somatic tissues and gonads (adult and fetal ovaries in sheep). The primers used are listed in **Table S4**. *GAPDH* in sheep and *beta-actin (Actb)* in mouse served as positive controls and were detected in all tissues (**Figure 4**). Among the different tissues tested, mouse *Topaz1* cDNA was exclusively expressed in adult testis (**Figure 4A**) and sheep *TOPAZ1* cDNA was detected in both adult testis and fetal ovary (**Figure 4B**). None of the somatic tissues tested displayed amplified bands corresponding to *TOPAZ1* cDNA in both mouse and sheep species.

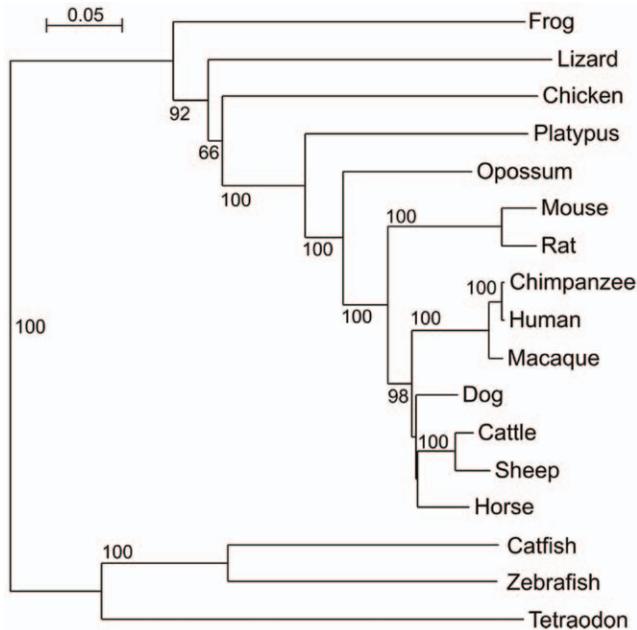
## TOPAZ1 displays a time-regulated expression profile during gonad development

In order to study the time course of *TOPAZ1* mRNA expression, quantitative RT-PCR was performed (primers listed in **Table S5**) on female and male gonad tissues at different stages of development (fetal, post-natal and adult). The relative expression of sheep female *TOPAZ1* mRNA, normalized to *HPRT1* mRNA expression (**Figure 5A**), increased during the meiosis prophase I period (55–65 *dpc*), decreased until the end of the fetal life and then remained very low in adult ovary. Throughout the fetal period of testicular development, the relative expression of *TOPAZ1* mRNA was low. By contrast, *TOPAZ1* expression was only high in the adult testis of sheep.

According to the expression profile of ovine *TOPAZ1* (**Figure 5A**) i.e. its increase during the 55–75 *dpc* period in fetal ovary and in adult testis, we compared its expression with that of *DMC1*, a gene essential for meiotic homologous recombination during the development of male and female gonads in sheep using quantitative RT-PCR (**Figure 5B**). In females, *DMC1* transcripts were detected as from 55 *dpc*, peaked between 60–65 *dpc* and then decreased after 75 *dpc*. This profile was very similar to that of *TOPAZ1*. In males, the expression of both *DMC1* and *TOPAZ1* was strongly observed at the adult stage.

In the mouse (**Figure 6**), the relative expression profile of *Topaz1* mRNA differed from that seen in sheep. Indeed, in developing female and male gonads in fetal mice, the relative expression of *Topaz1* mRNA was approximately the same in both sexes, and further increased during development. In females, its relative expression was decreased after birth; it was even quite low at 5 days *post-partum* (*dpp*) and almost null in mouse adult ovaries. In males, *Topaz1* mRNA increased as from 5 *dpp* to become strongly expressed in the adult mouse testis.





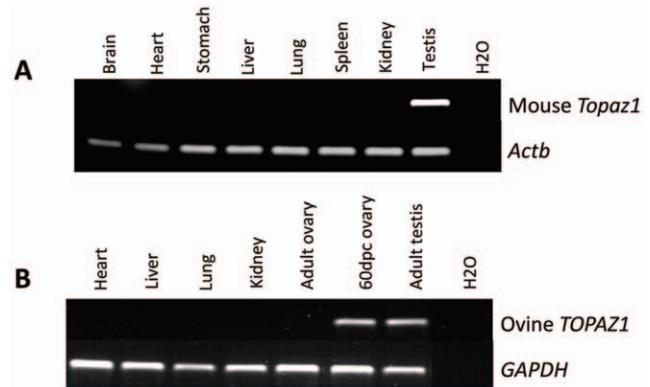
**Figure 3. Molecular phylogeny of TOPAZ1.** Phylogenetic analysis was performed on a 620 amino-acid alignment extending from the CCCH zinc finger domain to the C-terminal end using the neighbor-joining method [57]; (1,000 bootstrap replicates). The tree was not rooted. Accession numbers: *Homo sapiens* (human) NP\_001138502; *Pan troglodytes* (chimpanzee) XP\_526186; *Macaca mulatta* (rhesus monkey) XP\_001114967; *Mus musculus* (house mouse) EDL09106; *Rattus norvegicus* (rat) EDL76795; *Bos taurus* (cattle) NW\_001494083.2 (genomic); *Ovis aries* (sheep) HM631979; *Equus caballus* (horse) NW\_001867381.1 (genomic); *Canis familiaris* (dog) NW\_876276.1 (genomic); *Monodelphis domestica* (gray short-tailed opossum) XP\_001381211; *Ornithorhynchus anatinus* (duck-billed platypus) NW\_001794448.1 (genomic); *Gallus gallus* (chicken) NW\_001471633.1 (genomic); *Anolis carolinensis* (green anole, lizard) ENSEMBL scaffold\_98 (genomic); *Xenopus tropicalis* (frog) ENSEMBL scaffold\_320 (genomic); *Ictalurus punctatus* (catfish) ABD91555; *Danio rerio* (zebrafish) NW\_001877999.1 (genomic); *Tetraodon nigroviridis* (pufferfish) ENSEMBL Chr. 21.

doi:10.1371/journal.pone.0026950.g003

Thus *TOPAZ1/Topaz1* was a gonad-specific expressed gene in the sheep and mouse. However, its expression profile differed slightly between these two species. Contrary to the mouse, the sheep *TOPAZ1* transcript was preferentially expressed in females during fetal life when prophase I meiosis occurred (Figures 5A and 5B). Indeed, we had previously shown that the leptotene and zygotene stages were clearly identifiable in sheep ovogonia as from 55 dpc [51]. At this stage, the transcription of *DMC1*, *SPO11*, and *MSH4* was initiated. A strong signal was observed until 75 dpc, after which expression decreased more or less rapidly and was found to be present at a low level at 94 dpc. At birth, all oocytes were at the dictyate stage of meiosis [51]. The sheep *TOPAZ1* transcript presented a profile similar to that of meiotic genes.

### *Topaz1* is a germ cell-specific gene

In order to determine whether *Topaz1* expression in gonads is restricted to germ cells, we analyzed germ cell fractions from mouse testis and ovary. Enrichment in germ cells was ensured by the immunomagnetic isolation of SSEA1+ cells (SSEA1-enriched germ cells) from fetal gonads at 13 dpc. Stage-Specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1) is regulated developmentally during early embryogenesis and is widely used as a marker to monitor the



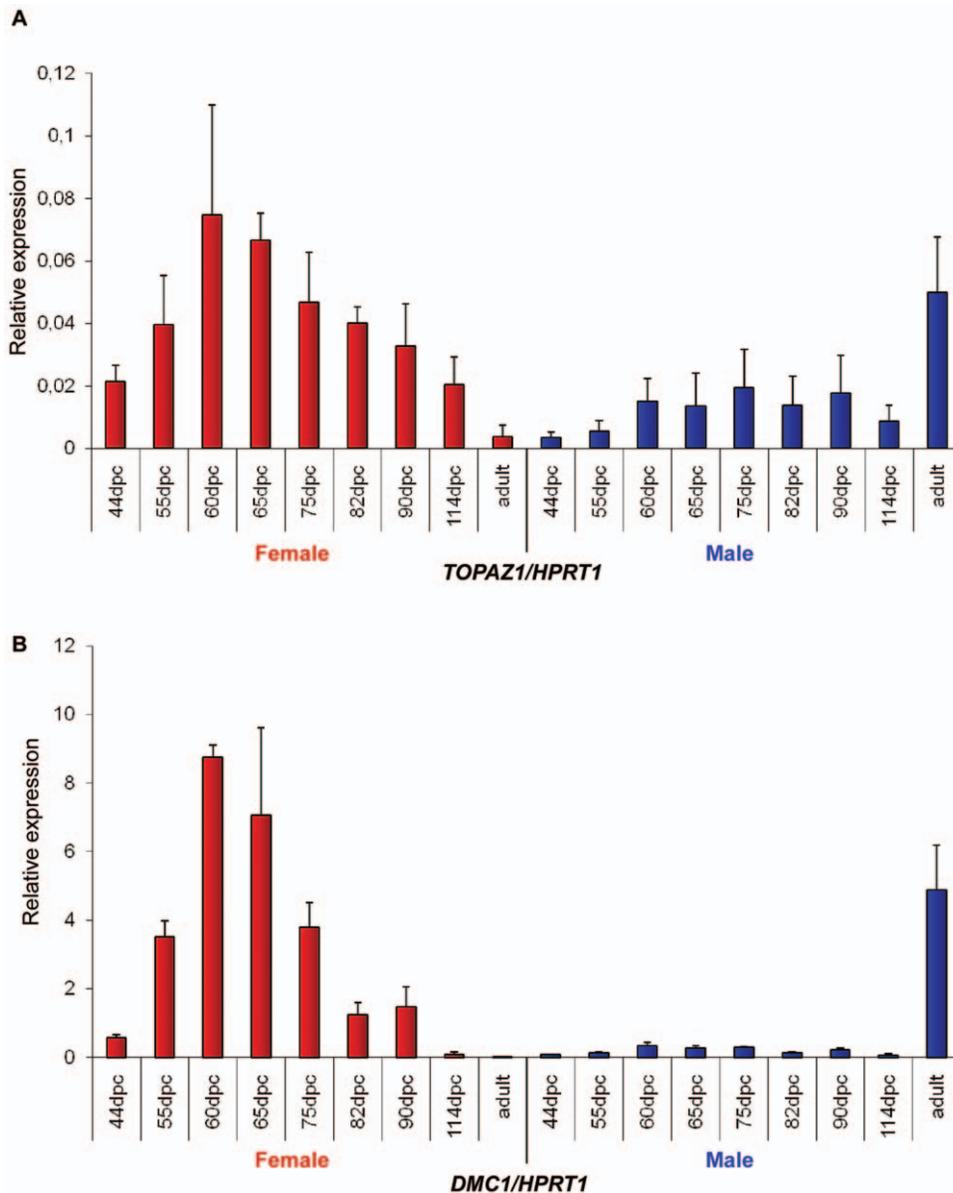
**Figure 4. Expression of TOPAZ1 mRNA in different sheep (A) and mouse (B) tissues.** (A) The expression of sheep *TOPAZ1* mRNA was tested using RT-PCR in four adult somatic tissues (heart, liver, lung and kidney) and in gonads (60 dpc ovary and adult testis). (B) The expression of the mouse *Topaz1* gene was tested in seven adult somatic tissues (brain, heart, stomach, liver, lung spleen and kidney) and in adult testis. *GAPDH* (glyceraldehyde-3P-dehydrogenase) and *Actb* amplification served as loading controls. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g004

differentiation of pluripotent EGCs, ESCs and embryonic carcinoma cells (ECs) [58]. To quantify *Topaz1* gene expression, we performed RT-qPCR on whole gonads versus SSEA1-enriched germ cells from male and female 13 dpc gonads (Figure 7). *Topaz1* transcripts were abundant in both male and female SSEA1-enriched cells but were rare in whole gonads, showing that the *Topaz1* gene was germ cell-specific in the mouse.

To consolidate our findings, we used homozygous fetuses with null mutation for the *c-kit* gene [59]. The absence of *Kit* prevents the migration and survival of PGC, so that gonads from these fetuses contain no germ cells. To produce these WlacZ/WlacZ embryos, we intercrossed WlacZ/+ mice (obtained from Transgenesis Institute of Orléans-Villejuif Resource Center, (<http://transgenose.cnrs-orleans.fr/eng/intragene/presentation.php>)). An analysis of *Topaz1* mRNA expression within a pool of gonads from WlacZ/WlacZ embryos (from 17.5 to 19.5 dpc) was compared with the expression of *Vasa* (or *Mhv*, germ cell marker) and *Wil* (Wilms tumor 1, somatic cell marker) (Figure 8). *Topaz1* transcripts (such as *Vasa*) were clearly absent from male and female germ cell-deprived gonads. On the other hand, *Wil*, a gene with somatic expression, was highly expressed in these gonads. These findings reinforced our previous data indicating that *Topaz1* is a germ cell-specific gene in the mouse.

### *Topaz1* expression is not RA-dependant in mouse fetal testis

In order to determine whether *TOPAZ1* could be regulated by the retinoic acid (RA) pathway, *in vitro* mouse fetal testis culture experiments were performed [18]. Indeed, whereas *in vivo* male meiosis only starts after birth, RA has been shown to induce meiosis *in vitro* in mouse fetal germ cells from both 11 and 12.5 dpc XY gonads [18]. In these *in vitro* cultures, about 20% of the germ cells displayed histological characteristics typical of the leptotene and zygotene stages. After such *in vitro* culture experiments on 11 dpc mouse testis, the expression of *Recβ* (a meiosis-specific phosphoprotein involved in recombination events), and of *Topaz1*, was quantified using real-time quantitative RT-PCR (Figure 9). We showed that a high level of RA ( $10^{-6}$  M) induced the onset of meiosis (as attested by the increase in *Recβ* expression) after three days of culture, when compared with the control culture (without



**Figure 5. Expression of *TOPAZ1* and *DMC1* mRNA in sheep gonads at different developmental stages.** Quantification of *TOPAZ1* (A) and *DMC1* (B) genes expression using quantitative real-time RT-PCR analysis at several fetal stages (44, 55, 60, 65, 75, 82, 90, 114 dpc) and in adult ovary (red histograms) and testis (blue histograms). The *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) gene was used as a reporter gene. Values indicated on the graph are means  $\pm$  SEM of two independent RT experiments at each stage. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g005

RA). By contrast, the expression of *Topaz1* was not modified by RA treatment and *Topaz1* expression in the mouse fetal testis did not require RA signaling.

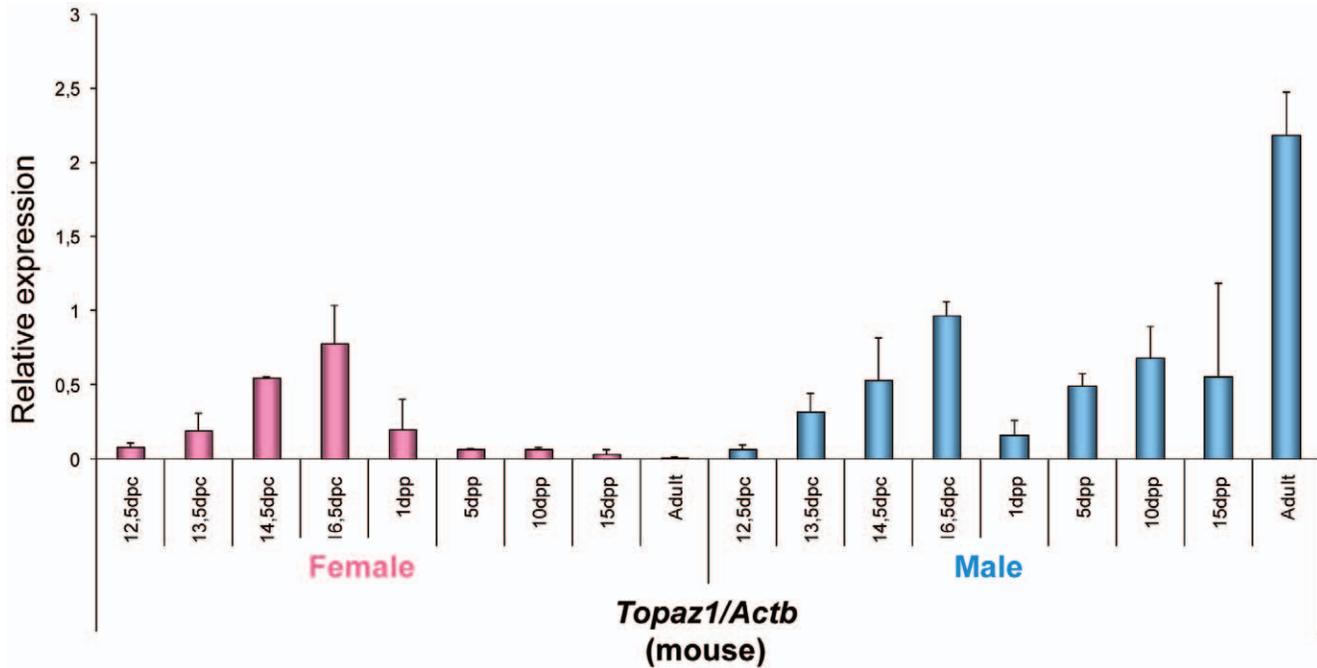
#### Production of a specific TOPAZ1 antibody

To determine the cell type and sub-cellular localization of TOPAZ1 protein, we produced a polyclonal antibody from two 15-mer peptides. The specificity of this antibody was tested by Western blot analysis on protein extracts from different sheep tissues (cytosolic fractions of adult testis, fetal ovary at 60 dpc and liver). This analysis showed that TOPAZ1 antibody bound specifically to adult testis and fetal ovary extracts, but not to liver extracts (Figure 10). The molecular weight of TOPAZ1 protein was approximately 199 kDa, slightly higher than the predicted

molecular weight of 180 kDa. This difference may have resulted from post-translational modifications. No similar signals were detected in nuclear extracts from sheep gonads (data not shown). The antibody against BETA-ACTIN (ACTB) detected a specific 42 kDa band in all the extracts tested, thus serving as a positive control. TOPAZ1 protein was exclusively expressed in the cytosolic compartment of gonad cells, and the protein level was higher in sheep adult testis than in the fetal ovary. These results were consistent with our RT-qPCR analysis (Figure 5A).

#### TOPAZ1 protein is present in germ cells of sheep fetal ovary

The TOPAZ1 antibody was used on sheep fetal ovary sections at 60 dpc (Figure 11A, G), the stage displaying the peak expression of



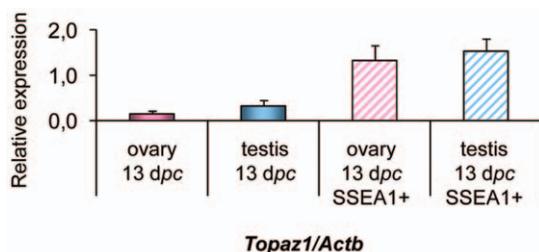
**Figure 6. Expression of *Topaz1* mRNA in mouse gonads at different developmental stages.** Quantification of *Topaz1* gene expression using quantitative real-time RT-PCR analysis at several fetal stages (12.5, 13.5, 14.5, 16.5 dpc), after birth (1, 5, 10, 15 dpp) and in adult ovary (pink histograms) and testis (light blue histograms). The *Actb* gene was used as a reporter gene. Values indicated on the graph are means  $\pm$  SEM of three independent RT experiments at each stage. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g006

*TOPAZ1* mRNA (Figure 5A). We also performed immunodetection of MVH (VASA) (a germ cell marker expressed in the cytoplasm of germ cells) on adjacent sections of 60 dpc ovary (Figure 11B, H). Immunofluorescence was mainly detected in the germ cells. When merged with DAPI, TOPAZ1 staining was clearly localized in the cytoplasm of the cells (Figure 11G). When comparing TOPAZ1 and MVH immunostaining, we concluded that TOPAZ1 was expressed in the cytoplasm of 60 dpc female germ cells in sheep. Pre-immun TOPAZ1 was also tested on sheep 60 dpc ovary sections and did not reveal any staining (Figure 11C).

#### TOPAZ1 protein is present in germ cells of mouse adult testis

The localization of TOPAZ1 in mouse adult testis was determined using immunofluorescence (Figure 12A, E). The

peptides used for immunization were designed according to the sheep sequence and were not fully homologous with the mouse *Topaz1* sequence. In order to enhance antibody specificity, purified anti-TOPAZ1 antibody was used on mouse sections. TOPAZ1 displayed clear staining in germ cells of from mouse adult testis (Figure 12A). The same degree of staining was achieved using MVH antibody (Figure 12B). Moreover, when merged with DAPI, the TOPAZ1 protein appeared to be clearly localized in the cytoplasm of these germ cells (Figure 12G). Our results thus confirmed the cytoplasm localization of TOPAZ1 in the germ cells of mouse adult testis, a finding in agreement with those obtained by the expression of *Topaz1* transcripts in the germ cell enriched fraction (Figure 7) and in germ cell-deprived gonads (Figure 8). *TOPAZ1/Topaz1* mRNA and TOPAZ1 protein were localized in the germinal cell lineage of sheep and mice of both sexes.

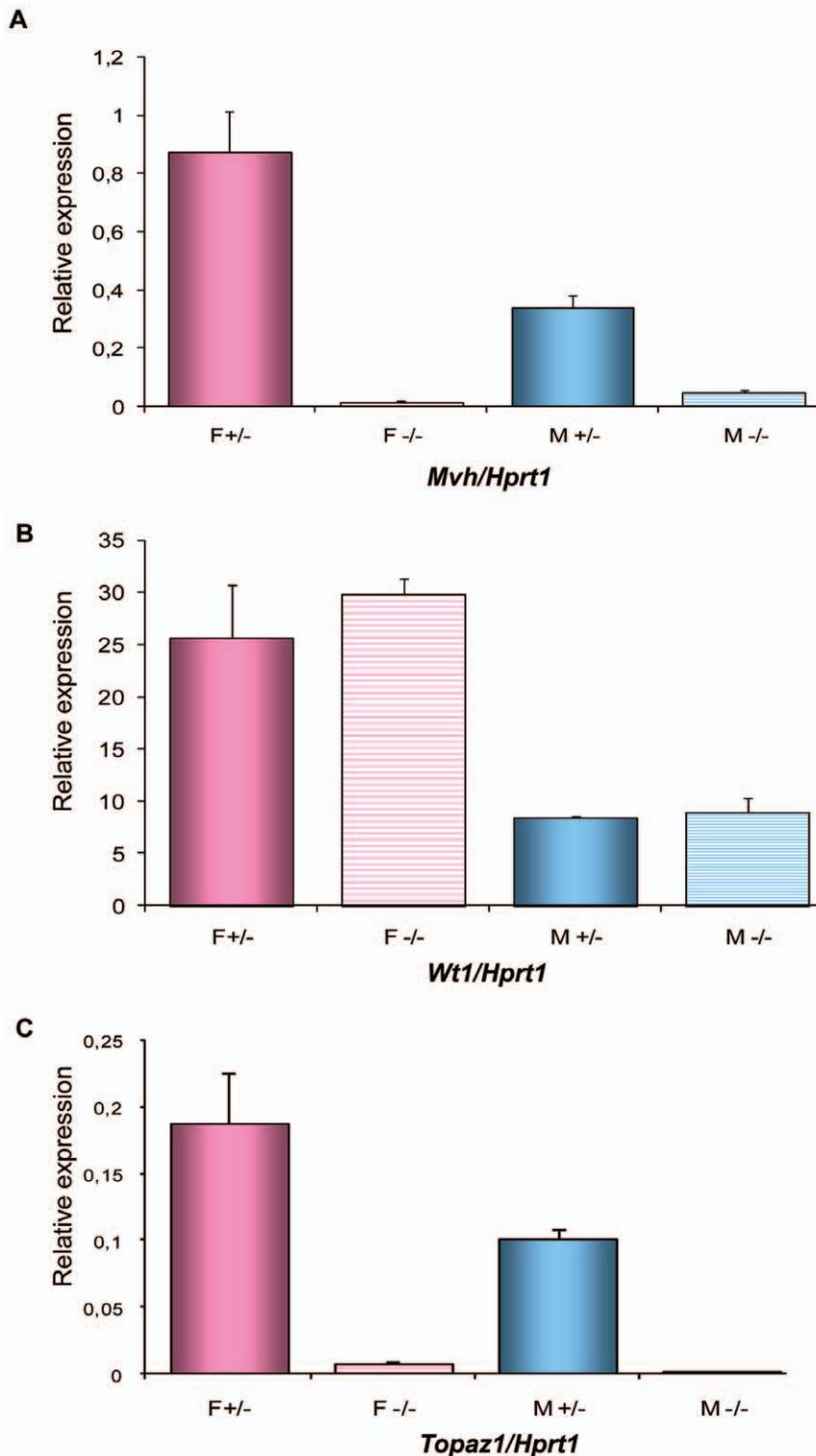


**Figure 7. Expression of the *Topaz1* transcript in mouse enriched germ cell fractions.** Germ cells were isolated from 13 dpc gonads by means of SSEA1+ immunomagnetic isolation. Quantification of *Topaz1* gene expression using quantitative real-time RT-PCR analysis in whole ovaries (pink histogram) and testes (light blue histogram) and in germ cell fractions (hatched histograms). Values indicated on the graph are means  $\pm$  SEM of three independent samples. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g007

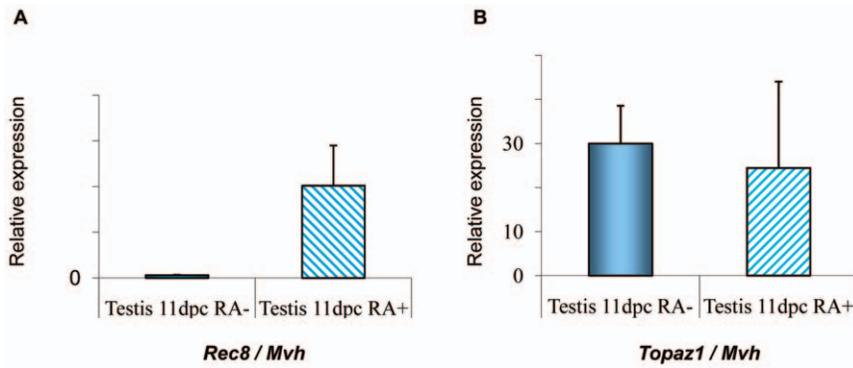
#### Discussion

During this study, we isolated and characterized a new gene encoding for a putative protein containing a PAZ domain. Until now, the evolutionarily conserved PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domain had been found in two families of proteins that are involved in post-transcriptional gene silencing [60], the PIWI and DICER families. The three-dimensional structure of this domain has been solved [61–63] and studies have revealed a unique mode of single-stranded nucleic acid binding in which the two 3-terminal nucleotides are buried in a hydrophobic cleft. It has been proposed that the PAZ domain contributes to the specific recognition of siRNAs [64].

In addition, TOPAZ1 contained a zinc-binding domain of the Cys-X<sub>9</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-His type (termed the CCCH domain). Berg *et al.* defined that the CCCH family is a group of zinc-finger proteins consisting of a canonical C-X<sub>6-14</sub>-C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H motif [65] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599083>. After ana-



**Figure 8. Expression of *Topaz1*, *Mvh* and *Wt1* transcripts in mouse *WlacZ*<sup>+/+</sup> or *WlacZ*/*WlacZ* gonads.** (A) Expression of *Mvh*, a gene only expressed in germ cells, was used to verify the absence of germ cells from *WlacZ*/*WlacZ* gonads (F<sup>-/-</sup> and M<sup>-/-</sup>, hatched histograms) in contrast to *WlacZ*<sup>+/+</sup> gonads (F<sup>+/+</sup> and M<sup>+/+</sup>, plain histograms). (B) Expression of the *Wt1* gene in somatic cells was used to verify the integrity of somatic cells. (C) The expression of *Topaz1* was determined by qRT-PCR analysis in *WlacZ*<sup>+/+</sup> or *WlacZ*/*WlacZ* ovary and testis. The *Hprt1* gene was used as a reporter gene. Values indicated on the graph are means  $\pm$  SEM of two independent samples. doi:10.1371/journal.pone.0026950.g008



**Figure 9. Effect of retinoic acid (RA) on *Topaz1* expression in mouse fetal testis.** Mouse testes at 11 dpc were cultured for 3 days with (RA+, hatched histograms) or without (RA-, plain histograms) retinoic acid ( $10^{-6}$  M). At the end of the culture period, total RNA was extracted and *Rec8* (A) and *Topaz1* (B) mRNA expressions were measured by real-time quantitative RT-PCR. Values indicated on the graph are means  $\pm$  SEM of three independent samples.

doi:10.1371/journal.pone.0026950.g009

lyzing the entire CCCH family in Arabidopsis and rice, Wang *et al.* re-determined that CCCH proteins are characterized by one to six C-X<sub>4-15</sub>-C-X<sub>4-6</sub>-C-X<sub>3</sub>-H motifs which constitute glycine-rich and phenylalanine-rich sequences [66]. CCCH-type zinc-finger proteins are RNA binding proteins with regulatory functions at all stages of mRNA metabolism, including pre-mRNA splicing, mRNA transportation, sub-cellular localization and stability/degradation, transcription, ubiquitination, and poly ADP-ribosylation [67,68]. It has been shown that different CCCH-type ZnF proteins interact with the 3'-untranslated region of various mRNA [69], and that a single CCCH domain is capable of binding single-stranded RNA with considerable affinity and selectivity [70]. The presence of these two domains in the TOPAZ1 protein thus strongly suggested a role for this factor in RNA recognition and binding.

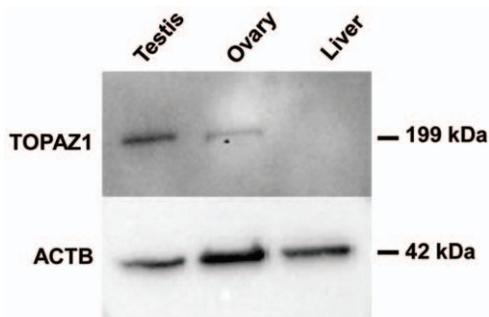
Phylogenetic analysis has revealed a fish-specific TOPAZ1 clade within vertebrates. Among mammals, eutherians are separated into two groups, rodents and others. This divergence could explain the difference in expression patterns that we observed between mice and sheep during gonad development. The strong conservation of the ZnF\_CCCH domain in fish and amphibians suggests that the TOPAZ1 molecules of lower vertebrates possess the structural features required for RNA binding. Whilst the C-terminal from the ZnF\_CCCH domain is well conserved among

all *Topaz1* molecules, the N-terminal before the ZnF\_CCCH domain is more divergent between fish, amphibians, monotremes and eutherian mammals (data not shown).

During the current study, we showed that the *TOPAZ1/Topaz1* gene was specifically expressed in the gonads of sheep and mice, in a sex-specific manner. Its expression was stronger in females than in males during fetal gonad development. However, this pattern was reversed after birth, with strong expression in adult males only and the disappearance of *Topaz1* expression from the adult ovary. This time course was suggestive of a relationship between *Topaz1* expression and the occurrence of germ cell meiosis. To reinforce this hypothesis, we analyzed the expression profile of *DMC1* in the same samples and compared its expression pattern in sheep. *DMC1* is a meiosis-specific *RecA/Rad51* homolog required for the recombinational repair of meiotic Double Strand Breaks (DSBs). The *DMC1* protein was detected in mouse leptotene-to-zygotene spermatocytes at the initiation of homolog pairing [71]. In *Saccharomyces cerevisiae* and mice of both sexes, *DMC1*-deficient mutants arrest in the late zygoneme/early pachyneme of meiotic prophase I, with an accumulation of DSBs and defective formation of the synaptonemal complex [72,73]. The comparison of sheep *TOPAZ1* and *DMC1* expression patterns revealed a very similar profile. Furthermore, we demonstrated that *Topaz1* was germ line-specific using two different approaches; the enrichment of mouse germ cells by SSEA1 antibody and the use of gonads from *WlacZ/WlacZ* mutant mice devoid of germ cells. Moreover, we showed that *TOPAZ1/Topaz1* mRNA encoded a protein present in germ cells from both male and female gonads. Taken together, these results reinforce the idea that *TOPAZ1/Topaz1* could be involved in germ cell development.

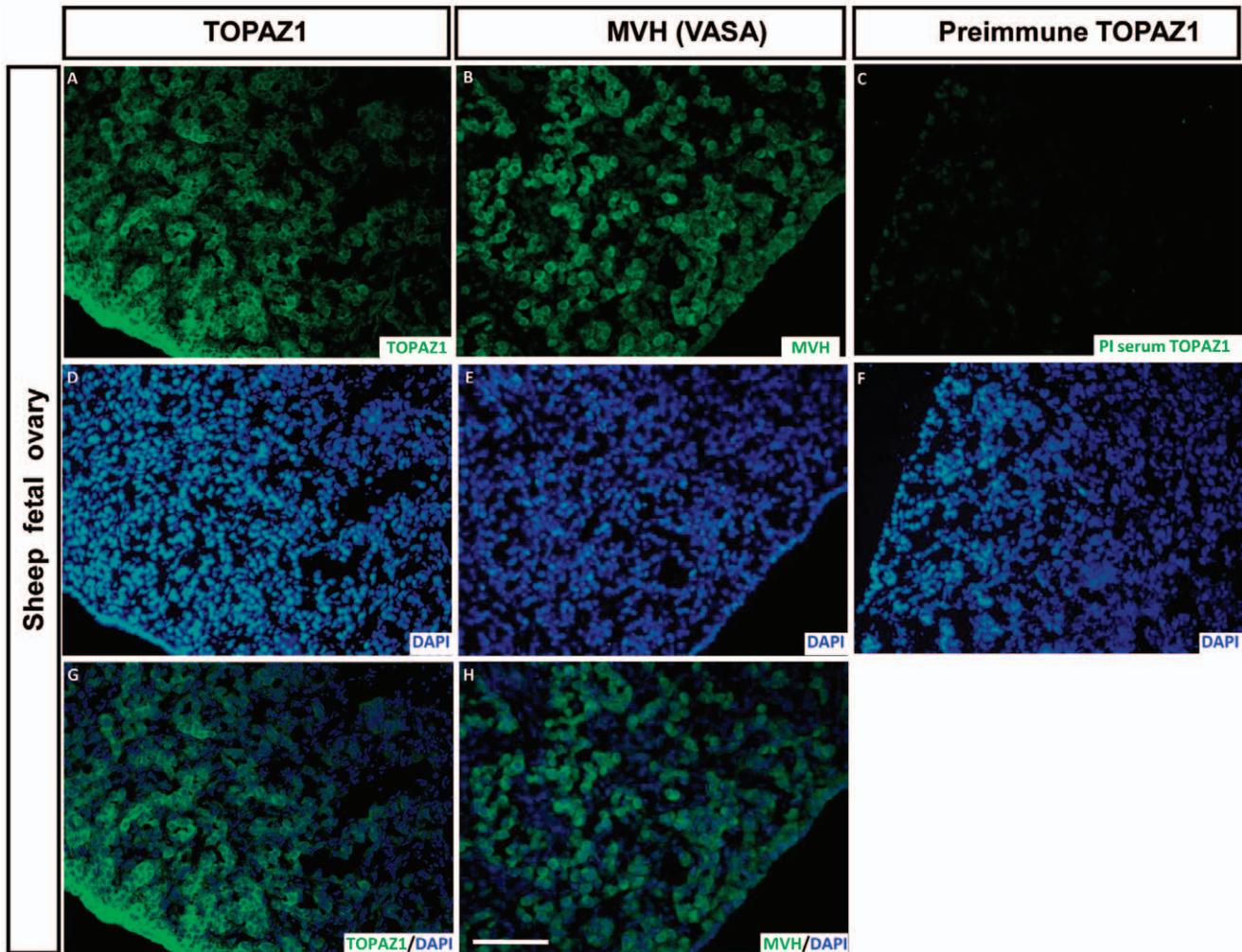
Our study also showed that *Topaz1* expression was not stimulated by retinoic acid in cultured male fetal gonads from mice. This could have been due either to the incomplete meiosis prophase I obtained during our organ culture experiments [18] or to the need for non-retinoid pathways in order to regulate *Topaz1* expression [28].

In addition to the recombination events and chromatin exchange that occur during meiosis prophase I, it is of paramount importance for germ cell genomes to be protected from the uncontrolled propagation of mobile genetic elements. These mobile elements must be distinguished from endogenous genes and then selectively silenced. In *Drosophila*, germ cells express a class of small RNAs (piRNAs) that are specialized in the repression of mobile elements [74–76]. Germ cells in mice express two types



**Figure 10. Specificity of anti-TOPAZ1 antibody by Western blot.** Western-blotting experiments were performed with cytosolic extracts from sheep adult testis, fetal ovary and liver. Anti-TOPAZ1 antibody recognized a 199 kDa protein in sheep adult testis and 60 dpc ovary, but no band was detected in sheep liver. As a positive control, ACTB expression was detected in each sample.

doi:10.1371/journal.pone.0026950.g010

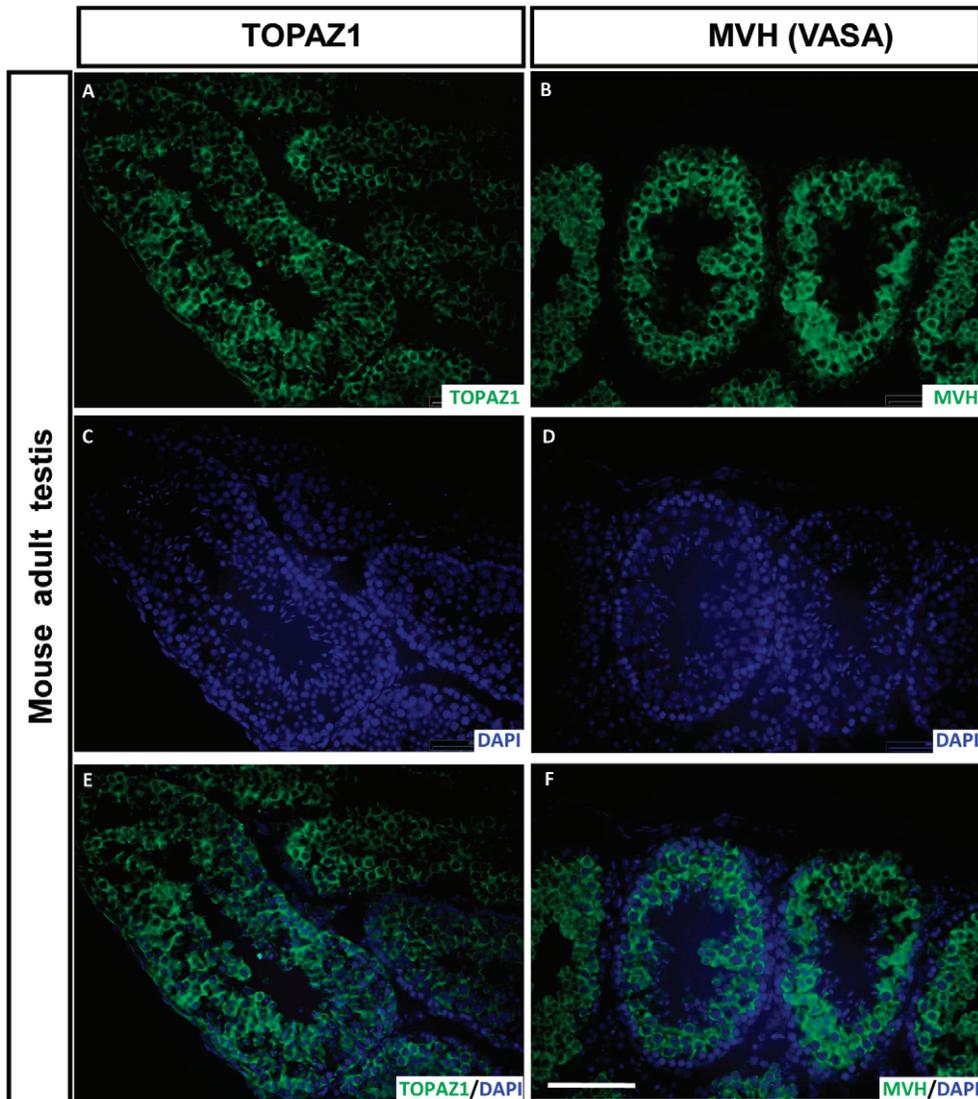


**Figure 11. Immunodetection of TOPAZ1 protein in sheep fetal ovary.** Immunofluorescence was performed on transversal sections of sheep 60 dpc ovaries to detect TOPAZ1 (A) and MVH (B) proteins. Pre-immune serum (PI) was also tested (C). For each section, DAPI was performed to detect nuclei (D-E-F). TOPAZ1 showed similar cellular localization as MVH (A, B). The immunolabeling of TOPAZ1 and MVH was merged with DAPI (G, H). TOPAZ1 can be detected in the cytoplasm of germ cells in ovine fetal ovary. PI serum of TOPAZ1 did not reveal any staining (C). Scale bars = 200  $\mu$ m in H (applies to A–G). doi:10.1371/journal.pone.0026950.g011

of piRNAs: (i) a small fraction of piRNAs derived from the repetitive genomic regions expressed during mouse embryogenesis, and (ii) a larger fraction of piRNAs derived from non-repetitive regions that start to be expressed during the pachytene stage of meiosis (pachytene piRNAs). [46,47,77]. Pachytene piRNAs interact with MIWI (mouse PIWI) and MILI (MIWI-like), two of the three mouse PIWI proteins [47]. In mice, the PIWI clade contains three members: *Miwi2*, *Mili*, and *Miwi*, all of which display distinctive developmental expression patterns [78–81]. In the male germline, a deficiency in one of two Piwi family members, *Mili* or *Miwi2*, results in the loss of DNA methylation marks on transposons, and mutant animals display a phenotype similar to that of *Dnmt3L*-deficient mice [81–84]. These data have led to the hypothesis that Piwi/piRNA complexes might serve as sequence-specific guides that direct the *de novo* DNA methylation machinery to transposable elements [81,82,85]. The fact that *Topaz1* possesses two RNA interaction domains and an expression profile related to meiosis prophase I supports the hypothesis that *Topaz1* might be involved in the piRNA pathway. It is noteworthy

that *MOV10L1*, a transcript previously isolated in our sheep fetal ovary libraries [50] has recently been confirmed as an essential component in the Piwi-interacting RNA pathway in the mouse [53,54]. On the other hand and by comparison with MVH immunostaining, we showed that TOPAZ1 displayed a similar cellular localization. Consequently, *TOPAZ1* could be expressed in primordial germ cells and in germ cells undergoing gametogenic processes until the post-meiotic stages in both males and females. In adult testis, MVH and TOPAZ1 proteins were located in the cytoplasm of spermatogenic cells. It has recently been shown that MVH plays a crucial role in piRNA processing and in the gene silencing of retrotransposons [86]. The similarity of the expression profiles and cell localization of both genes, in addition to the presence of PAZ and RNA-binding domains in Topaz protein, reinforce the possible role of TOPAZ1 in the regulation of retrotransposons in the germ line.

Further studies are necessary to investigate the functional role of TOPAZ1 in mammalian gametogenesis, and for this purpose we are currently generating a *Topaz1* knockout mouse.



**Figure 12. Immunodetection of TOPAZ1 protein in mouse adult testis.** Immunofluorescence was performed on sections of mouse adult testis to detect TOPAZ1 (A) and MVH (B) proteins. Anti-TOPAZ1 antibody raised against sheep protein was used to detect mouse Topaz1. For each section, DAPI was performed to detect nuclei (C–D). Mouse TOPAZ1 displayed a localization similar to that of MVH (A, B). The immunostaining of TOPAZ1 and MVH was merged with DAPI (E, F). TOPAZ1 can be detected in the cytoplasm of germ cell in mouse testis. Scale bars = 200  $\mu$ m in H (applies to A–F).

doi:10.1371/journal.pone.0026950.g012

In conclusion, *TOPAZ1* is a new evolutionarily conserved gene, specifically expressed in gonads and probably involved in gametogenesis. The presence of a PAZ domain in Topaz1 suggests that it could be involved in the RNA silencing pathway. It constitutes a potential new actor in piRNA-directed retrotransposon silencing in germ cells that contributes to a safeguard mechanism for genetic information.

## Materials and Methods

### Animal and tissue samples

Pregnant Pr -Alpes female sheep were obtained as previously described [50,51]. Sheep fetuses were collected at 44, 55, 60, 65, 75, 82, 90 and 114 days *post coitum* (*dpc*). The gonads of adult animals were collected at slaughter, cut into small pieces, flash frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Other organs from sheep fetuses, such as the liver, kidney, lung and heart, were

treated similarly. C57/Bl6, 129/Sv and NMRI mouse fetuses and adult organs were also collected, frozen immediately and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Experiments were performed in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research involving animals, as promulgated by the Society for the Study of Reproduction and with the European Convention on Animal Experimentation. All researchers working directly with the animals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services, and the permit number for our studies is C91332101. The study also involved the use of 129/Sv mice carrying the *KitW/LacZ* allele. The *kitt* gene was inactivated and the first exon of *Kiit* was replaced by an nlsLacZ-neo cassette. Full details on this construction can be found in the paper by Bernex and colleagues [59]. Ovaries and testes from heterozygous (*WlacZ/+*) and homozygous (*WlacZ/WlacZ*) mice were collected at between 17.5 *dpc* and 20.5 *dpc*.

### RNA extraction, reverse transcription (RT), semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR

Total sheep RNAs were extracted from each sample using Trizol® reagent (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) plus the RNeasy Mini kit (QIAGEN SA, Courtabouef, France), following the manufacturer's instructions. In sheep, we used six ovaries and four testes at 45 dpc, four gonads at 55 dpc, two gonads at 60-65-75-82 dpc, one gonad at 90–114 dpc and a sample of adult gonads. RT was performed on each sample using 5 µg Dnase-treated RNA incubated with random hexanucleotide primers with Superscript II (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions.

Briefly, semi-quantitative RT-PCR was performed on 1 µL (corresponding to 25 ng reverse-transcribed total RNA) of each RT, which was amplified using 0.5 U Taq polymerase (TaKaRa, Lonza, Verviers, Belgium). The primer sequences and PCR conditions used are shown in **Table S4**. In sheep, the *GAPDH* gene was used as a control. The PCR conditions were presented in **Table S4**.

Real-time PCR analysis of *TOPAZ1* was performed using the ABI Prism 7700 HT apparatus (Applied Biosystems). Briefly, PCR was performed with the Absolute blue QPCR SYBR Green ROX mix (Abgene, Les Ulis, France), using 50 ng of cDNA from the RT. The primers used for real-time PCR are presented in **Table S5**. We have performed all control experiments to ensure that our primers could not amplify any genomic products. All expression data were normalized using the *HPRT1* expression level for sheep samples. Real-time PCR on sheep involved two different RT experiments for each stage and the SEM was calculated from these two independent samples. Real-time PCR in the mouse was performed on three different RT samples for each stage.

In the mouse, total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) in C57/Bl6 and NMRI mice or the RNeasy Micro kit (Qiagen) in 129/Sv WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mice, depending on the size of the gonads. Ovaries from WlacZ/+ or WlacZ/WlacZ mice at between 17.5 dpc and 20.5 dpc were pooled in two separate tubes (14 and 18 ovaries, respectively). The same procedure was used for WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ testes (4 and 6 testes for each condition). Reverse transcription was carried out with the Omniscript kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The expression of *Topaz1* or *Rec8* genes was assessed by real-time PCR using the SYBR Green Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were carried out and fluorescence was detected on an ABI Prism 7000 apparatus. In the mouse, the amount of each cDNA detected was normalized using *Actb*, *Hprt1* or *Msh*. All primers are presented in **Table S5**.

### 5'RACE-PCR in sheep

The full-length cDNA of sheep *TOPAZ1* was determined using the 5' RACE System (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Total RNA was extracted from 60 dpc female fetal gonads. One microgram of total RNA was reverse-transcribed into first-strand cDNA using a specific oligo for *TOPAZ1* (*TOPAZ1\_RT*, **Table S1**) and Superscript II (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). First-strand cDNA was treated with RNase H (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and purified on a S.N.A.P column (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). TdT tailing was performed on cDNA using dCTP and terminal transferase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Thirty two PCR cycles were performed using the AAP anchor primer (a non-specific primer) and *TOPAZ1* specific primer 1, with or without 5% formamide. A second PCR were performed on 5 µL of the PCR1 samples diluted at 1/100, with two different *TOPAZ1*-specific primers (*Topaz1-2* or *Topaz1-3* nested probe, **Table S1**) and AUAP (a non-specific primer). Both PCR

procedures were performed according to the following protocol: 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1.5 min for 32 cycles, followed by an extension for 10 min at 72°C. All RACE-derived PCR products were subcloned into the pGEMTeasy vector and the clones were then sequenced.

Primers for *TOPAZ1* cDNA in sheep and mouse were designed to verify the size of the full-length cDNA sequences on adult testis. They are listed in **Tables S2 and S3**. The PCR conditions were 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1.5 min for 35 cycles, followed by an extension for 10 min at 72°C.

### NMRI Mouse Testis cultures with retinoic acid (RA)

Pregnant female mice were killed by cervical dislocation at 11 dpc and their fetuses removed from the uterine horns. Gonads and their mesonephros were isolated from the fetuses under a binocular microscope and kept in Ham F12/DMEM (1:1) (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) until explantation. The sex of the fetus was determined by PCR amplification of *Sry*, as previously described [87]. The gonads were cultured on Millicell-CM Biopore filters (Millipore, Billerica, MA, USA) in 0.3 ml of Ham F12/DMEM (1:1) for 3 days under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. The medium was changed every 48 h. One gonad from each fetus was cultured in a medium containing all-trans-RA (10<sup>-6</sup> M, Sigma, St Louis, MO), and the other was cultured in a control medium.

### Purification of NMRI mouse germ cells

About 50 gonads from 13.5 dpc fetuses were digested first in 0.25% trypsin-0.02% EDTA (Trypsin/EDTA solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C. The samples were then centrifuged and digested with 2 mg/ml collagenase and 0.02 mg/ml DNase I in HBSS. For the purification of SSEA1-positive cells, dispersed cells were incubated with anti-SSEA1 (1/5, anti-SSEA1 monoclonal antibody, DSHB, Iowa) in PBS, 0.5% BSA (PB) for 20 min at 4°C. The cells were then centrifuged and washed once with 1 ml PB, before being incubated with 20 µL microbead-linked donkey anti-mouse IgM antibody (Miltenyi Biotec, Germany) in 300 µL PB with 2 mM EDTA (PBE) for 15 min at RT. The column was rinsed three times with 500 µL PBE to wash out unbound cells, which represented the SSEA1-cell fraction. After removal from the magnet, the column was flushed with 1 ml PB, which allowed collection of the SSEA1+ cell fraction. The cells were pelleted, RLT buffer was added and total RNA was extracted as previously described.

### Phylogenetic analysis

*TOPAZ1* sequences were retrieved by BLAST analysis from the databases accessible via the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) servers. Sequence analysis was performed using the GCG Wisconsin package (Version 11.1, Accelrys Inc., San Diego, CA). Gene structure and protein sequences were predicted from genomic sequences using FGESH [88]; (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgesh&group=programs&subgroup=gfind>). Multiple sequence alignments were generated using ClustalX [89]. Phylogenetic analysis was performed on a 620 amino-acid alignment extending from the CCCH zinc finger to the C-terminal end using the neighbor-joining method [57]; (1,000 bootstrap replicates; Kimura two-parameter correction) as implemented under Seaview (Version 4.0) [90].

### Proteins Extraction

Frozen tissues (sheep 60 dpc liver and ovaries and adult testis) were pounded into liquid nitrogen. The tissue powder was then

mixed with 1 ml lysis buffer in a Dounce, and 0.2% NP40 was added. Samples were centrifuged at 13,000 rpm for 1 hr at 4°C, and the supernatant corresponding to the cytosolic extract was removed. The nucleus pellet was resuspended in 100 ml nuclear protein extraction buffer (20 mM Hepes pH 7.7, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 25% glycerol, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM ammonium molybdate, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM benzamidine, 0.5 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)) to which 10 ml of 4 M NaCl was added. After 1 hr of gentle mixing at 4°C, the samples were centrifuged for 30 min at 13,000 rpm, and the supernatant corresponding to nuclear extracts was collected. The Bradford method was used for protein quantification and samples were conserved at -80°C.

### Generation of an anti-TOPAZ1 antibody

Anti-TOPAZ1 antibody was generated by Eurogentec Company. Two peptides of 15 amino acids were used to immunize a rabbit: TEKRKEINAKSSERE (sheep amino acids 601–615) and SLSGAEVQRSTKEN (sheep amino acids 625–639), chosen for their potential high antigenicity. Their homologies with mouse Topaz1 counterparts were 60% and 66%, respectively. The antibody was affinity purified with both peptides by Eurogentec Company. The non-purified antibody was used in sheep and the purified antibody was used in mouse.

### Western Blotting

For Western-blot analyses, (11 mg) proteins were separated in NuPAGE 4–12% Bis-Tris polyacrylamide gels according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). The blots were incubated with primary antibodies (rabbit polyclonal anti-TOPAZ1 antibody 1:300, or rabbit monoclonal anti-ACTB, 1:500, Sigma) overnight at 4°C and were then incubated for 1 h with the corresponding peroxidase-conjugated antibody (anti-rabbit immunoglobulin, 1:5000, Biosystem). Immunoreactive bands were detected by Immobilon™ western Chemiluminescent HRPSubstrate (Millipore).

### Immunofluorescence

Freshly dissected gonads were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate saline buffer (PBS) at 4°C overnight. After washing in PBS with increasing concentrations of sucrose (0, 12%, 15%, and 18%), the tissue specimens were embedded in Jung Tissue Freezing Medium (Leica Instruments) and frozen at 80°C. Cryosections (5 μm) were obtained and stored at -80°C. The sections were air-dried, treated with chloroform for 30 sec, and then rehydrated in PBS for 10 min. The TOPAZ1 antibody (1:1000) and VASA antibody (or MVH, 1:500, ab13840, Abcam) were diluted in 1% BSA/PBS and applied to tissue sections overnight at 4°C. After several washes, the sections were incubated with a secondary anti-rabbit IgG-FITC antibody against rabbit

(1:200, Vector) for 1 h at room temperature. The slides were then rinsed in PBS, mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector) and observed with a Leica DMRB epifluorescence microscope coupled to a DP50CCD camera (Olympus).

### Supporting Information

**Figure S1 Main genes involved in follicle formation and preservation of germ cell resting pool.** Several factors are involved in primordial (FIGLA, NOTCH2, SOHLH1 and 2, FOXL2), primary (NOBOX, LHX8, cKIT/KL) or secondary (GDF9, BMP15) follicle formation. Others support the resting pool of primordial follicles and avoid their differentiation (AMH, PTEN, FOXO3A). (PDF)

**Figure S2 TOPAZ1 exon 1 in human, sheep and mouse.** (PDF)

**Table S1 5' RACE primer sequences used in sheep.** (PDF)

**Table S2 Sequences of semi-quantitative RT-PCR primers used to sequence full-length TOPAZ1 cDNA in sheep.** (PDF)

**Table S3 Sequences of semi-quantitative RT-PCR primers used to sequence and/or verify the size of mouse Topaz1 cDNA.** (PDF)

**Table S4 Primer sequences and conditions used for RT-PCR analyses.** (PDF)

**Table S5 Sequences of qPCR primers.** Oligonucleotides for qPCR were designed using the PrimerExpress Designer software (Perkin Elmer). (PDF)

### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr J.J. Panthier for providing the Wlacz mutant mice. We thank the staff at the UCEA animal facility for ensuring care of the sheep and IERP staff members responsible for our mouse facility. We also are indebted to Dr Maëlle Pannetier from our laboratory for providing training in immunohistological techniques for AB and AL.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CC BM-P. Performed the experiments: AB RLB AL EPailhoux GL BM-P. Analyzed the data: AB EPailhoux CC BM-P. Contributed reagents/materials/analysis tools: EPoumerol. Wrote the paper: AB CC BM-P. Phylogenetical analyses and the in silico characterization of non-mammalian Topaz genes: JNV. In silico analyses: AB DT.

### References

- McLaren A (2000) Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 163: 3–9.
- Capel B (2009) Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Somatic-Germ Cell Interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Pepling ME, de Cuevas M, Spradling AC (1999) Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol* 9: 257–262.
- Pepling ME (2006) From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44: 622–632.
- Wartenberg H, Hilscher B, Hilscher W (1998) Germ cell kinetics during early ovarian differentiation: an analysis of the oogonial cell cycle and the subsequent changes in oocyte development during the onset of meiosis in the rat. *Microsc Res Tech* 40: 377–397.
- Gondos B, Zamboni L (1969) Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil Steril* 20: 176–189.
- Gondos B, Bhiraicus P, Hobel CJ (1971) Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 110: 644–652.
- Pepling ME, Spradling AC (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 234: 339–351.
- Menke DB, Koubova J, Page DC (2003) Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 262: 303–312.
- Bullejos M, Koopman P (2004) Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 68: 422–428.
- Herrera L, Ottolenghi C, Garcia-Ortiz JE, Pellegrini M, Manini F, et al. (2005) Mouse ovary developmental RNA and protein markers from gene expression profiling. *Dev Biol* 279: 271–290.
- Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, et al. (2000) Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing

- mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet* 9: 1553–1560.
13. Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD (2005) Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod* 72: 492–501.
  14. Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, et al. (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 287: 361–377.
  15. Olesen C, Nyeng P, Kalisz M, Jensen TH, Møller M, et al. (2007) Global gene expression analysis in fetal mouse ovaries with and without meiosis and comparison of selected genes with meiosis in the testis. *Cell Tissue Res* 328: 207–221.
  16. Swain A (2006) Sex determination: time for meiosis? The gonad decides. *Curr Biol* 16: R507–509.
  17. Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC (2008) Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 322: 1685–1687.
  18. Trautmann E, Guerin MJ, Duquenne C, Lahaye JB, Habert R, et al. (2008) Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle* 7: 656–664.
  19. Suzuki A, Saga Y (2008) Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 22: 430–435.
  20. Li H, MacLean G, Cameron D, Clagett-Dame M, Petkovich M (2009) Cyp26b1 expression in murine Sertoli cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS One* 4: e7501.
  21. Bowles J, Feng CW, Spiller C, Davidson TL, Jackson A, et al. (2010) FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev Cell* 19: 440–449.
  22. Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG, et al. (2008) Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14976–14980.
  23. Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, Denefeld C, Feret B, et al. (2008) STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci* 121: 3233–3242.
  24. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, et al. (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312: 596–600.
  25. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, et al. (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2474–2479.
  26. Bowles J, Koopman P (2007) Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 134: 3401–3411.
  27. Ohta K, Lin Y, Hogg N, Yamamoto M, Yamazaki Y (2010) Direct Effects of Retinoic Acid on Entry of Fetal Male Germ Cells into Meiosis in Mice. *Biol Reprod* 83: 1056–1063.
  28. Kumar S, Chatzi C, Brade T, Cunningham TJ, Zhao X, et al. (2011) Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat Commun* 2: 151.
  29. Konishi I, Fujii S, Okamura H, Parmley T, Mori T (1986) Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *J Anat* 148: 121–135.
  30. Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, et al. (2002) Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 66: 1134–1150.
  31. Tingen C, Kim A, Woodruff TK (2009) The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 15: 795–803.
  32. Nicholas CR, Haston KM, Pera RA (2010) Intact fetal ovarian cord formation promotes mouse oocyte survival and development. *BMC Dev Biol* 10: 2.
  33. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM (2009) The mammalian ovary from genetics to revelation. *Endocr Rev* 30: 624–712.
  34. Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE (2009) Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med* 27: 14–23.
  35. Roy A, Matzuk MM (2006) Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction* 131: 207–219.
  36. Soyak SM, Amleh A, Dean J (2000) FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645–4654.
  37. Joshi S, Davies H, Sims LP, Levy SE, Dean J (2007) Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Dev Biol* 7: 67.
  38. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157–1159.
  39. Choi Y, Qin Y, Berger MF, Ballow DJ, Bulyk ML, et al. (2007) Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking Nobox. *Biol Reprod* 77: 312–319.
  40. Choi Y, Rajkovic A (2006) Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *J Biol Chem* 281: 35747–35756.
  41. Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, et al. (2006) Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators Sohlh1 and Lhx8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8090–8095.
  42. Ballow DJ, Xin Y, Choi Y, Pangas SA, Rajkovic A (2006) Sohlh2 is a germ cell-specific bHLH transcription factor. *Gene Expr Patterns* 6: 1014–1018.
  43. Choi Y, Yuan D, Rajkovic A (2008) Germ cell-specific transcriptional regulator sohlh2 is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol Reprod* 79: 1176–1182.
  44. Lau NC (2010) Small RNAs in the animal gonad: guarding genomes and guiding development. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1334–1347.
  45. Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, et al. (2009) GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet* 5: e1000635.
  46. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, et al. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442: 203–207.
  47. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442: 199–202.
  48. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20: 1709–1714.
  49. Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, et al. (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313: 363–367.
  50. Baillet A, Mandon-Pepin B, Cabau C, Pomerol E, Pailhoux E, et al. (2008) Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. *BMC Genomics* 9: 436.
  51. Mandon-Pepin B, Oustry-Vaiman A, Vigier B, Piumi F, Cribeu E, et al. (2003) Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol Reprod* 68: 985–995.
  52. Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC (2001) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 27: 422–426.
  53. Frost RJ, Hamra FK, Richardson JA, Qi X, Bassel-Duby R, et al. (2010) MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11847–11852.
  54. Zheng K, Xiol J, Reuter M, Eckardt S, Leu NA, et al. (2010) Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11841–11846.
  55. Yang F, Gell K, van der Heijden GW, Eckardt S, Leu NA, et al. (2008) Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev* 22: 682–691.
  56. Krotz SP, Ballow DJ, Choi Y, Rajkovic A (2009) Expression and localization of the novel and highly conserved gametocyte-specific factor 1 during oogenesis and spermatogenesis. *Fertil Steril* 91: 2020–2024.
  57. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
  58. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, et al. (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20: 329–337.
  59. Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, Elbaz C, Delouis C, et al. (1996) Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos. *Development* 122: 3023–3033.
  60. Cerutti L, Mian N, Bateman A (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25: 481–482.
  61. Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, et al. (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10: 1026–1032.
  62. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, et al. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426: 468–474.
  63. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2003) Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426: 465–469.
  64. Lingel A, Sattler M (2005) Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol* 15: 107–115.
  65. Berg JM, Shi Y (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081–1085.
  66. Wang D, Guo Y, Wu C, Yang G, Li Y, et al. (2008) Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* 9: 44.
  67. Brown RS (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* 15: 94–98.
  68. Hall TM (2005) Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr Opin Struct Biol* 15: 367–373.
  69. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, et al. (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 19: 4311–4323.
  70. Michel SL, Guerrero AL, Berg JM (2003) Selective RNA binding by a single CCCH zinc-binding domain from Nup475 (Tristetraprolin). *Biochemistry* 42: 4626–4630.
  71. Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, et al. (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1: 707–718.
  72. Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69: 439–456.
  73. Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, et al. (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1: 697–705.

74. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, et al. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128: 1089–1103.
75. Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, et al. (2006) Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* 20: 2214–2222.
76. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, et al. (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313: 320–324.
77. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318: 761–764.
78. Deng W, Lin H (2002) miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2: 819–830.
79. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, et al. (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31: 785–799.
80. Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, et al. (2009) MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J Biol Chem* 284: 6507–6519.
81. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, et al. (2008) DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22: 908–917.
82. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ (2007) Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316: 744–747.
83. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, et al. (2007) MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12: 503–514.
84. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, et al. (2004) Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131: 839–849.
85. Zamudio N, Bourc'his D (2010) Transposable elements in the mammalian germline: a comfortable niche or a deadly trap? *Heredity* 105: 92–104.
86. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, et al. (2010) MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 24: 887–892.
87. Petre-Lazar B, Livera G, Moreno SG, Trautmann E, Duquenne C, et al. (2007) The role of p63 in germ cell apoptosis in the developing testis. *J Cell Physiol* 210: 87–98.
88. Salamov AA, Solovyev VV (2000) Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res* 10: 516–522.
89. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
90. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543–548.

## Communications scientifiques

### Articles

Baillet A, Le Bouffant R, Volff JN, **Luangpraseuth A**, Pomerol E, Thépot D, Pailhoux E, Livera G, Cotinot C, Mandon-Pépin B. 2011 TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates. PLoS ONE 6(11): e26950. doi:10.1371/journal.pone.0026950.

Jonathan R. Skinner, Renate Marquis-Nicholson, **Alix Luangpraseuth**, Rick Cutfield, Jackie Crawford, and Donald R. Love, "Diabetic Dead-in-Bed Syndrome: A Possible Link to a Cardiac Ion Channelopathy," Case Reports in Medicine, vol. 2014, Article ID 647252, 5 pages, 2014. doi:10.1155/2014/647252

### Communications orales

**Luangpraseuth-Prosper A**. "Topaz1, un nouveau gene impliqué dans la spermatogenèse", 19èmes journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction, Septembre 2014, Issy-les-Moulineaux, France.

**Luangpraseuth-Prosper A**, Pomerol E, Baillet A, Cotinot C, Mandon-Pépin B. " Topaz1 : Un gène indispensable à la fertilité masculine", Réunion Transversale "Différenciation des gonades chez les vertébrés", 11 Juin 2014, Montpellier, France.

**Luangpraseuth-Prosper A**. "Analyse du phénotype de souris invalidées pour le gène Topaz1", Journée des Thésards et Masters2, 20 Mai 2014, Jouy-En-Josas, France.

**Luangpraseuth-Prosper A**, Pomerol E, Baillet A, Cotinot C, Mandon-Pépin B. "The Topaz1 gene is necessary for spermatogenesis", 18th European Testis Workshop on the Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Mai 2014, Elsinore, Denmark.

**Luangpraseuth-Prosper A**. "Analyse du phénotype de souris invalidées pour le gène Topaz1", Journée des Thésards et Masters2, 10 Mai 2012, Jouy-En-Josas, France.

**Luangpraseuth A**, Baillet A, Pomerol E, Cotinot C, Mandon-Pépin B. "Topaz1 is essential for spermatogenesis and male fertility". 17th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Avril 2012, Djurönäset, Suède.

**Luangpraseuth A**, Pomerol E, Cotinot C, Mandon-Pépin B. "Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation de la lignée germinale au cours du développement". XXVIIIème Congrès de la SALF, 26-27Janvier 2012, Rouen, France.

**Luangpraseuth A**. "Analyse du phénotype de souris invalidées pour le gène Topaz1", Journée des M2 et Ingénieurs, 26 Mai 2011, Jouy-En-Josas, France.

### Posters

**Luangpraseuth A**, Pomerol E, Baillet A, Cotinot C, Mandon-Pépin B, "Topaz1, un gène indispensable à la spermatogenèse et à la fertilité mâle". Journées d'Animation Scientifique du département PHASE, 3-4 Octobre 2013, Paris, France.

**Luangpraseuth A**, Baillet A, Pomerol E, Cotinot C, Mandon-Pépin B, "Topaz1 is essential for spermatogenesis and male fertility", 1st course on Non-coding Genome, Juin 2012, Paris, France.

### Prix

Prix des doctorants décerné au cours de la Journée des Thésards et des Masters 2 2014 de l'unité Biologie du Développement et Reproduction.

Prix des Masters Recherche 2011 décerné par la Société d'Andrologie de Langue Française (SALF).

# Résumé

---

Cette thèse constitue un travail original décrivant pour la première fois le rôle indispensable du gène *Topaz1* pour une spermatogenèse correcte chez la souris. Ce gène, hautement conservé chez les vertébrés, est spécifique des cellules germinales et possède deux domaines conservés: CCCH et PAZ. Ce domaine PAZ est retrouvé dans les protéines PIWI impliquées dans la voie des piRNAs.

Afin d'étudier le rôle de *Topaz1*, nous avons généré un modèle murin dépourvu de ce gène.

L'absence de TOPAZ1 ne perturbe ni le développement, ni la fertilité des souris hétérozygotes et des femelles homozygotes. Par contre, les mâles *Topaz1*<sup>-/-</sup> sont stériles dû à un arrêt de la spermatogenèse lors de la première division méiotique. Le poids des testicules de ces animaux mutants diminue après la première vague de la spermatogenèse comparé à des testicules d'animaux normaux. D'un point de vue histologique, les différences entre testicules *Topaz1*<sup>-/-</sup> et <sup>+/+</sup> apparaissent entre 15 et 20 jours après la naissance. Cette déficience en TOPAZ1 induit une absence de cellules germinales haploïdes et une augmentation de l'apoptose, suggérant un arrêt de la spermatogenèse au cours de la première division de méiose. Cet arrêt n'est pas dû à un défaut de formation du complexe synaptonémal ni à une dérégulation de l'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels. De plus, malgré la présence d'un domaine PAZ dans la protéine TOPAZ1, son absence n'induit pas une dé-répression des rétrotransposons. Les testicules de ces souris *Topaz1*<sup>-/-</sup>, comparés à des animaux normaux, présentent des transcriptomes perturbés avec notamment la dérégulation de l'expression de plusieurs gènes inconnus et d'ARNs non codants longs. L'un d'eux a également été retrouvé dérégulé dans des modèles de souris invalidés pour des gènes indispensables à la fertilité murine mâle (*Mov10l1*, *Mybl1*).

Ces résultats suggèrent une nouvelle voie de régulation de la spermatogenèse, parallèle et indépendante à la voie des piARNs, qui pourrait impliquer des régulations via des lncRNAs.

Cette étude a permis de démontrer que TOPAZ1 est indispensable à la spermatogenèse de souris. En plus d'être un bon gène candidat pour des cas d'infertilités azoospermiques non obstructives chez l'Homme, *Topaz1* pourrait ouvrir des nouveaux champs d'investigations impliquant de nouvelles voies de régulation de la spermatogenèse.

# Abstract

---

This thesis constitutes an original study describing for very the first time the crucial role in spermatogenesis of the *Topaz1* gene in mice. This gene, highly conserved in Vertebrates, is germ cells-specific and contains two conserved domains: CCCH and PAZ. The PAZ domain is found in the PIWI proteins implicated in the piRNAs pathway.

In order to study the role of *Topaz1*, our laboratory has generated a mouse model deleted for this gene.

The deletion of *Topaz1* does not impair mouse development, nor fertility of heterozygous mice and homozygous females. Contrariwise, *Topaz1*<sup>-/-</sup> males are infertile because of an arrest of spermatogenesis during the first meiotic division. Mutants' testicular weight is reduced after the first wave of spermatogenesis, compared with testis of normal males. Histologically, differences between *Topaz1*<sup>-/-</sup> and <sup>+/+</sup> testes appear between 15 and 20 days after birth. Deletion of *Topaz1* causes a lack of haploid germ cells and an increase of apoptosis, suggesting an interruption of spermatogenesis during the first meiotic division. This meiotic arrest is not caused nor by a synaptonemal complex formation defect nor by a misregulation of the MSCI (Meiotic Sex Chromosomes Inactivation). Despite the PAZ domain contained in the TOPAZ1 protein, its invalidation does not activate retrotransposon expression. *Topaz1*-null testes reveal disturbed transcriptomes with a misregulation of several unknown genes and long non-coding RNAs expression. One of these lncRNAs is also misregulated in other mouse models presenting a male infertility (*Mov10L1*<sup>-/-</sup>, *Mybl1*<sup>-/-</sup>).

These results suggest a new regulation pathway of spermatogenesis, parallel and independent to the piRNAs pathway. This new pathway could implicate lncRNAs regulations.

This study demonstrated the essential role of *Topaz1* in mice spermatogenesis. This gene is a good candidate for azoospermia non-obstructive infertility in men. *Topaz1* could open new fields of investigation involving spermatogenesis new regulation pathways.