Université de Paris

Ecole doctorale ED BioSPC 562

Laboratoire de Développement des Gonades

Régulation transcriptionnelle et entrée en méiose

Par Laura BELLUTTI

Thèse de doctorat de Biologie

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie

Dirigée par Gabriel LIVERA

Présentée et soutenue publiquement le 13 Septembre 2019

JURY

Président du jury : **Dumont**, Julien / Dr. / Institut Jaques-Monod

Rapporteur : **De Massy**, Bernard / Dr. / Institut de Génétique Humaine

Rapporteur : **Jamin**, Soazik / Dr. / Université de Rennes

Examinateur : **Cocquet**, Julie / Dr. /Institut Cochin

Examinateur : **Ghyselinck**, Norbert / Dr. / Institut de Génétique et de Biologie Moleculaire er Cellulaire

Directeur de thèse : **Livera**, Gabriel / Pr. / Université de Paris

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Développement des Gonades
(LDG)
Dirigé par Gabriel Livera

Unité mixte de recherche - Stabilité génétique, cellules souches et radiations
CEA- Université de Paris - Université Paris Sud
Dirigée par François Boussin

Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (IRCM)
Directeur Paul-Henri-Roméo

Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob
Centre CEA de Fontenay-aux-Roses
18, route du Panorama
BP6
92 265 Fontenay-aux-Roses, France

CEA/DRF/IBFJ/IRCM/LDG

Ai miei genitori

E a tutta la mia famiglia

Aux Trois qui me supportent tous les jours

et à ma fille, le plus beau produit de méiose

Remerciements au jury

Je tiens à remercier très sincèrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de participer à l'aboutissement de cette aventure.

Merci au Docteur **Julien Dumont** d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Merci aux Docteurs **Bernard De Massy** et **Soazik Jamin** pour avoir assumé la charge d'être mes rapporteurs de thèse.

Merci aux Docteurs **Norbert Ghyselinck** et **Julie Cocquet** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie enfin le Professeur **Gabriel Livera** pour m'avoir encadrée et conseillée tout au long de ma thèse.

Résumé

La méiose est un processus **hautement conservé**, central dans la **reproduction sexuée,** permettant la production de **cellules haploïdes** à partir des cellules germinales diploïdes. Chez les mammifères l'entrée en méiose est étroitement **régulée** et dépendante du sexe : elle a lieu au cours de la vie fœtale chez la femelle et pendant la vie post-natale chez le mâle. À l'heure actuelle, **l'acide rétinoïque (AR**) est considéré comme le principal régulateur de l'entrée en méiose : il induirait l'expression de ***Stra8*** (*Stimulated by the retinoic acid gene 8),* facteur transcriptionnel clé de la **transition mitose/méiose**. Dans les testicules fœtaux, **CYP26B1,** enzyme capable de cataboliser l'AR, inhibe l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose. Cependant, il n'existe pas de preuve définitive du rôle de l'AR endogène dans l'initiation de la méiose.

Nous avons donc tenté de clarifier l'implication de l'AR dans la régulation de *Stra8* en vie fœtale. Pour cela nous avons développé une méthode de surexpression *ex vivo* des enzymes CYP26B1 et CYP26A1, une autre enzyme avec une activité catalytique de l'AR. Nous montrons que CYP26B1 est suffisant pour inhiber STRA8 dans l'ovaire fœtal, **indépendamment de la voie de signalisation de l'AR.** Nous proposons ainsi que l'AR agisse dans l'amplification de *Stra8* plutôt que dans son induction primaire.

Récemment deux autres facteurs ont été caractérisés pour leur rôle clé dans la régulation de la transition mitose/méiose au niveau post-transcriptionnel : MEIOC et son partenaire YTHDC2. Nous avons effectué une analyse des mutants ***Stra8, Meioc*** **et** ***Ythdc2****,* qui révèlent de nombreuses similarités. Nous émettons donc l'hypothèse de l'existence d'un *continuum* entre la régulation **transcriptionnelle** (par STRA8) et **post-transcriptionnelle** (par MEIOC/YTHDC2) en début de méiose. En outre, la double-invalidation de *Stra8* et *Meioc* ne prévient pas l'entrée en méiose de quelques rares spermatocytes. Nous suggérons donc l'existence de facteurs additionnels, encore à découvrir, contrôlant la transition mitose/méiose.

Enfin, nous montrons qu'au moment de la transition mitose/méiose les spermatocytes I sont **trancriptionnellement silencieux.** Cette répression transcriptionnelle est en partie régulée par *Stra8* mais elle est indépendante des évènements clés de la prophase I : cassures double brin, synapsis des chromosomes homologues, changements de la structure chromatinienne. En exploitant une méthode de synchronisation de la spermatogenèse et en immunoprécipitant les ARN néotranscrits, nous avons alors caractérisé le paysage de la transcription en début de méiose pour la première fois. Nous mettons ainsi en évidence des évènements de **stabilisation/déstabilisation** des ARN ayant lieu au cours de la prophase I.

Ces travaux ont donc mis en lumière le haut degré de complexité caractérisant l'entrée en méiose des cellules germinales. Cette dernière est régulée par plusieurs facteurs, dont certains demeurent encore inconnus, aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Mots-clés : Entrée en méiose, prophase I méiotique, acide rétinoïque, *Stra8*, *Meioc/Ythdc2*, régulation post-transcriptionnelle, *silencing* transcriptionnel

Summary

Meiosis is a conserved process, allowing the production of haploid germ cells. In mammals, entry into meiosis is sexually dichotomic, taking place during fetal life in ovaries and during postnatal life in testes. In fetal ovaries, Retinoic Acid (RA) is believed to activate *Stra8* (*Stimulated by the retinoic acid gene 8)*, a key factor of mitosis/meiosis transition. In fetal testes, CYP26B1, a RA-metabolising enzyme, prevents *Stra8* expression. However, the exact role of endogenous RA remains uncertain.

The first objective of my work was to clarify the function of endogenous RA in meiotic initiation. For this purpose, we created a model of artificial RA deficiency by ex vivo electroporation of fetal gonads with plasmids encoding *Cyp26b1* or *Cyp26a1*, two RA-metabolising enzymes. We observed that ectopic CYP26B1 is sufficient to prevent STRA8 appearance in germ cells from fetal ovaries. In contrast, overexpression of CYP26A1 only mildly affects the expression of Stra8 mRNA. We thus conclude that CYP26B1 acts independently of RA signalling pathway on meiotic initiation. We propose a two-step model with first a RA-independent *Stra8* induction, followed by its RA-dependent amplification.

Recently, MEIOC and YTHDC2 have been caracterised as key post-transcriptional regulators of mitosis/meiosis transition. Here, we compare the phenotypes of *Stra8*, *Meioc* and *Ythdc2* mutant mice Their high similarity prompt us to hypothesise a continuity between transcriptional and post-transcriptional regulations. In parallel, we show that double invalidation of *Stra8* and *Meioc* does not completely prevent meiotic initiation. Thus, we hypothesise the existence of other unknown mitosis/meiosis regulators.

Finally, we characterised a genome wide arrest of transcription taking place during mitosis/meiosis transition. This transcriptional silencing is partly dependent of *Stra8* but is independent of other key events of meiotic prophase I: double-strand breaks, homologous chromosome synapsis, axe-loop chromosome structure. We took advantage of a spermatogenesis synchronisation protocol and nascent RNA immunoprecipitation, to characterise the transcriptional landscape of early-meiotic germ cells. This highlighted stabilization and destabilization phemomena taking place during prophase I.

As a whole, we show the high complexity level of meiosis initiation, which has to be finely regulated by the orchestration of transcriptional and post-transcriptional events.

Keywords : Meiotic initaition, meiotic prophase I, *Stra8*, *Meioc/Ythdc2*, post-transcriptional regulation, transcriptional *silencing*.

Liste des abréviations

A

A1, A2, A3, A4 : Spermatogonie de type A1-A4

Aal : Spermatogonie $A_{aligligned}$

Apr : Spermatogonie A_{paired}

As : Spermatogonie A_{single}

ADHs : cytosolic alcohol dehydrogenases

ADNdb : ADN double brin

ADNsb : ADN simple brin

AR : Acide Rétinoique

ARNm : ARN messagers

ARNr : ARN ribosomiaux

ARNt : ARN de transfert

ATM : Ataxia Telangectasia Mutated

ATR : ATM and Rad3-related

B

B : Spermatogonie de type B

BLIMP1: B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1

BMPs : Bone Morphogenetic Protein

BRCA1: BReast Cancer Associated protein 1

BrdU : BromodeoxyUridine

C

CDBs : Cassures Double Brin

CG : Cellule Germinale

CGP : Cellules Germinales Primordiales

c-Kit : Tyrosine-protein kinase Kit

COMPASS : Complex Proteins Associated with Set1

CPEs : core promoter elements

CS : Complexe Synaptonemal

CTCF : CCCTC-binding factor

CTD : C-Terminal Domain

CYP26 : famille 26 des cytochromes P450

D

DDR : DNA Damage Response

Dmrt1 et 6 : Doublesex ad mab-3 related transcription factor 1 et 6

DSD : Disorders of Sex Development

E

EGA : Embryonic Genome Activation

EMLT : Early Meiotic Low Transcription

EU : Ethynyl-Uridine

F

FACT : Facilitates Chromatin Transcription

FGF9 : Fibroblast Growth Factor

Foxl2 : Forkhead box family L2

G

GFRA1 : GDNF Family Receptor Alpha 1

GTF : General Transcription Factors

H

H1, H2A, H2B, H3, H4,: Histone 1 Histone 2A, Histone 2B, Histone 3, Histone 4

H2AX : variant X de l'histone H2A

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histones désacétylases

I

Int : Spermatogonie intérmediaire

J

Jpc : jours post-conception

Jpp : jours post-partum

M

m6A : ARN N6 methyladenosine

MDC1 : Mediator of DNA demage checkpoint protein 1

MEIOC : Meiosis specific with coiled-coil domain

MIS : Meiotic Inducing Substance

MLH1, -2 : MutL Homolog 1 et 2

MPF : Meiotic Preventing Factor

MPS : Meiotic Preventing Substance

MSCI : Meiotic Sex Chromosome Inactivation

MSUC : Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin

Msx : homeobox msh-like

N

NER : Nucleotide Excision Repair

NES : Nuclear Export Sequence

NHEJ : Non-Homologous-End-Joining

NLS : Nuclear Localisation Sequence

P

PAR : Pseudo Autosomal Region

Pb : paires de base

pgc : polar granule component

PIKKs : phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-ralated kinases

PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger protein protéine à domaine zinc-finger (ZBTB16)

Pol I, II, III: ARN Polymerase I, II, III

POU5F1 : POU Class 5 Homeobox 1 (Oct4)

pPol2 : ARN Polymerase II phosphorylé sur la Seine 2

pPol2-Ser5 : ARN Polymerase II phosphorylé sur la Seine 5

PRC : Polycomb Repressive Complex

Pré-ARN : ARN pré-messager

P-TEFb : positive Transcription Elongation Factor

PTM : Post Translational Modification

R

RALDH : RetinALdehyde DeHydrogenase

RAR : Retinoic Acid Receptors

RAREs : éléments de réponse à l'AR

RDHs : Retinol dehydrogenases

RH : Recombinaison Homologue

RNP : ribonucleoprotéines

RPB1 : RNA Polymerase II Subunit B1

Rspo-1 : R-spondin homolog 1

RXR : Retinoid X Receptor

S

SCRE : Synaptonemal Complex Reinforcing Element

SF1 : Steroidogenic Factor 1

Sg : spermatogonies

Sox9 : Sry-related HMG box9

SPO11: SPOrulation protein, meiosis-specific, SPO11 homolog

Sry : Sex determining region of the Y

STAG3: STromal AntiGen 3

Stra8 : Stimulated by retinoic acid, gene 8

SYCE-1, -2 : SYnaptonemal complex Central Element 1, 2

SYCP1, -2, -3: Synaptonemal complex protein 1, -2, -3

T

TC-NER ou TCR : Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair

TOPBP1 : DNA topoisomerase 2-binding protein 1

Y

YTHDC2 : YTH Domain Containing 2

Table des matières

Préambule 1

Introduction 3

I. La méiose 5

I.A. La gamétogenèse 7

I.A.1. Les Cellules Germinales Primordiales 7

I.A.2. L'environnement somatique 11

I.B. Régulation de l'entrée en méiose 13

I.B.1. Métabolisme de l'Acide Rétinoïque 15

I.B.2. Rôle de l'AR dans l'entrée en méiose 17

I.B.3. Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose 20

I.C. La spermatogenèse 25

I.C.1. La structure du testicule 25

I.C.2. Les phases de la spermatogenèse 27

I.C.3. Cycle de l'épithélium séminifère 29

I.C.1. Rôle de l'AR dans la spermatogenèse 35

I.D. Prophase I méiotique 35

I.D.1. Cassures Double-Brins 37

I.D.2. La structure chromatinienne 41

I.D.3. Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI) 49

I.D.4. Les Points de contrôle en prophase I 52

I.D.5. Dimorphisme sexuel 53

II. La transcription 55

II.A. L'ARN polymérase II 55

II.B. Transcription et contexte chromatinien 57

II.B.1. La transcription, l'architecture de la chromatine et les histones 57

II.B.2. La transcription et les cohésines 59

II.B.3. La transcription et les dommages à l'ADN 61

II.C. Complexité transcriptomique et dynamique transcriptionnelle du testicule 62

II.C.1. Quiescence transcriptionnelle des CGP 63

II.C.2. La transcription pendant l'entrée en méiose 69

II.C.3. La transcription dans les spermatides 71

II.C.4. La transcription après la fécondation ... 73
II.D. Les modifications épigénétiques au cours de la méiose ... 75
II.E. Les régulations post-transcriptionnelles ... 79

III. Conclusion ... 81

Résultats ... 83

I. Rôle de l'Acide Rétinoïque dans l'entrée en méiose en vie fœtale ... 85
I.A. Mise au point du protocole d'électroporation de gonades fœtales ... 87
I.B. Article I: ... 89
Endogenous retinoic acid regulates Sertoli cell proliferation but not Stra8 primary induction in mouse developing gonads ... 89
I.C. Résultats complémentaires ... 91
I.C.1. Effet de l'électroporation sur l'expression de gènes cibles de l'AR et de déterminants du sexe gonadique ... 91
I.C.1. Analyse de la prolifération des CG ... 93

II. Le rôle clé de trois régulateurs du programme méiotique : Stra8, Meioc, et Ythdc2 ... 95
II.A. Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de l'Acide Rétinoïque dans des souriceaux *Meioc -/-* ... 97
II.B. Effet de la double invalidation de *Meioc* et *Stra8* ... 99
II.C. *Stra8, Meioc* et *Ythdc2* ... 103
II.D. Localisation de MEIOC et YTHDC2 ... 111
II.E. Fond NMRI *versus* fond C57BL/6 ... 111

III. Le *silencing* transcriptionnel ... 115
III.A. Article 2: ... 117
Early-prophase genome-wide transcriptional silencing does not depend upon meiotic events. ... 117
III.B. RNAseq : ARN totaux contre ARN néotranscrits ... 119
III.B.1. Préparation des échantillons ... 119
III.B.2. Clustering de nos échantillons ... 121
III.B.3. Profils d'expression ... 123
III.B.4. Quels types de gènes ? ... 127
III.C. Résultat complémentaire : Analyse de la pPOL2 dans les ovaires fœtaux ... 135

Discussions et conclusions ... 137

L'Acide Rétinoïque ... 139
I.A. Un mot sur le modèle d'électroporation. ... 139
I.B. Quelle place pour l'acide rétinoïque dans l'induction méiotique? ... 141

I.C. Questionnement autour du rôle de CYP26B1 143
I.D. Notre modèle dans un contexte physiologique 145
I.E. Rôle de l'AR sur les cellules somatiques 146
I.F. Est-ce que notre modèle trouve sa place dans la littérature ? 146
I.G. Conclusions 148

II. Transition mitose/méiose: STRA8, MEIOC et YTHDC2 149
II.A. Comparaison de trois mutants : Stra8 -/-, Meioc -/- et Ythdc2 -/- 149
II.B. Métaphases anormales 151
II.C. MEIOC et YTHDC2 : entre stabilisation et dégradation 153
II.D. MEIOC et YTHDC2: *en quoi diffèrent-ils ?* 154
II.E. MEIOC et YTHDC2: *existence d'un rôle tardif?* 155
II.F. La régulation du programme méiotique 155
II.G. Conclusion 156

III. Silencing transcriptionnel et entrée en méiose 157
III.A. Pourquoi la régulation post-transcriptionnelle jouerait-elle un rôle important au cours de la prophase I méiotique? 157
III.B. Quels facteurs pourraient être à l'origine du EMLT ? 159
III.C. POL2 et pPOL2: recrutement ou activation? 160
III.D. EMLT: ça sert à quoi? 160
III.E. Quelle transcription ou absence de transcription pendant l'EMLT? 161
III.F. Conclusion 167

IV. Conclusion générale: est-il possible de conclure? 169

Liste des Figures

INTRODUCTION

Figure 1: Les étapes clés de la méiose……4

Figure 2: La gamétogenèse et le cycle de reproduction sexuée chez les mammifères……6

Figure 3: De la spécification des Cellules Germinale Primordiales (CGP) à la détermination du sexe……8

Figure 4: Interactions entre les voies de détermination testiculaire et ovarienne en vie fœtale……..12

Figure 5: Métabolisme de l'Acide Rétinoïque……14

Figure 6: Modèle du rôle de l'Acide Rétinoïque (AR) dans la régulation dichotomique de l'entrée en méiose……16

Figure 7: Schéma synthétisant les effets des différents traitements *in vitro* et des modèles génétiques existants, sur l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose dans les gonades fœtales murines……18

Figure 8: Représentation des différents facteurs jouant un rôle dans l'initiation méiotique……22

Figure 9: Histologie du testicule……24

Figure 10: Phase mitotique de la spermatogenèse……...26

Figure 11: Cycle de l'épithélium séminifère……28

Figure 12: Régulations des trois étapes de la spermatogenèse régulées par l'acide rétinoïque……30

Figure 13: Synchronisation de la spermatogenèse……32

Figure 14: Immunohistologie d'un testicule synchronisé……33

Figure 15: Étapes clés de la Recombinaison Homologue (RH) méiotique……36

Figure 16: Structure et fonctions des cohésines……40

Figure 17: Représentation schématique des profils d'expression des cohésines au cours de la méiose……42

Figure 18: *Synapsis* des chromosomes homologues au cours de la prophase I méiotique……44

Figure 19: *Meiotic Sex Chromosome Inactivation* (MSCI) et *Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin* (MSUC)……..48

Figure 20: Conservation du MSCI entre les mammifères (souris) et les oiseaux (poulet)……50

Figure 21: Modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal (CTD) de la sous-unité majeure de l'ARN polymérase II (Pol II) au cours de la transcription……56

Figure 22: Lien entre une transcription active et la réparation des Cassures Double Brin (CDB) de l'ADN par Recombinaison Homologue (RH)……...……60

Figure 23: Origine des cellules germinales chez la Drosophile……64

Figure 24: Inactivation transcriptionnelle des cellules germinales primordiales chez la Drosophile……64

Figure 25: Origine des cellules germinales chez C. elegans……..64

Figure 26: Inactivation transcriptionnelle des cellules P chez C. elegans……..64

Figure 27: Inactivité transcriptionnelle dans les Cellules Germinales Primordiales (CGP) chez la souris……66

Figure 28: Incorporation de l'Uridine-H^3 et autoradiographie dans des testicules de souris……68

Figure 29: Absence de l'ARN polymérase II active en début de méiose……..68

Figure 30: Baisse de transcription concomitante à la transition des histones en protamines dans les spermatides……70

Figure 31: Représentation schématique de l'activation du génome embryonnaire (EGA) au cours des premières divisions de l'embryon chez la souris……..72

Figure 32: Schéma synthétisant les profils de modifications post-traductionnelles d'histones (PTM) au cours de la prophase I méiotique……....76

RESULTATS

Figure 1 : Électroporation de gonades fœtales……..86

Figure 2: Validation de l'efficacité de l'électroporation……88

Figure 3: Analyse de l'expression de différents gènes dans les gonades électroporées……90

Figure 4: Profils d'expression de *Stra8* et *Sycp3* dans des populations cellulaires purifiées de gonades fœtales……90

Figure 5: Effet de l'électroporation de *Cyp26b1* ou *Cyp26a1* sur la prolifération des cellules germinales femelles……92

Figure 6: Modèle de départ sur les rôles potentiels de STRA8 et MEIOC dans l'initiation de la méiose……94

Figure 7: Inhibition de la voie de signalisation AR/*Stra8* dans des souriceaux *Meioc -/-*……96

Figure 8: Analyse de l'expression d'ARN méiotiques dans les testicules *Meioc* mutants traités au BMS……98

Figure 9: Analyse en plot de l'expression des pré-ARN versus les ARN matures……..100

Figure 10: Effet de la double invalidation de *Meioc* et *Stra8* sur l'entrée en méiose……..101

Figure 11: Analyse de l'expression d'ARN méiotiques dans des testicules adultes double mutants (*Meioc -/- Stra8 -/-*)……...102

Figure 12: Comparaison de l'expression des ARN méiotiques et des pré-ARN dans des testicules adultes *Meioc +/+ Stra8 -/-* et *Meioc -/- Stra8 -/-*……104

Figure 13: Comparaisons des mutants *Ythdc2 -/-, Meioc -/- et Stra8 -/-*……..105

Figure 14: Présence de métaphases anormales chez les trois mutants: *Meioc -/-, Ythdc2 -/-* et *Stra8 -/-*……*106*

Figure 15: Localisation cytoplasmique de STRA8 chez les mutants *Ythdc2 -/-* et *Meioc -/-*……..*106*

Figure 16: Comparaison de l'expression d'ARN méiotiques dans des testicules adultes mutants pour *Meiob, Meioc, Stra8* ou *Ythdc2*……*108*

Figure 17: Images histologiques des mutants *Meiob, Meioc, Ythdc2, Stra8*……*109*

Figure 18: Différentes localisation de MEIOC et YTHDC2 dans les spermatocytes I……110

Figure 19: Comparaison de l'expression d'ARN méiotiques chez les mutants *Meioc -/-* et *Stra8 -/-* dans deux différents fonds génétiques: NMRI et C57BL/6 (C57)……..112

Figure 20: Protocol expérimental : synchronisation, tri, immunoprecipitation des ARN néotranscrits et séquençage des ARN……..118

Figure 21: *Clustérisation* des échantillons séquencés en fonction des ressemblances transcriptomiques……...120

Figure 22: Regroupement des gènes en fonction de leur profil d'expression en ARN totaux (TOT) et en ARN néotranscrits (CLI)……122

Figure 23: Représentation des gènes ayant un profil P (ARN total) et Q (ARN néotranscrit) corrélés……..124

Figure 24: Représentation des gènes ayant un profil P (ARN total) et Q (ARN néotranscrit) NON corrélés……125

Figure 25: Profils dynamiques de l'expression de gènes de spermatogonies……126

Figure 26: Profils dynamiques de l'expression de gènes exprimés en méiose……...128

Figure 27: Profils dynamiques de l'expression de gènes méiotiques et post-méiotiques……...130

Figure 28: Profils dynamiques de l'expression de gènes qui diffèrent en termes d'expression (ARN total) et transcription (ARN néotranscrit)……..131

Figure 29: Ontologie des gènes appartenant à différents groupes (R3, R4 et S2)……..132

Figure 30: Les cellules germinales femelles sont transcriptionnellement hétérogènes……...134

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Figure 1. Modèle proposé pour expliquer les effets de l'électroporation de CYP26B1 ou CYP26A1 dans les ovaires fœtaux murins……140

Figure 2. Schéma proposé pour la régulation dichotomique de l'entrée en méiose (ovaire) et l'entrée en quiescence (testicule) en vie fœtale……...142

Figure 3. Deux modèles possibles sur le rôle de CYP26B1 dans le testicule fœtal……144

Figure 4. Différence entre une métaphase anormale (gauche) et une métaphase I méiotique……150

Figure 5. Modèle d'une double-action possible de MEIOC et YTHDC2 sur la dégradation et stabilisation des ARN.

Figure 6: La densité des transcrits est dynamique au cours de la spermatogénèse……152

Figure 7: Les cellules en pachytène contiennent plus d'ARN que les cellules en début de prophase I……..158

Figure 8: Comparaison des profils d'expression de marqueurs de spermatogénèse identifiés dans l'analyse Single-cell de Ernst et al. 2019……..162

Figure 9: Phénomènes de stabilisation et déstabilisation observés par l'analyse des profils non-corrélés (profils S)……...164

Figure 10. Profils d'expression des gènes localisés sur les chromosomes sexuels X et Y……165

Préambule

Deux événements clés, au cours de l'évolution, ont mené à l'émergence de **cellules uniques** entre toutes les cellules de l'organisme : les gamètes.

La reproduction sexuée est apparue en alternative à la reproduction asexuée. Au cours d'un cycle de reproduction sexuée deux génomes différents doivent se combiner pour donner naissance à un nouvel organisme, ce qui implique la nécessité de réduire de moitié le contenu génétique. Ainsi, dans les cellules diploïdes, la méiose a évolué en tant que mécanisme de division cellulaire permettant le passage à l'haploïdie.

Par ailleurs, les organismes ont évolué de l'état unicellulaire à l'état multicellulaire ; cette multicellularité a comporté le besoin d'une spécification de lignages cellulaires, y compris la **lignée germinale**. Ainsi, au cours d'un cycle de reproduction sexuée, les cellules germinales passent d'un état mitotique, semblable à celui de toutes les autres cellules de l'organisme, à un état méiotique qui leur est propre.

Cette **transition** de l'état mitotique à l'état méiotique est donc un évènement unique, sans égal, au cœur du cycle de reproduction.

Les cellules germinales se développent en harmonie avec l'organisme, à travers un dialogue constant avec les cellules somatiques. Ainsi, leur vie est orchestrée par une multitude de signaux ; parmi ceux-ci l'**acide rétinoïque** joue un rôle clé dans des nombreuses étapes. Dès 1925, Wolbach et Howe avaient montré qu'une diète dépourvue en Vitamine A, le précurseur de l'acide rétinoïque, induisait une atrophie des tubules séminifères (Wolbach & Howe, 1925). Depuis, des études menées chez le rat et chez la souris ont mis en évidence les rôles de l'acide rétinoïque dans le maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère et dans la spermatogenèse (Hogarth & Griswold, 2010; Van Pelt AM, 1990). L'année 2006 a été marquée par la mise en lumière du rôle de l'acide rétinoïque en tant qu'acteur principal de la transition mitose/méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Depuis, 214 études ont soutenu le rôle de l'acide rétinoïque en tant qu'initiateur méiotique. Néanmoins, le lien AR-méiose fait actuellement l'objet d'un grand débat (Best, Sahlender, Walther, Peden, & Adams, 2008; Guerquin et al., 2010; Kumar et al., 2011).

Cette incertitude autour du rôle de l'AR a motivé une partie de mes travaux de thèse. Pour essayer de déterminer si au cours de la vie fœtale, la présence ou la dégradation de l'AR sont à la base de l'induction, ou non, de l'entrée en méiose, nous avons créé un modèle de dégradation forcée de l'AR dans les gonades fœtales. Ces travaux sont présentés dans ce manuscrit de thèse sous la forme d'un article (Résultats, Partie I). Ce dernier est en cours de soumission.

Malgré le questionnement autour du rôle de l'acide rétinoïque dans l'induction de la méiose, le rôle clé d'un de ses gènes cibles, ***Stra8***, est bien établi. Sa fonction, *in vivo*, en tant que facteur de transcription a été mise en évidence récemment (M. L. Kojima, de Rooij, & Page, 2019). Cela explique pourquoi, en son absence, les cellules germinales échouent à basculer du programme mitotique vers le programme méiotique. Cependant, nous observons, chez le mutant *Stra8*, des cellules germinales qui entament la méiose. *Quel autre facteur permet donc d'induire l'entrée en méiose en absence de Stra8 ?*

Au moment où j'ai débuté la thèse, mon laboratoire venait d'identifier un gène clé de l'initiation méiotique, ***Meioc*** (Abby et al., 2016). De manière intéressante, MEIOC semblerait impliqué dans la stabilisation et/ou dégradation des ARN en début de méiose. Cela assurerait un deuxième niveau de contrôle de la régulation génique. Une première régulation au niveau transcriptionnel serait assurée par STRA8 ; un deuxième niveau de régulation post-transcriptionnelle est fourni par MEIOC et son partenaire YTHDC2. Au cours de ma thèse j'ai étudié l'effet d'une double invalidation de *Stra8* et *Meioc* sur l'entrée en méiose pour déterminer si ces deux facteurs étaient les seuls régulateurs de la transition mitose/méiose. Ces travaux sont rapportés dans ce manuscrit de thèse (Résultats, Partie II)

La découverte d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle en début de méiose peut paraître étonnante. En particulier, *pourquoi les cellules germinales auraient-elles besoin de stabiliser les ARN au moment de l'entrée en méiose ?*
Dès 1964, une étude avait montré une réduction de l'activité transcriptionnelle dans les cellules en début de méiose (MONESI, 1964). Cette **extinction** de l'activité transcriptionnelle dans l'ensemble du génome, au moment de l'entrée des cellules germinales en méiose est curieuse et pour autant peu décrite. C'est en effet à ce moment-là que les cellules germinales doivent assurer l'allumage du programme méiotique. Au cours de ma thèse j'ai donc dédié beaucoup de temps à la caractérisation de ce ***silencing*** transcriptionnel concomitant à l'initiation méiotique. Ces travaux ont abouti à un article en préparation et sont présentés dans ce manuscrit (Résultats, Partie III).

L'étude de phénotypes de souris invalidées pour des gènes exprimés au cours de la méiose a permis de caractériser des nouveaux facteurs clés du processus méiotique. Au cours de ma thèse j'ai ainsi eu l'opportunité de travailler sur deux souris mutantes montrant un défaut de progression méiotique. Une souris a été créée par le laboratoire au début de ma thèse. J'ai donc pu mener l'analyse depuis l'établissement de la lignée transgénique et mener les premières études phénotypiques ainsi que les essais de localisation protéique. L'étude de cette souris s'est avérée compliquée mais très stimulante : en effet, malgré les nombreux défauts qu'on observe dans les étapes clés de la prophase I de méiose, ce facteur n'est pas indispensable car les souris sont fertiles (ou hypofertiles). J'ai fait le choix de ne pas parler de ce mutant dans mon manuscrit de thèse, car une grande partie des analyses est encore en cours. Un deuxième mutant, pour lequel j'ai contribué à une partie de l'analyse phénotypique, est l'objet d'une belle collaboration. L'analyse de ce mutant a été passionnante. En effet, les souris mâles montrent des défauts majeurs d'initiation méiotique, tandis que les femelles ne sont pas atteintes. Un article est en cours de préparation.

Enfin, j'ai pu participer à l'étude de deux mutations humaines causant des insuffisances ovariennes précoces : une mutation dans *FANCM* qui a donné une publication (Fouquet et al., 2017) et une mutation dans le gène de *YTHDC2* qui est en lien direct avec mes travaux de thèse.

Pour conclure, la méiose est un processus universel, complexe, crucial pour la fertilité. Il est étudié de longue date mais il réserve encore plein de surprises. Au cours de ma thèse j'ai pu aborder différentes questions suivant un fil conducteur, **l'initiation du programme méiotique**. Je me suis confrontée à plusieurs reprises à des « dogmes » établis et j'ai pu comprendre à quel point les grands événements cellulaires sont encore méconnus.

Introduction

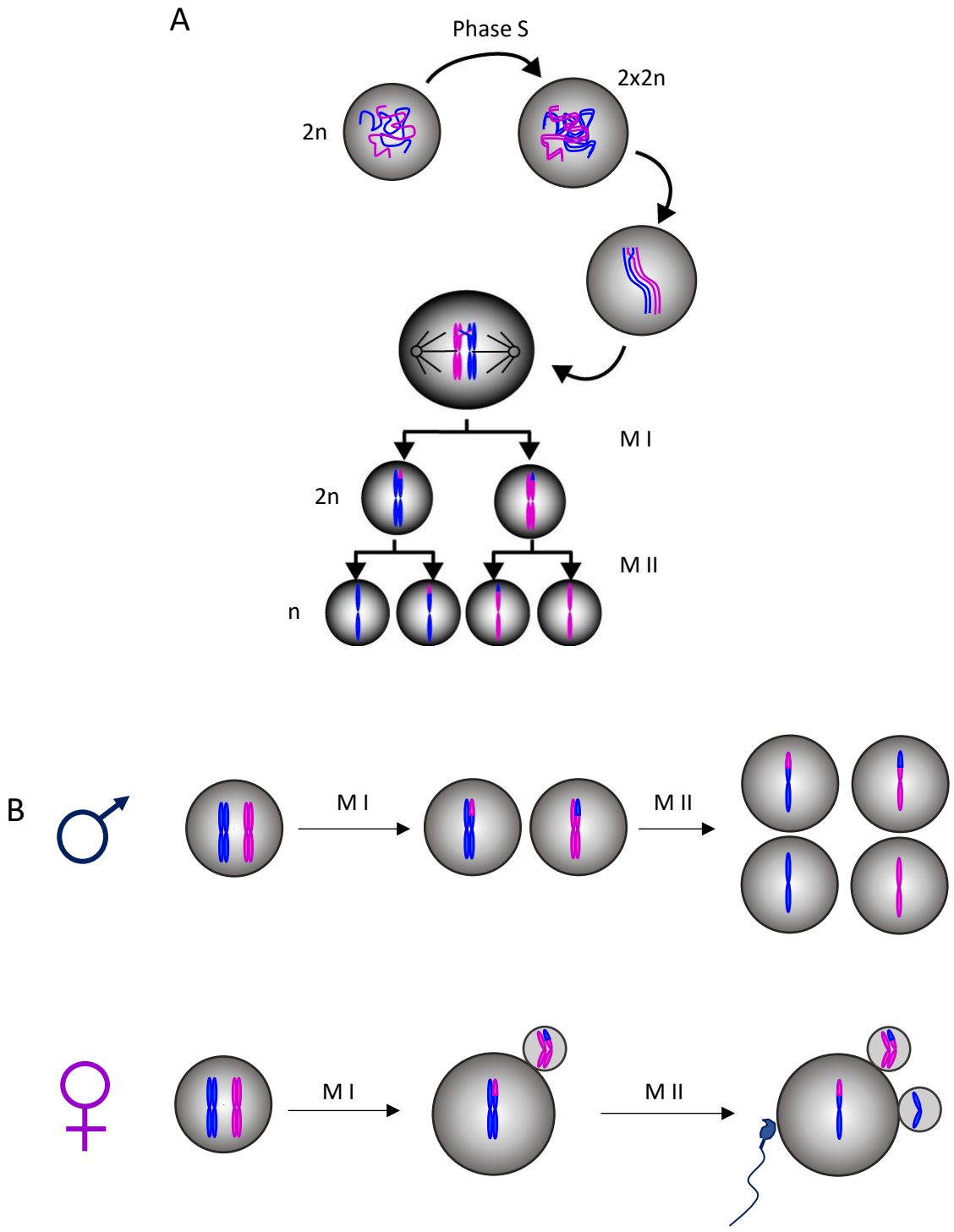


Figure 1: Les étapes clés de la méiose. A) La méiose permet de générer des cellules haploïdes (n) à partir de cellules diploïdes (2n) grâce à deux divisions cellulaires successives (M I et M II) précédées par une seule phase S de réplication de l'ADN (2x2n). **B)** Les produits de la méiose présentent une dichotomie sexuelle : chez le mâle la méiose donne naissance à quatre spermatides rondes (futures spermatozoïdes) tandis que chez la femelle la méiose s'achève uniquement s'il y a fusion avec un spermatozoïde originant un seul ovocyte; les autres chromosomes sont expulsés dans les cellules résiduelles (globules polaires).

I. La méiose

La méiose est le processus au cœur de la reproduction sexuée. Son **universalité**, ainsi que la **complexité** et **conservation** de ses évènements, rendent le processus méiotique extrêmement **fascinant**.

Tout d'abord, la méiose est un processus de division cellulaire qui permet de réduire, précisément de moitié, le contenu génétique. Ceci permet de générer des cellules haploïdes (n chromosomes), à partir de cellules diploïdes (2n chromosomes). Cet exploit est possible grâce à la succession de deux divisions cellulaires précédées par un seul cycle de réplication de l'ADN. Au cours de la phase S préméiotique l'ADN est répliqué (2x2n chromosomes) ; la première division méiotique (Méiose I) est dite réductionnelle car elle permet la ségrégation des chromosomes homologues qui sont répartis entre les deux cellule filles (2n) de manière aléatoire. La deuxième division méiotique (Méiose II), dite équationnelle, a lieu sans réplication intermédiaire de l'ADN et permet la séparation des chromatides sœurs avec génération de cellules haploïdes (n) (**Figure 1A**).

La partition du matériel génétique est extrêmement précise, assurant la conservation d'une copie de chaque gène dans chacune des cellules filles. Cette deuxième prouesse est possible grâce à des évènements de recombinaison homologue qui créent des liens physiques entre les couples de chromosomes homologues. Ceci permet leur alignement sur la plaque métaphasique lors de la métaphase I et leur répartition équitable dans les deux cellules filles lors de l'anaphase.

Chez les mammifères, la méiose fait partie d'un processus plus large, la gamétogenèse, qui englobe toutes les étapes permettant l'évolution des cellules germinales (CG) en gamètes (**Figure 2A**). La gamétogenèse est une étape centrale dans le cycle de reproduction sexuée (**Figure 2B**). *Gamète* dérive du grec « gamete », femme, et « gamos », mariage ; *Genese* dérive du grec « genein », produire: la gamétogenèse permet donc de produire des gamètes, qui se marient et fusionnent pour donner naissance à un nouvel organisme.

Malgré la conservation de la méiose dans les deux sexes, certains de ses aspects sont dichotomiques. En effet, la méiose démarre en vie fœtale chez la femelle, tandis que chez le mâle elle démarre par vagues successives tout le long de la vie postnatale et adulte (**Figure 2A**). En outre, les gamètes générés par le processus méiotique diffèrent à la fois en nombre et en type cellulaire. Chez le mâle, les deux divisions méiotiques permettent d'obtenir 4 spermatozoïdes. Chez la femelle, c'est plus complexe: lors de la première division méiotique, l'ovocyte I génère un seul ovocyte II et une cellule dégénérée, appelée globule polaire; la deuxième division méiotique est complétée uniquement si l'ovocyte est fécondé par un spermatozoïde, ce qui induit l'expulsion du deuxième globule polaire et conduit à la formation du zygote (**Figure 1B**).

Il est surprenant que, malgré les différents *timings* et produits de méiose, les CG mâles et femelles dérivent du même précurseur cellulaire, les Cellules Germinales Primordiales (CGP). *Comment les CGP peuvent-elles générer deux types cellulaires différents ? Comment peuvent-elles s'embarquer vers un destin femelle qui permet de produire des ovocytes, ou bien vers un destin mâle qui s'achève avec la production des spermatozoïdes?* Une complexe orchestration de signaux somatiques provenant de la gonade, le siège de la gamétogenèse, et de régulateurs intrinsèques aux CG, permet de favoriser l'engagement vers la voie femelle (ovogenèse) ou bien vers la voie mâle (spermatogenèse).

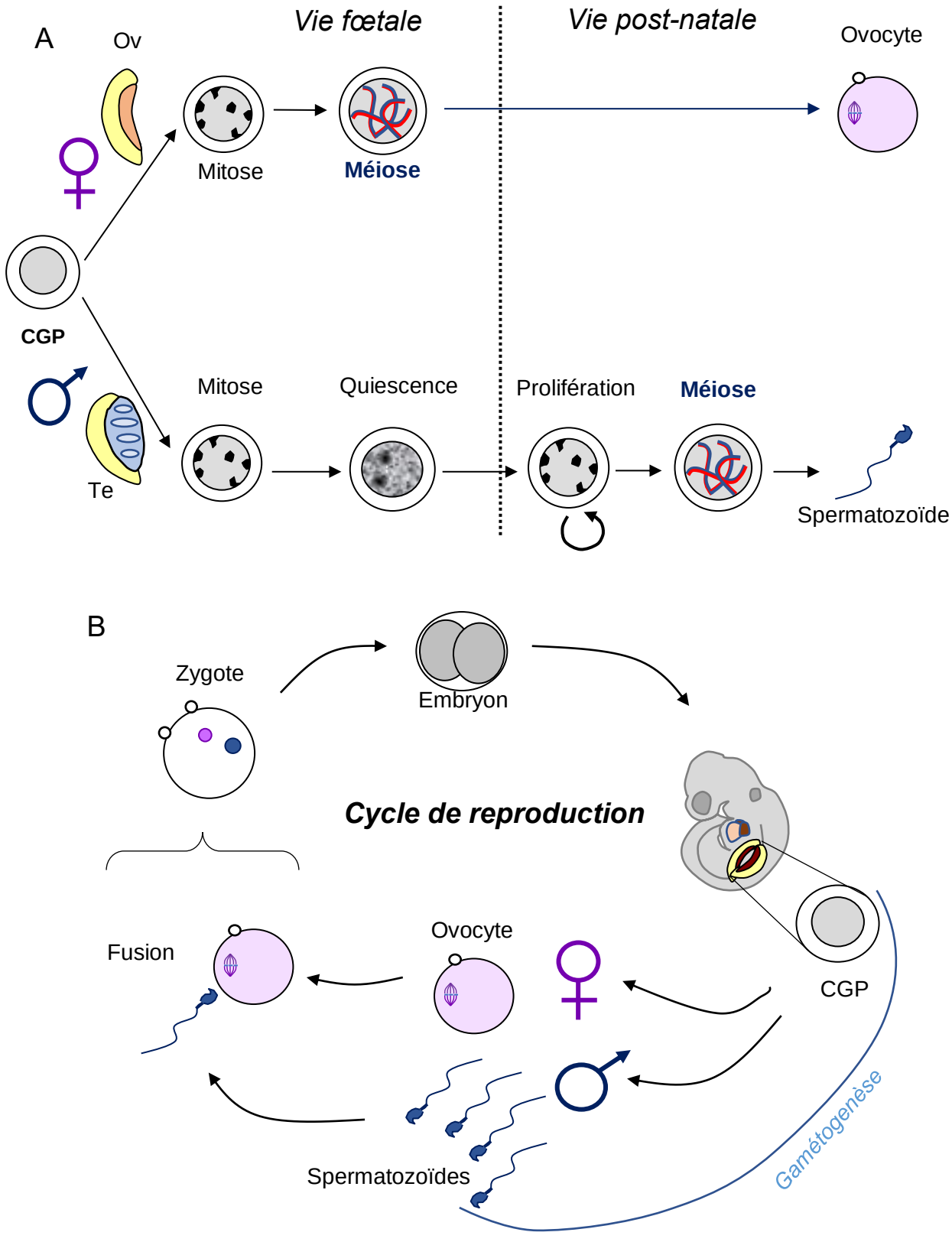


Figure 2: La gamétogenèse et le cycle de reproduction sexuée chez les mammifères. A) Dichotomie du *timing* de l'entrée en méiose chez le mâle et la femelle : les CGP entrent en méiose en vie fœtale chez la femelle et en vie postnatale chez le mâle. CGP = Cellules Germinales Primordiales ; Ov = Ovaire ; Te = Testicule. **B)** Représentation du cycle de reproduction sexuée. Le processus de gamétogenèse permet de générer les gamètes à partir de CGP. La fécondation d'un ovocyte (bloqué en métaphase II) par un spermatozoïde permet l'achèvement de la deuxième division méiotique et la formation d'un zygote contenant un pronoyau mâle (bleu) et un pronoyau femelle (violet) qui contiennent respectivement le matériel génétique mâle et femelle.

Dans cette première partie de l'introduction je démarre avec une présentation globale de la gamétogenèse. Je poursuis avec « un débat » sur la régulation de la transition mitose/méiose et une présentation de ses régulateurs clés. Je fais par la suite un *zoom* rapide sur la spermatogenèse et je termine avec une description des événements de la prophase I méiotique.

I.A. La gamétogenèse

La gamétogenèse est le processus de différenciation des CG en gamètes. La gonade, le siège de la gamétogenèse, est le seul organe « bipotentiel ». Cette bipotentialité consiste dans la double capacité de devenir soit un ovaire soit un testicule. Le sexe gonadique, ovaire ou testicule, est déterminé par le sexe génétique (ou chromosomique): XX chez la femelle et XY chez le mâle. Le sexe de la gonade influence, à son tour, le devenir des CG en favorisant leur engagement vers l'ovogénèse, qui consiste dans la différenciation des CG en ovocytes, ou vers la spermatogenèse, qui consiste dans la différenciation des CG en spermatozoïdes.

Au cours de ce chapitre je vais reparcourir les étapes clés de spécification et différenciation des CGP dans le modèle murin. Je vais en outre donner un aperçu de l'influence de l'environnement somatique dans le destin germinal.

I.A.1. Les Cellules Germinales Primordiales

…zoologists realized more than a century ago that, in certain organisms, cells were set aside very early in development to segregate the germ cell lineage from the other, mortal, somatic lineages.
A. McLaren (2003)

Les CGP émergent des cellules pluripotentes au cours des premières phases de développement embryonnaire. Cette détermination de la lignée germinale est accompagnée par une reprogrammation du génome qui préserve les CGP d'une différenciation somatique. Chez de nombreux organismes (*Xénopus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans*) cette détermination germinale est garantie par l'incorporation de déterminants germinaux (protéines, ARN) d'origine maternelle contenus dans le cytoplasme du zygote (plasme germinal) et distribués dans les cellules filles de manière asymétrique (Voir chapitre II.C.1). Chez la souris, la ségrégation des CGP intervient plus tardivement au cours du développement embryonnaire et est déterminée par l'inhibition de gènes somatiques et l'induction de gènes germinaux-spécifiques.

Chez la souris, les CGP dérivent d'un pool d'environ 45 cellules de l'épiblaste proximal. Elles se séparent de la lignée somatique autour de 6,25 jours post-conception (jpc) au voisinage de tissus extra-embryonnaires, à la racine de l'allantoïde (pour revue Bowles & Koopman, 2010; McLaren, 2003) (**Figure 3**). Cette spécification des CGP est le résultat de l'exposition à différents gradients de signaux BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*) dérivant de l'ectoderme et de l'endoderme. En exemple, des mutants déficients pour BMP4 sont dépourvus de CGP. Les CGP sont déterminées par l'expression de deux protéines à domaine PR, PRDM1 (ou BLIMP1)

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 3: De la spécification des Cellules Germinale Primordiales (CGP) à la détermination du sexe. A) Les CGP se spécifient autour de 6,25 jpc, migrent à partir de 7,5 jpc et rejoignent et colonisent les crêtes génitales, futures gonades, entre 10 et 11 jpc. Différents facteurs sont exprimés aux différentes étapes de différenciation des CGP (en rouge). Entre 11,5 et 12,5 jpc les gonades se différencient en ovaires ou en testicules en fonction du sexe génétique (XX ou XY). Dans l'ovaire les cellules germinales DDX4-positives (DDX4+) entrent en méiose et à 14,5 jpc la plupart sont marquées pour STRA8 (STRA8+ ; marqueur préméiotique). Dans le testicule, les cellules germinales AMH-négatives (AMH-) entrent en quiescence et n'expriment pas le marqueur de prolifération Ki67 (Ki67-). Modifié de *Spiller et al. 2017.* **B)** Représentation schématique de la migration des CGP (en rouge). Les CGP se spécifient à la base de l'allantoïde, dans l'espace extra-embryonnaire; elles envahissent le tube digestif en cours de développement, migrent passivement le long de l'intestin postérieur et colonisent les crêtes génitales entre 10 et 11 jpc. Au cours de la migration, les CGP sont soumises à une profonde reprogrammation épigénétique: en particulier, une hypomethylation de l'ADN, une diminution de H3K9me2 et une forte présence de H3K9me3. DNAm ADN méthylé. Modifié de M. De Felici, 2011.

et PRDM14. PRDM1 réprime le programme génétique somatique et réactive l'état de pluripotence dans les CGP (pour revue Saitou, 2009). PRDM14 intervient aussi dans la réactivation de gènes de pluripotence, tels que *Sox2*. En parallèle à l'extinction du programme somatique, PRDM1 et PRDM14 assurent, à partir de 7,25 jpc, l'activation de gènes germinaux-spécifiques, tels *Nanos3, Dnd1* et *Kit.* Un autre facteur de transcription clé dans la détermination des CGP, exprimé à partir de 7,25 jpc jusqu'à 12,5 jpc, est TCFAP2C (ou $AP_2\gamma$) (Weber et al., 2010). Ce facteur contribue à la répression du programme somatique, en particulier de marqueurs mésodermiques. L'importance de PRDM1, PRDM14 et $AP_2\gamma$ est témoignée par le fait que, leur surexpression simultanée, est suffisante pour dériver *in vitro* des CGP, à partir de cellules souches dérivées de l'épiblaste (Nakaki et al., 2013).

Entre 7,5 et 8,5 jpc les CGP migrent de la base de l'allantoïde, dans l'espace extra-embryonnaire, le long de la ligne primitive, un épaississement cellulaire déterminant l'axe longitudinal de l'embryon (pour revue Saitou & Yamaji, 2012) (**Figure 3B**) . Elles envahissent le tube digestif nouvellement formé et elles sont transportées passivement, en suivant des mouvements morphologiques embryonnaires, tout le long de l'intestin postérieur jusqu'au mésentère dorsal, qu'elles rejoignent autour de 9,5 jpc. Elles atteignent les crêtes génitales, futures gonades, à partir de 10 jpc.

Au cours de la migration, à partir de 8,5 jpc, les CGP sont soumises à une profonde reprogrammation épigénétique (pour revue De Felici, 2011; Hackett, Zylicz, & Surani, 2012; Saitou & Yamaji, 2012) (**Figure 3B**). Cette dernière consiste en une déméthylation globale de l'ADN, accompagnée par l'enlèvement des empreintes parentales, la réactivation du chromosome X et une décondensation de la chromatine. En parallèle à l'hypométhylation de l'ADN, les cellules changent leur profil de marques post-traductionnelles (PTM, *Post-Translational Modification*) d'histones: la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me2), modification post-traductionnelle associée généralement à une répression de la transcription, est globalement diminuée, tandis qu'une autre marque répressive, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3), augmente (pour revue Saitou, 2009). Cette modification est médiée par le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Ce dernier est un des deux complexes de la famille *Polycomb* (PRC1 et PRC2) qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression génique au niveau épigénétique.

Entre 10,5 et 11 jpc les CGP colonisent les gonades indifférenciées, appelées crêtes génitales (**Figure 3**). Les CGP subissent alors des changements morphologiques et biologiques majeurs. En effet, elles sont caractérisées par une vaste modification du programme transcriptionnel, avec perte de l'expression de marqueurs clés des CGP, tels *Prdm1* et *Kit,* et l'activation de l'expression de marqueurs déterminants des CG, tels que *Dazl (Deleted In AZoospermia Like)* et *Ddx4 (DEAD-Box Helicase 4).* Les CG deviennent donc compétentes à répondre à l'environnement gonadique et à entamer une voie de différenciation germinale mâle (dans le testicule) ou femelle (dans l'ovaire). *Ddx4* code pour une hélicase à ARN et *Dazl* code pour une protéine de liaison aux ARN (*RNA-binding protein,* RBP). L'invalidation de *Dazl* induit une perte de la compétence germinale à répondre à l'environnement somatique gonadique et à s'engager correctement vers la voie mâle ou femelle; les CG restent donc dans un état indifférencié et meurent rapidement (Haston, Tung, & Reijo Pera, 2009; Lin & Page, 2005 ; pour revue Fu et al., 2015).

Une caractéristique clée des CG à ce stade, est leur capacité à proliférer très rapidement. Elles enchaînent en effet des cycles mitotiques très rapides qui permettent d'augmenter considérablement leur nombre : elles passent d'une centaine (8,5 jpc) à environ 25000 CG à 13,5 jpc (Tam & Snow, 1981).

Après la colonisation des crêtes génitales, les signaux somatiques jouent un rôle clé dans la différenciation des CG. En effet, le destin de ces dernières est influencé par l'environnement gonadique dans lequel elles se situent (I. R. Adams & McLaren, 2002). Dans le testicule, elles sortent progressivement du cycle mitotique pour entrer en quiescence (arrêt en G0/G1) entre 12,5 et 15,5 jpc. Cet état de quiescence est accompagné par la perte de marqueurs de pluripotence (*Sox2, Nanog, Dppa2*) et persiste jusqu'à la naissance, quand elles recommencent à proliférer et entament la spermatogenèse de manière cyclique. Dans l'ovaire, les CG entrent en méiose entre 13,5 et 15,5 jpc. Elles complètent la prophase I méiotique et s'arrêtent au stade diplotène entre 18,5 et 19,5 jpc, juste avant la naissance. L'importance de l'environnement somatique dans la détermination sexuelle des CG a été mis en évidence grâce à des expériences de culture d'agrégats cellulaires (I. R. Adams & McLaren, 2002). En effet, les CG XY encore indifférenciées (11,5 jpc) acquièrent la capacité d'entrer en méiose dans un environnement ovarien et, à l'inverse, les CG XX (11,5 jpc ainsi que 12,5 jpc) entrent en quiescence dans un environnement testiculaire.

Une autre différence majeure, entre les CG ovariennes et testiculaires, est leur état de méthylation. Nous avons vu précédemment que, au cours de la migration, les CGP subissent une déméthylation globale de l'ADN (De Felici, 2011). Dans l'ovaire fœtal, les CG entrent en méiose en maintenant cet état d'hypométhylation. La reméthylation de l'ADN n'a lieu qu'après la naissance, dans les ovocytes arrêtés au stade diplotène. En revanche, dans le testicule, les CG quiescentes subissent une méthylation « de novo » progressive à partir de 14,5 jpc, grâce à l'activité des méthyltransférases DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C et du facteur accessoire DNMT3L (Barau et al., 2016; Bestor, 2004; Kato et al., 2007). Dans les testicules postnataux, les CG entrent donc en méiose après la reméthylation de l'ADN, contrairement aux CG fœtales femelles. Cette reméthylation de l'ADN est indispensable pour la survie et le développement des CG mâles. L'invalidation de *Dnmt3L*, ainsi que *Dnmt3c*, est associée à une réactivation aberrante des rétrotransposons (Barau et al., 2016; Bestor, 2004); DNMT3A et DNMT3B sont impliquées dans la méthylation de gènes soumis à empreinte parentale (Kato et al., 2007).

I.A.2. L'environnement somatique

Les gonades se développent à la surface du mésonéphros, le rein intermédiaire. Elles sont dites bipotentielles car elles ont la double potentialité de se différencier soit en ovaire soit en testicule entre 10,5 et 11,5 jpc. Leur différenciation est déterminée par le sexe génétique, ou chromosomique (XX ou XY), de l'individu. En effet, en fonction du sexe génétique, les cellules somatiques expriment des facteurs pro-ovariens ou pro-testiculaires. Le déterminisme génétique mâle a été largement étudié et se base principalement sur l'activation de l'expression de *Sex determining region of the* Y (*Sry*), gène situé sur le chromosome Y, entre 10,5jpc et 12,5jpc (pour revue Carré & Greenfield, 2014). *Sry*, en partenariat avec le facteur *Steroidogenic Factor 1* (SF1) induit l'expression du facteur de transcription *Sry-related HMG box9* (*Sox9*). SOX9 agit à différents niveaux, en favorisant la différenciation des précurseurs somatiques épithéliaux en cellules de Sertoli et en

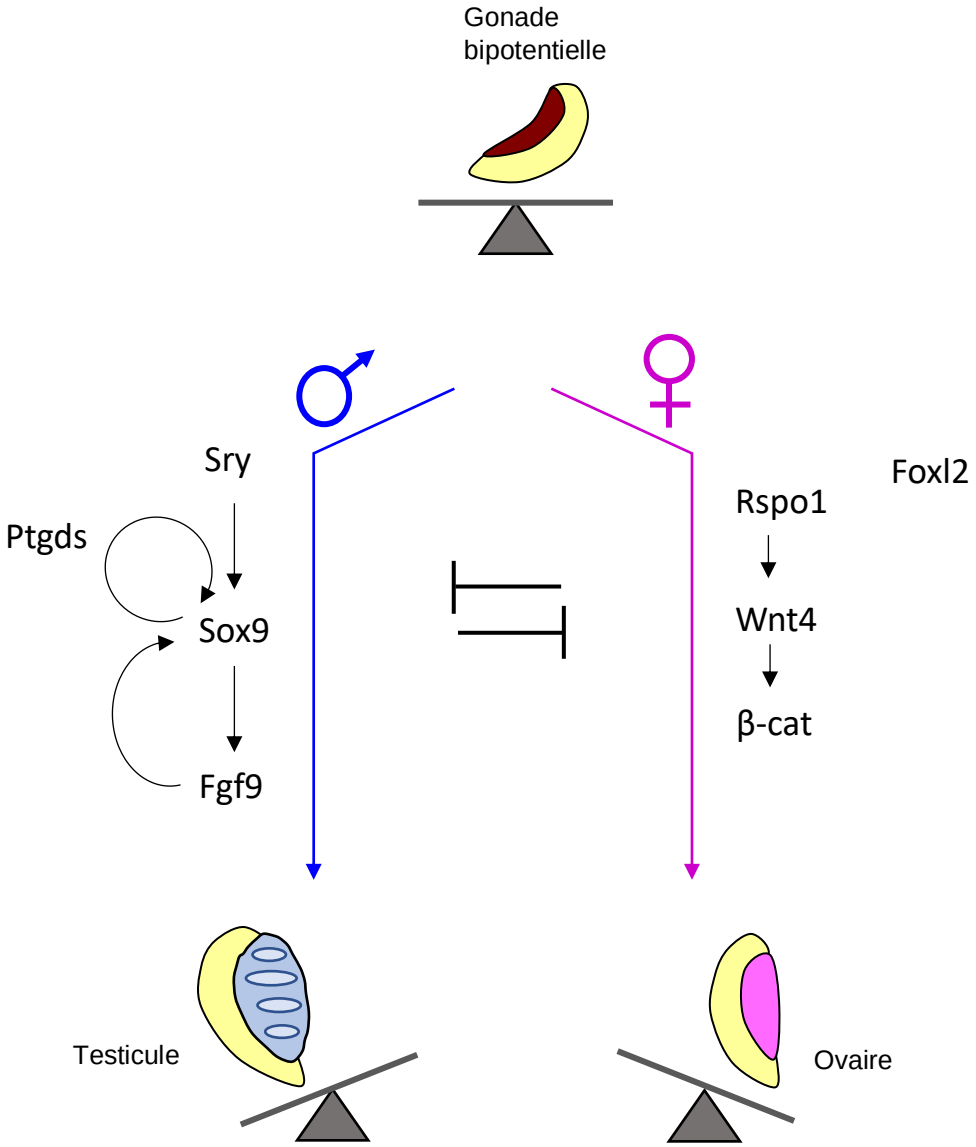


Figure 4: Interactions entre les voies de détermination testiculaire et ovarienne en vie fœtale. Dans les gonades bipotentielles les voies de différenciation mâle et femelle sont en équilibre. L'activation de la voie mâle (Sry/Sox9) fait pencher la balance vers la différenciation testiculaire, tandis que l'activation de la voie femelle (Rspo1/Wnt4 et Foxl2) fait pencher la balance vers la différenciation ovarienne. Inspiré de *Di Napoli and Capel, 2008.*

activant l'expression de l'hormone antimüllérienne (AMH, Anti-Mullerian Hormone) ainsi nommée car elle permet la régression des canaux de Müller, les précurseurs, chez la femelle, de l'utérus, l'oviducte et d'une partie du vagin. L'expression de *Sox9* est amplifiée par le facteur sertolien *Fibroblast Growth Factor* (FGF9) (Colvin, Green, Schmahl, Capel, & Ornitz, 2001) et par la prostaglandine D2 (Moniot et al., 2009). Les cellules des Sertoli orchestrent la différenciation des autres types cellulaires testiculaires, dont les cellules de Leydig, qui se différencient autour de 13 jpc. Ces dernières synthétisent la testostérone, qui favorise le maintien des canaux de Wolf, à l'origine de l'épididyme, des canaux déférents et des vésicules séminales chez le mâle.

Les cellules somatiques permettent donc de différencier le sexe de la gonade et de créer une niche qui impose la différenciation des CG en accord avec le sexe gonadique.

La plupart des gènes impliqués dans la différenciation testiculaire ont été identifiés chez l'homme grâce à des pathologies d'inversion sexuelle, appelées DSD (*Disorders of Sex Development*). Pendant longtemps la voie femelle a été considérée comme une voie « par défaut »: en absence du chromosome Y, et donc de l'expression de *Sry*, la gonade s'engage vers un destin ovarien. Cependant, un premier facteur déterminant de la voie femelle a été identifié chez une chèvre XX sans cornes mais ayant des testicules. Cette inversion du sexe gonadique a été reliée à la mutation du gène *Forkhead box family L2* (*Foxl2*) (Crisponi et al., 2001; Pailhoux et al., 2001). Depuis, d'autres déterminants de la voie femelle ont été identifiés, tels *R-spondin homolog 1* (*Rspo-1*) et *Wingless integrator site 4* (*Wnt4*) (Chassot et al., 2008; Maatouk et al., 2008) (pour revue (Pannetier, Chassot, Chaboissier, & Pailhoux, 2016) (**Figure 4).**

La différenciation des gonades en testicules ou ovaires se base donc sur un « jeu d'inhibitions » entre les déterminants de la voie mâle et de la voie femelle. A l'état bipotentiel, les gonades XX et XY expriment un programme génique quasi-identique (à l'exception des chromosomes sexuels), avec un équilibre instauré entre les facteurs pro-ovariens et pro-testiculaires. Entre 11,5 et 12,5 jpc, au moment de la différenciation gonadique, le programme transcriptionnel change brutalement et montre une dichotomie sexuelle. Chez le mâle, l'expression de *Sry* fait pencher la balance en faveur d'une surexpression de facteurs pro-testiculaires. Parallèlement, les facteurs pro-ovariens sont réprimés. Chez la femelle, au contraire, *Wnt4* est surexprimé et régule positivement les facteurs pro-ovariens tandis qu'il réprime l'expression des facteurs pro-testiculaires (pour revue Capel, 2017).

I.B. Régulation de l'entrée en méiose

Nous avons vu que les CG entrent en méiose en vie fœtale chez la femelle, autour de 13,5 jpc, tandis que chez le mâle, au même moment, elles sortent du cycle cellulaire et entrent en méiose cycliquement, en vie postnatale.

Mais qu'est-ce-que l'entrée en méiose?

Les CG doivent passer de l'état mitotique à l'état méiotique; cela implique une **reprogrammation** du génome pour assurer l'expression de facteurs clés au bon déroulement méiotique. L'entrée en méiose consiste donc dans ce passage brutal du programme transcriptionnel mitotique au programme transcriptionnel méiotique.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 5: Métabolisme de l'Acide Rétinoïque. La Vitamine A (vitA) est fournie par la circulation sanguine. La vitA peut être transportée via la liaison aux protéines RBP (*Retinol Binding Protein*). Dans les cellules, la vitA peut être convertie en Acide Rétinoïque (ATRA, *All-Trans Retnoic Acid*) par deux étapes d'oxydation séquentielles. La première, oxyde la vitA en retinaldehyde (RAL) et est catalysée par les enzymes *cytosolic alcohol dehydrogenases* (ADHs) et *retinol dehydrogenases* (RDHs). Le RAL est oxydée en Acide Rétinoïque par les enzymes *RAL dehydrogenases* (RALDH1,2 et 3). La dégradation de l'Acide Rétinoïque par hydroxylation est catalysée par les enzymes CYP26 (CYP26A1, B1, C1). La signalisation de l'Acide rétinoïque passe par les récepteurs RAR (RARA, B et G) qui agissent en hétérodimères avec les récepteurs RXR (RXRA, B et G) pour activer l'expression de gènes cibles ayant des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) dans le promoteur. Tiré de *Teletin et al. 2017*

Cette reprogrammation est complexe, puisqu'elle nécessite l'extinction de nombreux gènes mitotiques tout en en assurant la conservation de certains ; parallèlement, les gènes méiotiques doivent être allumés.

Quels facteurs/signaux permettent cette régulation? Et comment ces régulateurs permettent-ils d'induire la méiose de manière dichotomique, chez la femelle en vie fœtale et chez le mâle après la naissance?

La différence d'environnement gonadique, ovarien ou testiculaire, est à la base de cette **dichotomie** mâle/femelle. L'**Acide Rétinoïque** (AR) est proposé, à l'heure actuelle, comme l'activateur clé de l'entrée en méiose chez la femelle et chez le mâle. En vie fœtale, l'AR, synthétisé en grande partie par le mésonéphros et dans une faible mesure par l'ovaire, induirait la méiose chez la femelle. En revanche, chez le mâle, le *Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1* (CYP26B1), une enzyme de dégradation de l'AR, est produite par les cellules de Sertoli en vie fœtale et empêcherait l'action de l'AR sur les CG**.**

Dans ce chapitre, je vais tout d'abord replacer le rôle de l'AR dans l'entrée en méiose, en me focalisant spécifiquement sur son rôle en vie fœtale. Je vais par la suite présenter les facteurs intrinsèques, connus à l'heure actuelle, régulant la transition mitose/méiose.

Le rôle de l'AR dans la méiose mâle sera abordé dans le chapitre suivant (I.C. *La spermatogenèse*) pour une meilleure compréhension.

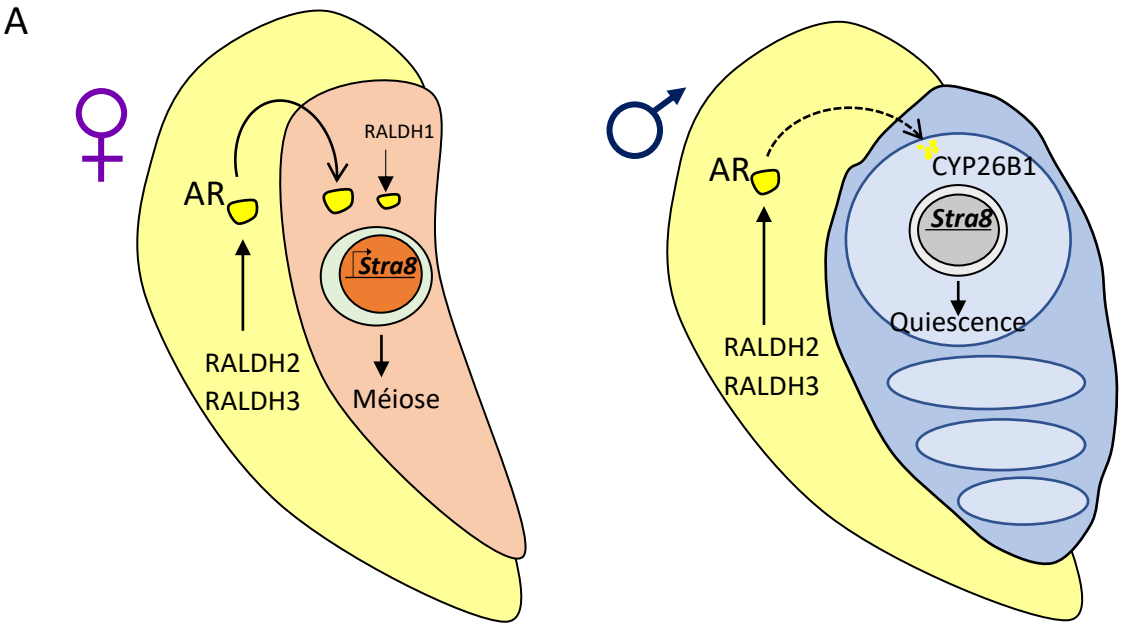
I.B.1. Métabolisme de l'Acide Rétinoïque

L'AR est un dérivé de la Vitamine A (ou rétinol) indispensable pour un développement embryonnaire correct. Le métabolisme de l'AR doit être finement régulé, avec un bon équilibre entre sa biosynthèse et sa dégradation, pour assurer sa disponibilité (au bon moment et en quantité optimale) (pour revue Duester, 2008; Rhinn & Dollé, 2012) (**Figure 5).**

La conversion du rétinol en AR nécessite deux étapes d'oxydation séquentielles. Une première oxydation permet la conversion du rétinol en rétinaldéhyde et est catalysée par les enzymes *cytosolic alcohol dehydrogenases* (ADHs) et *retinol dehydrogenases* (RDHs). La deuxième oxydation convertit la rétinaldéhyde en AR via les enzymes *retinaldehyde dehydrogenase* (RALDH1, RALDH2 et RALDH3), encodées par les gènes *Aldh1a1, Aldh1a2 et Aldh1a3* respectivement.

La dégradation de l'AR est catalysée par les enzymes de la famille 26 des cytochromes P450 (CYP26) qui le convertissent en des métabolites polaires (*4-hydroxy retinoic acid, 4-oxo reinoic acid, 18-hydroxy retinoic acid*). Trois enzymes CYP26 ont été identifiées (CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1). Les trois enzymes montrent des patterns d'expression différents et leur activité catalytique n'est pas identique (Topletz et al., 2013). *Topletz et al.* décrivent une activité catalytique de CYP26A1 jusqu'à 10 fois supérieure à celle de CYP26B1.

L'AR agit, souvent de manière paracrine, via sa liaison aux récepteurs nucléaires *Retinoic Acid Receptors alpha, beta et gamma* (RARalpha, RARbeta et RARgamma) qui constituent des régulateurs transcriptionnels ligand-dépendants. Ces récepteurs agissent en hétérodimères avec les récepteurs *Retinoid X Receptors alpha, beta et gamma* (RXRalpha, RXRbeta et RXRgamma). Les hétérodimères RAR-RXR lient l'ADN au niveau de motifs consensus : les éléments de réponse à l'AR (RARE, *Retinoic Acid Response Element*), situés



Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 6: Modèle du rôle de l'Acide Rétinoïque (AR) dans la régulation dichotomique de l'entrée en méiose. A) L'AR est synthétisé principalement dans le mésonéphros adjacent aux gonades et minoritairement dans l'ovaire fœtal. L'AR est transporté dans la gonade, où il induit l'expression de STRA8 dans les CG ovariennes (*Stra8* ON). STRA8 induit à son tour l'entrée en méiose. Dans le testicule, CYP26B1, exprimé par les cellules de Sertoli, métabolise l'AR en empêchant son action sur les CG. Les CG s'engagent alors vers le destin mâle et entrent en quiescence. **B)** Activité β-galactosidase dans les gonades fœtales à 12,5 13,5 et 14,5 jpc (RARE-LacZ) : l'AR est actif dans le mésonéphros des deux sexes. À 13,5 jpc une activité commence à être détectable dans la partie antérieure de la gonade et à 14,5 jpc on détecte un marquage RARE-LacZ dans tout l'ovaire. M = mâle, testicule; F = femelle, ovaire. Tiré de *Bowles et al., 2006* **C)** Détection par hybridation *in situ* de *Stra8* (à gauche) et *Cyp26b1* (à droite) à 12,5 et 13,5 jpc. *Stra8* commence à apparaître à 12,5 jpc dans la partie antérieure de l'ovaire; à 13,5 jpc *Stra8* est exprimé uniformément dans l'ovaire mais aucun marquage est détecté dans le testicule. Au contraire, *Cyp26b1* est exprimé spécifiquement dans le testicule fœtal à 12,5 et 13,5 jpc. M = mâle, testicule; F = femelle, ovaire. Tiré de *Bowles et al., 2006*

dans les régions régulatrices des gènes cibles. L'AR active l'expression de nombreux gènes, entre autres *Stimulated by retinoic acid, gene 8 (Stra8),* un facteur clé de l'entrée en méiose. De manière intéressante, des gènes codant pour des facteurs impliqués dans le métabolisme ou la signalisation de l'AR, tels que *Cyp26a1, Cyp26b1* et *Rarβ* sont eux-mêmes régulés positivement par l'AR. Ce feedback positif assure un contrôle plus fin du niveau d'AR disponible dans les différents tissus et protège les cellules d'une surstimulation ou bien d'une carence en AR.

I.B.2. Rôle de l'AR dans l'entrée en méiose

a) Modèle qui prévaut

Indépendamment de leur sexe génétique (XX ou XY), les CG compétentes (DAZL-positives) initient la méiose et entament la différenciation ovocytaire dans un environnement ovarien, tandis qu'elles arrêtent le cycle cellulaire en G0/G1 dans un environnement testiculaire (I. R. Adams & McLaren, 2002; Guerquin et al., 2010). L'environnement somatique des gonades fœtales est donc à la base de l'engagement des CG vers un destin femelle ou mâle. Ceci intervient tôt chez le mâle, car les CG XY sont déjà spécifiées à 12,5 jpc, en ayant perdu leur capacité à entrer en méiose dans un environnement ovarien. En revanche, les CG XX maintiennent la capacité à s'engager vers la voie mâle (quiescence) jusqu'à 12,5 jpc, signe d'une spécification vers la voie femelle plus tardive.

Sur ces bases, il a été historiquement proposé l'existence d'un facteur **MIS** (*Meiotic Inducing Substance*) dans l'ovaire fœtal, capable d'induire l'entrée en méiose des CG. En revanche, dans le testicule fœtal, un facteur **MPF** (*Meiotic Preventing Factor*) permettrait de contrebalancer l'activité du MIS et de prévenir l'entrée en méiose des CG mâles. L'**AR** semblerait être le bon candidat en tant que MIS. En effet, une enzyme de biosynthèse de l'AR, RALDH2, a été détectée au niveau du mésonéphros, rein primitif adjacent aux gonades, à partir de 10,5 jpc (Bowles et al., 2006), en amont de l'initiation méiotique. L'activité de l'AR a été détectée, grâce à une souris transgénique RARE-LacZ, dans le mésonéphros adjacent aux gonades des deux sexes (ovaires et testicules), et dans les ovaires à partir de 13,5jpc (**Figure 6B)**. En outre, les trois récepteurs de l'AR, RARalpha, RARbeta et RARgamma, sont exprimés dans les CG fœtales (Koubova et al., 2006). Selon le modèle qui prédomine à l'heure actuelle, l'AR induirait donc dans les CG l'expression de ses gènes cibles, ayant au moins un élément de réponse RARE au niveau de leur promoteur. En particulier, l'AR activerait l'expression de *Stimulated by retinoic acid, gene 8 (**Stra8**)*, un facteur de transcription jouant un rôle clé dans la régulation de l'entrée en méiose (Voir paragraphe a du chapitre suivant I.B.3 *Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose*).

Bien que l'AR soit synthétisé aussi au niveau du mésonéphros adjacent aux testicules fœtaux, aucune activité RARE-LacZ n'est détectée dans ces derniers. À partir de 11,5 jpc, parallèlement à l'expression de l'AR, on détecte l'expression de **CYP26B1** dans les testicules fœtaux, tandis que cette enzyme est indétectable dans l'ovaire fœtal (**Figure 6B**). Plus précisément, CYP26B1 est exprimé dans les cellules de Sertoli et a été proposé en tant qu'enzyme responsable de la dégradation de l'AR dans les testicules fœtaux. L'invalidation de *Cyp26b1* induit l'activation ectopique de *Stra8* et d'autres facteurs méiotiques, tels *Sycp3* (*Synaptonemal Complexe 3*), dans les testicules fœtaux murins (Bowles et al., 2006). Des expériences supplémentaires ont montré que la culture de testicules fœtaux avec un inhibiteur de CYP26B1, le ketokonazole, active l'expression

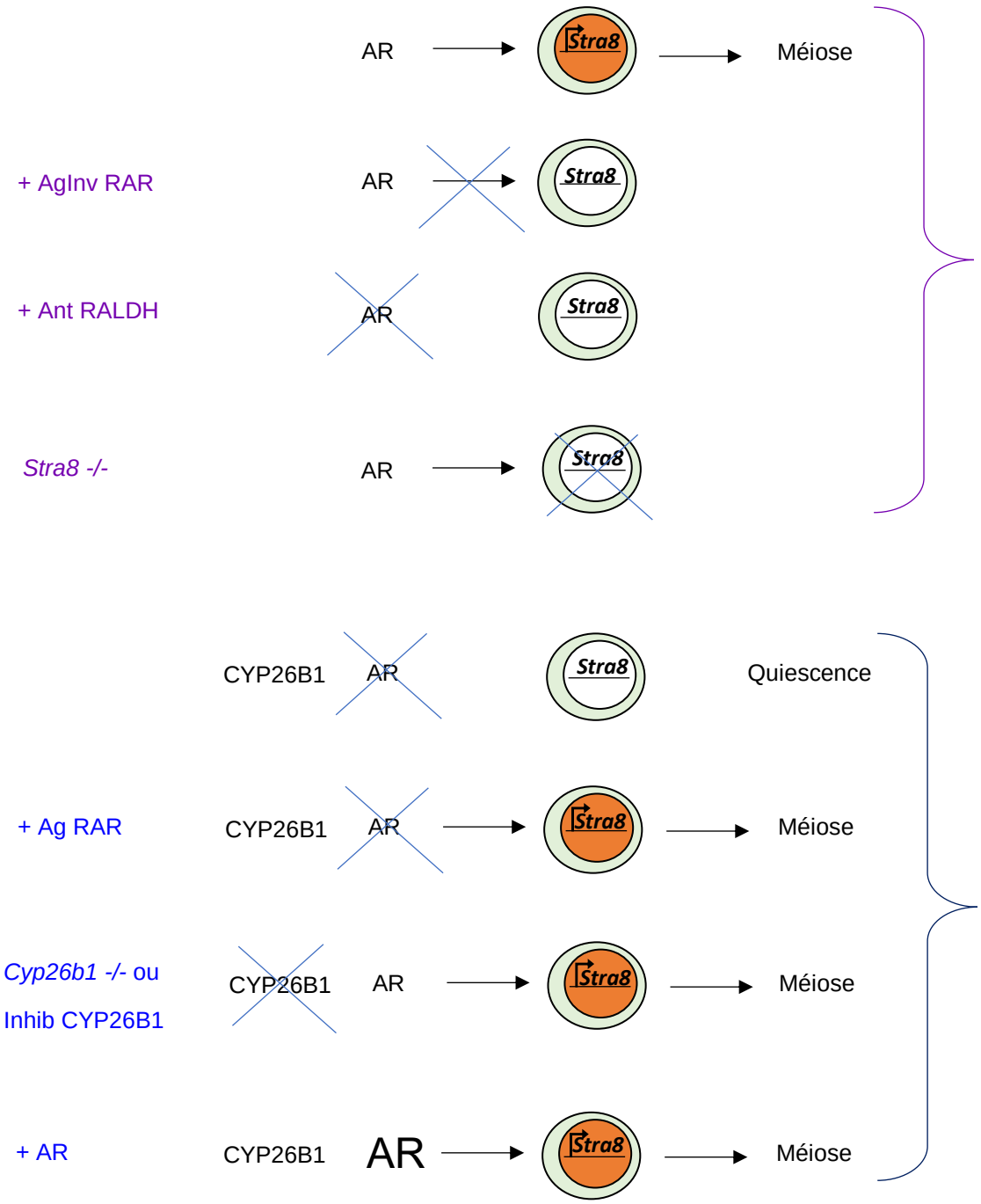


Figure 7: Schéma synthétisant les effets des différents traitements *in vitro* et des modèles génétiques existants, sur l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose dans les gonades fœtales murines. AgInv = Agoniste Inverse ; Ant = Antagoniste ; Ag = Agoniste ; Inhib = Inhibiteur. Ov = Ovaire ; Te = Testicule. Informations tirées d'après *Bowles et al. 2006* , *Koubova et al. 2006 ; MacLean et al. 2007* ; revue *Griswold et al. 2012*.

de *Stra8* dans les CG. En outre, l'ajout en culture d'un agoniste inverse des récepteurs RAR prévient l'effet du ketokonazole sur l'activation de *Stra8* (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). De manière similaire, la culture d'ovaires fœtaux avec des agonistes inverses des RAR ou des inhibiteurs des RALDH, inhibe l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Des expériences complémentaires de culture de gonades fœtales ont soutenu le rôle de l'AR dans l'initiation de la méiose: l'expression de *Stra8* et de facteurs méiotiques (*Sycp3, Dmc1*) est détectée dans les testicules fœtaux après leur culture en présence d'AR (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Une dose très faible d'AR (1nM) semblerait suffisante à induire l'expression de *Stra8* de CG purifiées en culture (Tedesco, Desimio, Klinger, De Felici, & Farini, 2013). En outre, l'analyse d'ovaires fœtaux provenant de rats carencés en Vitamine A, montre une diminution de l'expression de *Stra8* dans les ovaires carencés ainsi qu'une diminution du nombre des cellules méiotiques (Li & Clagett-Dame, 2009). Cela suggère que l'AR n'est pas juste capable d'induire la méiose de CG compétentes, mais qu'il est aussi nécessaire, *in vivo*, pour l'induction de ces dernières.

Dans l'ensemble, ces données sembleraient valider le modèle du rôle de l'AR dans la régulation dichotomique de l'entrée en méiose en vie fœtale. Ce modèle est schématisé en **Figure 6**: l'AR synthétisé principalement dans le mésonéphros induit *Stra8* dans l'ovaire; en revanche, il est métabolisé par CYP26B1 dans le testicule. Les effets des différents traitements *in vitro* ou des modèles génétiques (*Stra8 -/-* et *Cyp26b1 -/-*) sont schématisés en **Figure 7**.

b) Remise en question du rôle de l'AR

La fonction de CYP26B1 en tant qu'inhibiteur de l'entrée en méiose dans les testicules fœtaux et le rôle clé de *Stra8* dans l'initiation méiotique constituent une certitude. En effet, des modèles transgéniques d'invalidation de ces facteurs chez la souris, ont permis d'analyser soigneusement leur effet sur l'initiation méiotique (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006; MacLean, Li, Metzger, Chambon, & Petkovich, 2007; Mark et al., 2008; Saba, Wu, & Saga, 2014). Cependant, le rôle de l'AR a été récemment remis en question. En effet, l'invalidation de deux enzymes de biosynthèse de l'AR, *Aldh1a2* et *Aldh1a3*, ne prévient pas l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose des CG dans les ovaires fœtaux (Kumar et al., 2011). En outre, malgré l'augmentation de l'expression de *Stra8* dans les testicules fœtaux cultivés en présence d'AR, seulement une minorité de cellules démarrent le processus méiotique (Trautmann et al., 2008). Ces rares CG qui initient la méiose par suite d'une activation ectopique de l'AR rentrent rapidement en apoptose au cours de la prophase I, ce qui suggère que l'AR n'est pas suffisant pour initier correctement la méiose.

L'hypothèse que l'AR ne soit pas impliqué dans l'induction de *Stra8* n'est pas en désaccord avec le rôle certain de CYP26B1 dans les testicules fœtaux. CYP26B1 pourrait, en effet, prévenir l'expression de *Stra8* et/ou induire la différenciation mâle dans les testicules fœtaux indépendamment de l'AR (Kumar et al., 2011). Pour ce qui concerne l'activation de l'expression de *Stra8,* celle-ci n'est pas forcement dépendante de l'AR. En effet, d'autres facteurs, intrinsèques aux CG, ont été identifiés comme régulateurs de l'expression de *Stra8* (Voir chapitre suivant I.B.3. *Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose*).

L'aspect le plus difficile à réconcilier avec cette remise en question du rôle de l'AR est le fait que l'inhibition des RAR ou RALDH, ou l'activation des RAR, respectivement inhibent et activent *Stra8*. Cependant, ces expériences se basent sur des modèles de culture organotypique (traitements chimiques) et il manque, à

l'heure actuelle, une démonstration génétique du rôle de l'AR endogène dans l'induction de la méiose (Voir la discussion).

I.B.3. Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose

Les destins différents des CG en vie fœtale dans les deux sexes, impliquent une modification dichotomique de leur programme transcriptionnel. Dans les ovaires, les CG vont exprimer des facteurs pro-méiotiques, tels *Stra8,* considéré comme étant le facteur clé de l'entrée en méiose. La régulation de son expression par l'AR est controversée. Cependant, d'autres facteurs intrinsèques aux CG sont capables de moduler et maintenir son expression*:* DMRT1, MSX1/MSX2, PRC1. Ces facteurs sont indispensables pour l'induction correcte de la méiose. Dans les testicules fœtaux CYP26B1 joue un rôle clé dans l'inhibition paracrine de la méiose. D'autres facteurs dans les CG testiculaires s'opposent à l'induction du programme méiotique et stimulent leur entrée en quiescence : *Nanos2 et Nodal.*

a) Stra8

Le gène *Stra8* a été identifié en 1996 en tant que gène cible de l'AR dans la lignée de cellules cancéreuses embryonnaires P19 (Oulad-Abdelghani et al., 1996). *Stra8* est conservé chez les vertébrés, bien qu'il soit absent chez certains poissons. *Stra8* est exprimé, de manière transitoire, en phase S préméiotique (stade préleptotène) dans l'ovaire fœtal et dans le testicule postnatal.

STRA8 est considéré comme le gardien (*Gatekeeper*) de l'entrée en méiose, en raison de son rôle dans la régulation de la transition mitose/méiose. Des modèles murins d'invalidation de *Stra8* ont mis en évidence son rôle clé dans l'induction méiotique. En 2006, *Baltus et al.* montrent un blocage de la différenciation des CG femelles au stade préleptotène, avec une absence de cellules en méiose, dans des ovaires fœtaux *Stra8 -/-* en fond C57BL/6 (Baltus et al., 2006). Grâce à des analyses cytométriques, les auteurs montrent l'absence de CG 4n dans des ovaires *Stra8 -/-* à 14,5 et 15,5 jpc, signe que l'ADN ne s'est pas répliqué. Les auteurs démontrent ainsi que STRA8 est nécessaire à la réplication de l'ADN préméiotique. La même équipe montre, en 2008, que l'absence de *Stra8* induit des défauts de transition mitose/méiose chez les mâles en fond C57BL/6 (Anderson et al., 2008). Ils décrivent ainsi une absence complète de CG en méiose. Chez le male, à la différence de la femelle, ils montrent que les cellules *Stra8 -/-* bloquées au stade préleptotène incorporent la *BromodeoxyUridine* (BrdU), un analogue de la thymidine, signe que la réplication de l'ADN préméiotique a lieu. La même année, Mark et al. étudient les effets de l'invalidation de *Stra8* chez des souris mâles en fond mixte C57BL/6 (50%) 129/Sv (50%) (Mark et al., 2008). Différemment de l'étude précédente, ils observent des CG qui arrivent à initier la méiose, malgré un blocage précoce suivi par leur mort par apoptose.

En dépit de la démonstration de son rôle dans l'initiation méiotique, la fonction moléculaire de STRA8 est restée inconnue pendant longtemps. En 2009, Tedesco et al. décrivent une capacité de liaison à l'ADN et d'activité transcriptionnelle de STRA8 *in vitro* (Tedesco, La Sala, Barbagallo, De Felici, & Farini, 2009a). En outre, ils ont montré que STRA8 est capable de transiter du noyau au cytoplasme et *vice-versa*, grâce à des motifs de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localisation Sequence*) et d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Sequence*). Récemment, en 2019, le rôle de STRA8 en tant que **facteur de transcription** a été

confirmé *in vivo* (M. L. Kojima et al., 2019) : une analyse par *Chip-Seq* a montré que STRA8 peut directement lier les promoteurs de nombreux gènes cibles et activer ainsi le programme méiotique.

De manière intéressante, une étude indépendante, publiée en 2019, a démontré un lien entre l'inhibition de l'autophagie et la régulation de l'entrée en méiose par STRA8 (Ferder et al., 2019). L'inhibition de l'autophagie chez des souris mâles *Stra8 -/-* en fond C57BL/6 (blocage préméiotique), permet un sauvetage des CG du blocage préméiotique ; les cellules progressent alors en prophase I mais elles meurent avant de compléter celle-ci.

En conclusion, STRA8 est un régulateur clé de l'entrée en méiose dans l'ovaire fœtal et le testicule postnatal. Son rôle de gardien méiotique a été démontré par des modèles murins transgéniques. Des études récentes démontrent une fonction de STRA8 en tant que de facteur de transcription. D'un côté il a une action directe sur la régulation transcriptionnelle en amplifiant un programme méiotique préexistant. De l'autre côté, il réprime des gènes d'autophagie en assurant ainsi indirectement l'entrée en méiose des CG.

b) Les autres facteurs

L'entrée en méiose tourne autour de la reprogrammation génétique des CG. Il est donc peu surprenant que les principaux régulateurs de la transition mitose/méiose soient des facteurs transcriptionnels ou post-transcriptionnels capables de réguler l'expression des programmes géniques. Le gène *Doublesex ad mab-3 related transcription factor 1* (*Dmrt1)* code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'entrée en méiose en vie fœtale chez la femelle et en vie postnatale chez le mâle. Son invalidation induit un retard d'entrée en méiose et une diminution de l'expression de *Stra8* dans les ovaires fœtaux. En effet, DMRT1 est capable de lier directement le promoteur de *Stra8* en régulant son expression. De manière contradictoire, l'invalidation conditionnelle de *Dmrt1* dans les testicules postnataux, où il est exprimé dans les spermatogonies indifférenciées et en début de différenciation, induit une augmentation de l'expression de *Stra8* (Krentz et al., 2011; Matson et al., 2010; Zarkower, 2013). Un autre membre de la famille des gènes à domaine DM, *Dmrt6,* est impliqué dans la régulation de la transition mitose/méiose spécifiquement chez le mâle en vie postnatale (T. Zhang, Murphy, Gearhart, Bardwell, & Zarkower, 2014). *Dmrt6* est, en effet, exprimé dans les spermatogonies en différenciation. Son invalidation induit un blocage aux premiers stades de la méiose, dû à des dérégulations du programme transcriptionnel : une surexpression du programme mitotique et une inhibition du programme méiotique.

Deux gènes de la famille *homeobox msh-like (Msx), Msx1* et *Msx2,* sont surexprimés dans les ovaires fœtaux au moment de l'entrée en méiose. *Msx1* et *Msx2* codent pour des facteurs de transcription et leur double invalidation cause des défauts d'entrée en méiose, avec une diminution de l'expression de *Stra8* et d'autres facteurs méiotiques (*Sycp3*) dans une fraction des CG (Le Bouffant et al., 2011). Ces facteurs MSX peuvent directement lier le promoteur de *Stra8* et moduler/amplifier son expression.

L'état épigénétique de la chromatine joue aussi un rôle clé dans l'entrée en méiose. Le complexe *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) agit en tant que répresseur transcriptionnel en modifiant l'état chromatinien via la mono-ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 (H2AK119u1). Il est exprimé avant l'entrée en méiose et l'invalidation d'une de ces sous-unités, RNF1, induit une expression prématurée de *Stra8* et d'autres gènes méiotiques (tels que *Rec8, Sycp3)* dans les CG femelles en vie fœtale (Yokobayashi et al., 2013). Un autre complexe Polycomb, PRC2, agit sur l'état chromatinien en enrichissant le promoteur de *Stra8* de marques

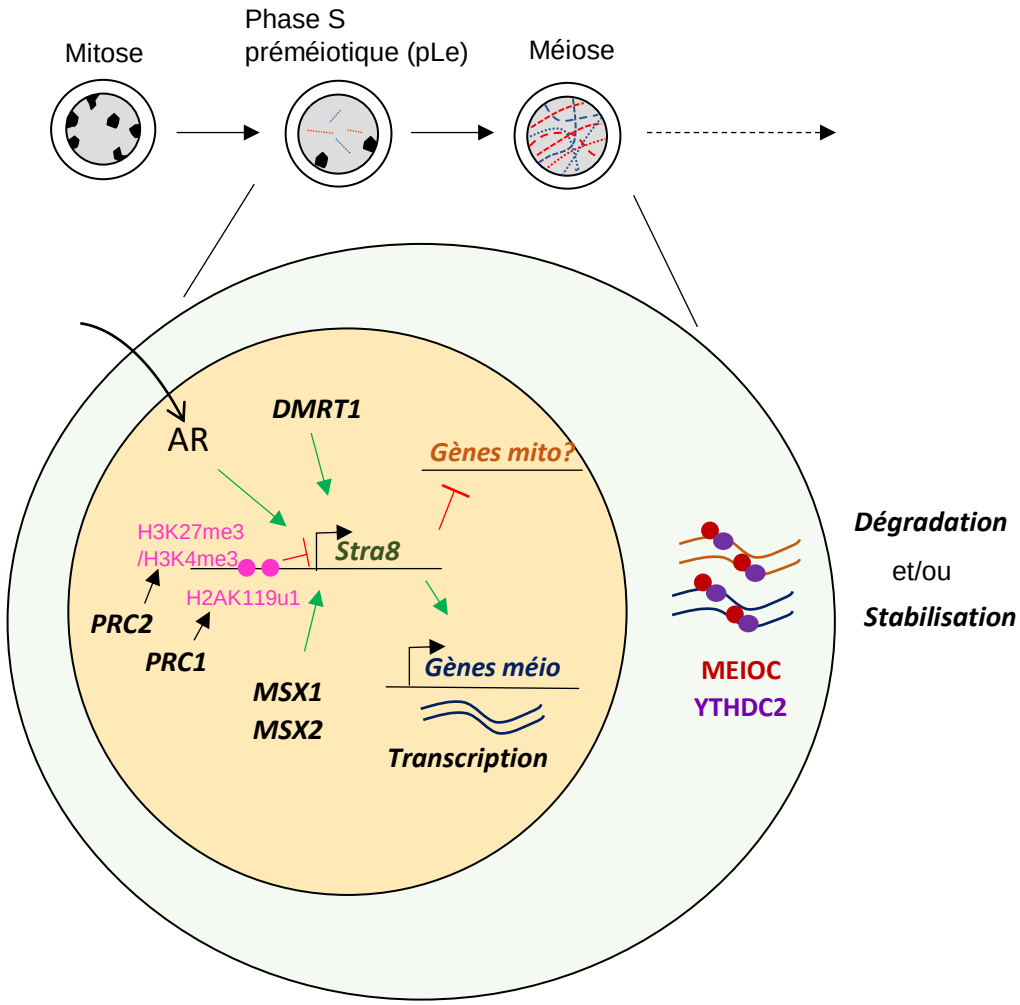


Figure 8: Représentation des différents facteurs jouant un rôle dans l'initiation méiotique. STRA8 est un facteur de transcription qui active l'expression de gènes méiotiques (méio) et inhiberait l'expression de gènes mitotiques (mito?). L'expression de *Stra8* dans les cellules germinales est régulée par différents facteurs: les complexes PRC (PRC1 et PRC2) régulent l'état épigénétique de *Stra8* en prévenant son expression prématurée; l'Acide Rétinoïque (AR), DMRT1 et MSX (MSX1 et MSX2) activent et amplifient l'expression de *Stra8*. Dans le cytoplasme, les partenaires MEIOC et YTHDC2 lient les ARN et les régulent au niveau post-transcriptionnel en activant leur dégradation et/ou leur stabilisation.

répressives, H3K27me3, et activatrices, H3K4me3, préalablement à l'entrée en méiose. La concomitance d'une marque répressive et d'une marque activatrice au niveau d'un promoteur, assure un « état bivalent »: le promoteur est maintenu dans un état inactif mais il est prêt à répondre pour son activation rapide.

Parallèlement, dans le testicule fœtal, des facteurs inhibent la méiose pour assurer une différenciation mâle. La voie Nodal/Smad2 est active spécifiquement dans les CG des testicules fœtaux entre 12,5 et 14,5 jpc. Nodal fait partie de la superfamille TGFβ (*Transforming Growth Factor beta*) et active les facteurs de transcription SMAD. La répression de cette voie par un agent pharmacologique induit une expression aberrante de facteurs méiotiques (*Stra8, Rec8, Dmc1, Sycp3*) (Souquet et al., 2012; Wu et al., 2013). *Nanos2* est une *RNA-binding protein,* exprimée dans les testicules fœtaux à partir de 13,5 jpc, au moment de l'entrée en quiescence, sous la stimulation de FGF9. *Nanos2* prévient l'activation du programme méiotique en séquestrant des ARN méiotiques, tels *Stra8* et *Sycp3,* pour les envoyer à la dégradation dans les P-bodies (Barrios et al., 2010; Suzuki, Igarashi, Aisaki, Kanno, & Saga, 2010). *Nanos2* est suffisant à induire le destin mâle car sa surexpression dans des CG XX prévient la méiose et induit l'expression de marqueurs mâles, tel DNMT3L (Suzuki & Saga, 2008).

Ces différents facteurs agissent à différents niveaux pour un même objectif : réguler le programme transcriptionnel méiotique au bon moment et au bon endroit : il faut inhiber l'expression prématurée du programme méiotique (PRC1 et PRC2), induire son expression (*Dmrt1*) et la maintenir (*Msx1/2*).

c) Complexe MEIOC/YTHDC2

Deux autres facteurs jouent un rôle clé dans la transition mitose/méiose à travers la régulation du programme transcriptionnel : YTHDC2 et MEIOC. YTHDC2 (*YTH Domain Containing 2*) est une hélicase à ARN cytoplasmique à domaine YTH qui reconnaît la modification des ARN *N6 methyladenosine* (m6A) (Hsu et al., 2017; Wojtas et al., 2017). Cette dernière constitue la modification la plus abondante des ARN messagers (ARNm) et influence leur traduction et stabilisation. Elle est catalysée par les ARN méthyltransférases METTL3 et METTL14, qui agissent en hétérodimère, et peut être effacée grâce à l'action des ARN déméthylases FTO ou ALKBH5. De manière intéressante, l'invalidation de *Mettl3* altère la progression méiotique, en induisant un blocage précoce en prophase I dans les testicules postnataux (K. Xu et al., 2017). Ceci est corrélé à une altération globale de l'expression génique et à des défauts d'épissage alternatif de certains transcrits. Un phénotype cellulaire similaire est observé chez les souris invalidées pour *Ythdc2*, avec une forte diminution de CG qui initient la méiose et un arrêt très précoce de la progression méiotique en prophase I (Bailey et al., 2017; Hsu et al., 2017; Puno et al., 2018; Wojtas et al., 2017). Ce défaut d'initiation et de progression de la prophase I est corrélé à une altération transcriptomique majeure, en particulier à une surexpression de gènes mitotiques et une inhibition de gènes méiotiques. MEIOC (*Meiosis specific with coiled-coil domain*) est un facteur cytoplasmique, exprimé au cours de la prophase I, qui interagit avec YTHDC2. Le phénotype des souris *Meioc -/-* ressemble au phénotype des souris *Ythdc2 -/- :* une diminution du nombre de CG qui initient la méiose et leur arrêt précoce en prophase I méiotique, dans l'ovaire fœtal ainsi que dans le testicule postnatal. L'invalidation de *Meioc* modifie le programme transcriptionnel, avec maintien de l'expression de gènes mitotiques et/ou une *downrégulation* de gènes méiotiques (Abby et al., 2016; M. Kojima et al., 2017).

De manière intéressante, YTHDC2 et MEIOC peuvent interagir avec la 5'-3' exoribonucléase XRN1 (Abby et al., 2016; Kretschmer et al., 2018; Wojtas et al., 2017). Cela permet de proposer un modèle d'action, selon

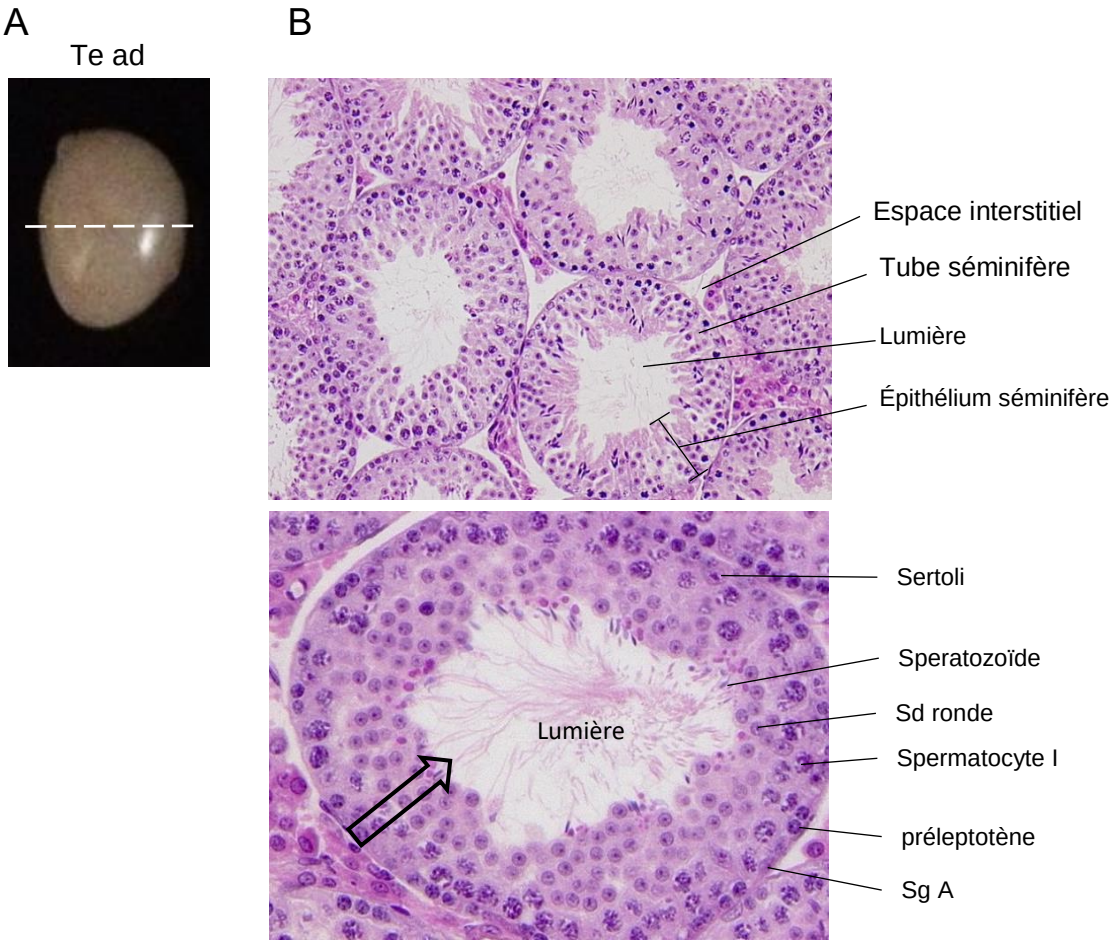


Figure 9: Histologie du testicule. A) Photographie d'un testicule adulte. Ligne blanche en pointillés: coupe transversale. B) Images de coupes histologiques coloriées à l' hématoxyline/éosine d'un testicule adulte (Te ad). En haut: les tubes séminifères baignent dans l'espace interstitiel et sont composés par un épithélium séminifère et une lumière. En bas: grossissement d'un tube séminifère. Dans l'épithélium séminifère a lieu la spermatogenèse. La flèche noire indique le sens de la spermatogenèse, de la lame basal vers la lumière. SgA = spermatogonie A ; Sd ronde = spermatide ronde.

lequel YTHDC2, MEIOC et XRN1 forment un trimère qui dégrade les transcrits mitotiques en assurant une transition correcte du programme mitotique au programme méiotique. Ce modèle est confirmé par la démonstration que les ARNm cibles de YTHDC2, présentant une modification m6A, sont surexprimés chez les mutants *Ythdc2* -/- et *Meioc -/-.* Cependant, la *downrégulation* de transcrits méiotiques chez ces deux mutants suggère un rôle supplémentaire du dimère YTHDC2 et MEIOC dans la régulation des ARNm. De manière intéressante, il a été montré qu'en absence de MEIOC (*Meioc* -/-), les ARN méiotiques sont transcrits mais rapidement dégradés, ce qui indiquerait un rôle de MEIOC dans la stabilisation de ces ARNm.

Les deux partenaires YTHDC2 et MEIOC sont donc des régulateurs de l'expression génique: ils agissent au niveau post-transcriptionnel en assurant l'extinction du programme mitotique et/ou la stabilisation du programme méiotique. Les rôles de YTHDC2 et MEIOC sont complémentaires à l'action de STRA8, qui, lui, régule l'expression des gènes au niveau transcriptionnel (M. L. Kojima et al., 2019).

La disponibilité, dans les cellules, de facteurs mitotiques et/ou méiotiques ne dérive donc pas uniquement d'une régulation transcriptionnelle, mais aussi de régulations post-transcriptionnelles qui incluent, à la fois, la dégradation et la stabilisation d'ARNm. Une implication d'un mécanisme post-transcriptionnel analogue a été décrit chez la levure, avec une ARN hélicase de la même familles (Mmi1). Ainsi ce mécanisme de dérégulation de l'entrée en méiose semble ancestral.

En conclusion, l'entrée en méiose est hautement régulée : plusieurs facteurs intrinsèques aux CG contribuent à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'entrée en méiose. En **Figure 8** j'ai schématisé les facteurs que nous avons traités au cours de ce chapitre (I.B. *Régulation de l'entrée en méiose*).

I.C. La spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus qui permet de générer les spermatozoïdes à partir de cellules germinales (CG) souches, les spermatogonies. Dans le testicule, les CG sortent de l'état de quiescence juste après la naissance en réacquérant leur état prolifératif. Les CG migrent au niveau de la lame basale des tubes séminifères et vont constituer le *stock* de spermatogonies indifférenciées. Ces dernières engagent cycliquement, et de manière asynchrone, la spermatogenèse, à partir de 2 jours post-partum (jpp) chez la souris (pour revue Griswold, 2015).

I.C.1. La structure du testicule

La spermatogenèse a lieu dans le testicule. Chez la souris, les testicules sont localisés dans le scrotum; ils ont une forme ovale et ils sont entourés par une enveloppe fibreuse appelée albuginée. Le testicule est composé de deux compartiments: l'espace interstitiel, siège de la fonction endocrine (production de testostérone) et les tubes séminifères, siège de la fonction exocrine (production des spermatozoïdes) (**Figure 9**). L'espace interstitiel contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules du système immunitaire et les cellules de Leydig. Ces dernières sont les cellules somatiques testiculaires qui réalisent la

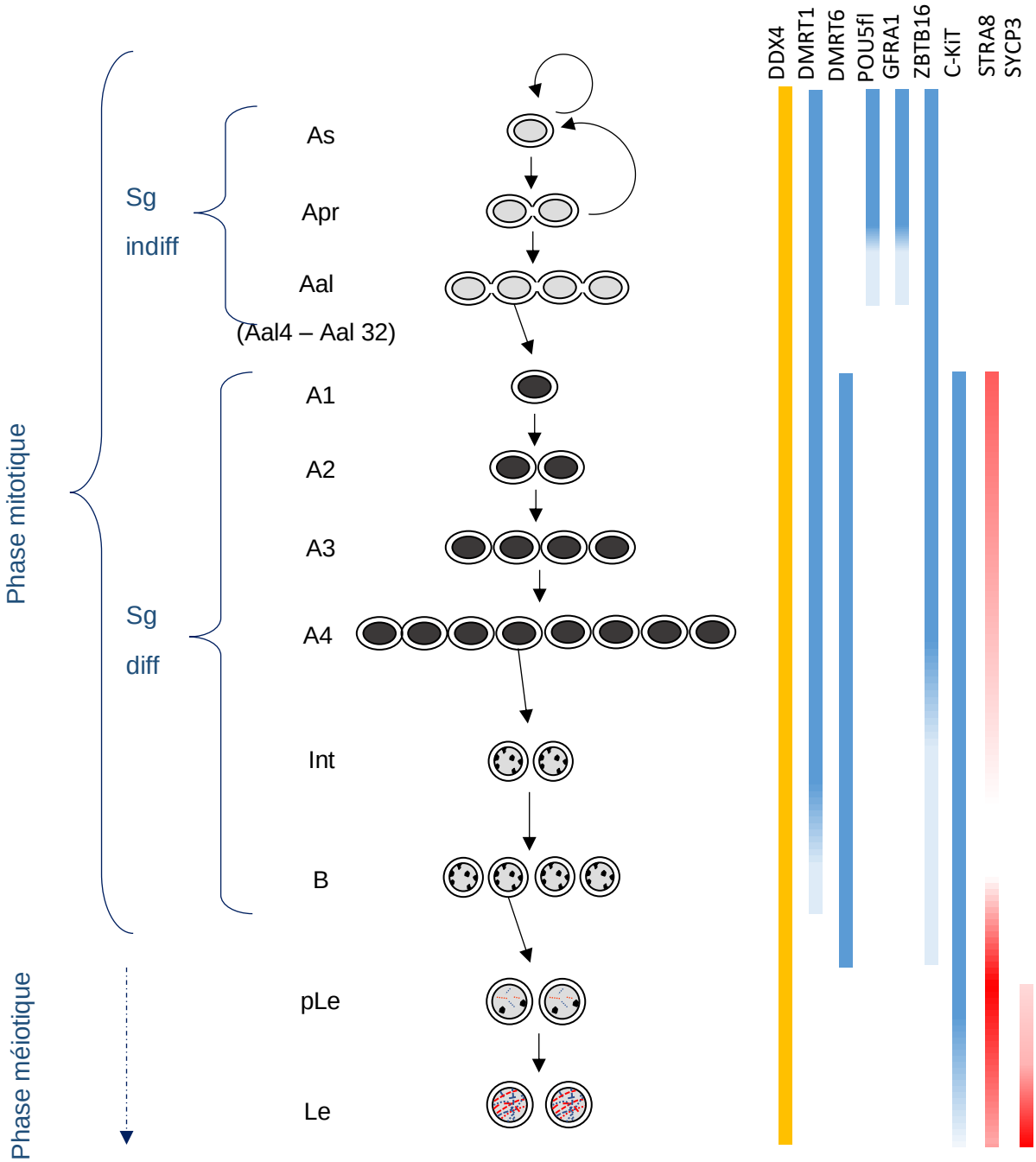


Figure 10: Phase mitotique de la spermatogenèse. Schéma représentant l'auto-renouvellement et la différentiation des spermatogonies. Sg indiff = spermatogonies indifférenciées ; Sg diff = spermatogonies différenciées. As = spermatogonies A_{single} ; Ap = spermatogonies A_{paired} ; Aal = spermatogonies $A_{aligned}$; spermatogonies A1-A4, Int = spermatogonies intermédiaires ; B = spermatogonies B ; pLe = préleptotènes ; Le = leptotènes. À droite, profils d'expression de marqueurs des différents stades de la différenciation des spermatogonies.

stéroïdogenèse (production des androgènes). Les tubes séminifères baignent dans le tissu interstitiel et sont délimités par une membrane basale, elle-même entourée par les cellules péritubulaires (cellules myoépithéliales).

Les tubes séminifères contiennent l'épithélium séminifère et la lumière. À l'intérieur des tubes séminifères se trouvent les cellules de Sertoli et les CG. Les cellules de Sertoli sont des cellules somatiques polarisées et de grandes tailles. Elles sont caractérisées par des prolongements cytoplasmiques qui englobent les CG et contribuent à la création de la barrière hémato-testiculaire. Leur morphologie particulière permet de maintenir la structure des tubes séminifères. Les CG se différencient en spermatozoïdes (processus de spermatogenèse) dans l'épithélium séminifère. Au cours de la spermatogenèse, les CG se déplacent de la base de l'épithélium vers la lumière.

I.C.2. Les phases de la spermatogenèse

La spermatogenèse est caractérisée par trois phases : I) phase « mitotique », II) phase « méiotique » et II) phase « post-méiotique ».

Au cours de la phase "mitotique", les spermatogonies indifférenciées vont s'auto-renouveler et entamer et poursuivre leur différenciation via une série de divisions mitotiques séquentielles (**Figure 10**). Chez la souris, la dénomination "spermatogonies indifférenciées" regroupe les spermatogonies (Sg) souches A_{single} (Sg A_s) et les spermatogonies A_{paired} (Sg A_p) et $A_{aligned}$ (Sg A_{al}). Ces dernières dérivent de divisions avec cytokinèse incomplète et consistent en deux Sg (Sg A_p) ou plusieurs Sg (Sg A_{al}) reliées par des ponts cytoplasmiques avec formation de syncytia. Périodiquement, un pool de Sg se différencie en Sg A1. Ces dernières démarrent une série de cinq divisions mitotiques successives permettant de produire, séquentiellement, des Sg A2, A3, A4, intermédiaires (Int) et B. Au cours de leur différenciation, les Sg modifient leur programme génique. Les Sg indifférenciées expriment plusieurs facteurs importants pour la prolifération et le maintien de l'état souche, tel POU5F1 (*POU Class 5 Homeobox 1*, ou Oct4) (Pesce, Wang, Wolgemuth, & Schöler, 1998). Le facteur *GDNF Family Receptor Alpha* 1 (GFRA1) est exprimé dans les Sg A_s et Sg A_p et son niveau d'expression décroît dans les Sg A_{al}. La protéine à domaine zinc-finger, ZBTB16 (ou PLZF, *promyelocytic leukemia zinc finger protein*), est exprimée fortement dans les spermatogonies indifférenciées et faiblement dans les différenciées ((Buaas et al., 2004; Teletin, Vernet, Ghyselinck, & Mark, 2017) et observation personnelle). ZBTB16 agit dans les Sg souches au niveau épigénétique en réprimant l'expression de gènes pro-différenciation comme, par exemple, le récepteur c-Kit (*Tyrosine-protein kinase Kit*, ou CD117) (Filipponi et al., 2007). Son invalidation altère la balance entre auto-renouvèlement et différenciation des Sg, ce qui provoque une diminution progressive du pool de Sg souches (Buaas et al., 2004). Le récepteur c-Kit est exprimé dans les Sg différenciées, à partir du stade A1 jusqu'au stade prémèiotique préleptotène (Gely-Pernot et al., 2012; Teletin et al., 2017). La mutation ponctuelle de ce dernier induit des défauts de divisions des spermatogonies (Rossi, Sette, Dolci, & Geremia, 2000). Un autre facteur exprimé dans les Sg est STRA8. De manière intéressante, STRA8 est faiblement détecté dans les Sg A différenciées, pour disparaître aux stades Int et B (Teletin et al., 2017). Il est ensuite réexprimé plus fortement au stade préleptotène, où il induit l'entrée en méiose des CG (Voir chapitre précèdent).

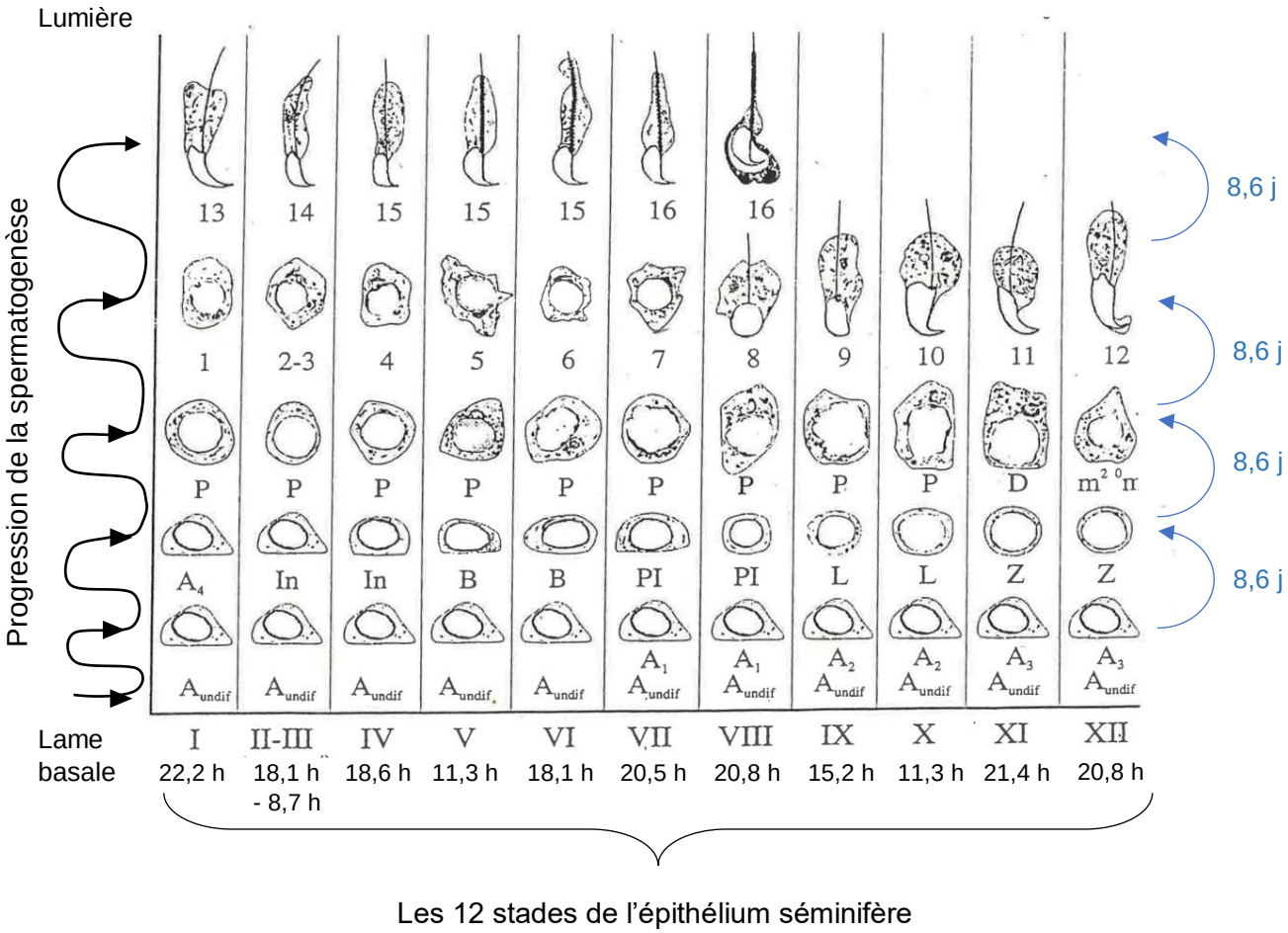


Figure 11: Cycle de l'épithélium séminifère. Représentation schématique des stades de l'épithélium séminifère de la souris. Pour chaque stade est indiquée la durée en heures (h). Aundiff = spermatogonie A indifférencié ; A1-A4 = spermatogonies A différenciés ; In = spermatogonies intermédiaires ; B = spermatogonies B ; Pl = préleptotène ; L = leptotène ; Z = zygotène ; P = pachytène ; D = diplotène ; m2°m = métaphases de méiose et spermatocytes II ; 1 à 16 = étapes de la différenciation des spermatides. Figure modifiée de *Russell et al., 1990.*

La deuxième phase de la spermatogenèse, dite “méiotique”, regroupe les deux divisions méiotiques permettant de générer des spermatides haploïdes à partir de spermatocytes diploïdes. Les Sg B sont les précurseurs des spermatocytes primaires (spermatocytes I). Les Sg B vont donner par une dernière mitose les cellules préleptotène, qui répliquent leur ADN au cours de la phase S préméiotique. Une fois l’ADN répliqué, les spermatocytes I initient la méiose. La première division méiotique, composée par les différentes phases : prophase I, métaphase I, anaphase I et télophase I, permet de séparer les chromosomes homologues dans deux spermatocytes secondaires (spermatocytes II), à partir d’un spermatocyte I. Suit immédiatement la deuxième division méiotique, sans passer par une étape intermédiaire de réplication de l’ADN, avec la métaphase II, l’anaphase II et la télophase II. Cette deuxième division permet de séparer les chromatides sœurs et d’obtenir quatre spermatides rondes à partir des deux spermatocytes II.

La dernière phase de la spermatogenèse est appelée “spermiogénèse” et consiste dans la maturation des spermatides rondes en spermatides allongées et spermatozoïdes. Au cours de cette phase les spermatides subissent des changements morphologiques et moléculaires majeurs : la perte de la majeure partie du cytoplasme, la formation de l’acrosome, le développement d’un flagelle, la compaction de l’ADN grâce au remplacement des histones par les protamines. Les spermatozoïdes sont ensuite relâchés dans la lumière des tubes séminifères (spermiation).

I.C.3. Cycle de l’épithélium séminifère

Les tubes séminifères sont délimités par une lame basale et sont composés par un épithélium séminifère, où se localisent les CG et les cellules de Sertoli, et d’une lumière, par où sont évacués les spermatozoïdes. En analysant une coupe transversale d’un testicule on observe des sections de différents tubes séminifères. L’observation des CG dans les tubes séminifères permet de tirer plusieurs observations (**Figure 9**):

- Les spermatogonies se localisent au niveau de la lame basale, à la base de l’épithélium séminifère. Les spermatocytes se déplacent progressivement vers l’intérieur de l’épithélium au fur et à mesure que la méiose progresse. Les spermatides rondes et allongées se situent à l’intérieur de l’épithélium et les spermatozoïdes sont relargués dans la lumière. Le résultat est une **organisation stratifiée** des CG.
- Dans les différentes sections des tubes séminifères on identifie des CG à des **degrés de différenciation** différents de la spermatogenèse : dans la section d’un même tube, on peut observer, en même temps, des spermatogonies, des spermatocytes et des spermatides organisées en couches stratifiées.
- En plus, en observant des sections de tubes séminifères différents, on identifie des populations différentes de CG: dans la section d’un tube on observe, par exemple, des Sg A différenciées, des spermatocytes en début de prophase I, des spermatocytes en fin de prophase I et des spermatides allongées; tandis que dans la section du tube d’à côté on observe des Sg B, des spermatocytes I, des spermatides rondes et des spermatides allongées. La spermatogenèse est donc **asynchrone** dans les différents tubes séminifères.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 12: Régulations des trois étapes de la spermatogenèse régulées par l'acide rétinoïque. Représentation schématique des stades de l'épithélium séminifère sous la régulation de l'acide rétinoïque (jaune). Les numéros romains indiquent les stades de l'épithélium séminifère. En blanc = spermatogonies indifférenciées ; en rose = spermatogonies B ; en bleu = spermatogonies A1 ; en orange clair = préleptotène ; en orange = spermatocytes I ; en vert = spermatides rondes. Les CG reçoivent l'acide rétinoïque entre les stades VII et IX de l'épithélium: l'acide rétinoïque régule la différenciation des spermatogonies de A indifférenciées (A_{al}) à A1, l'entrée en méiose et la spermiation. Figure tirée de *Teletin et al., 2017*

- Enfin, les **associations cellulaires** observées au sein des coupes des tubes séminifères sont toujours les mêmes. Cela signifie que dans les tubes où sont présents des Sg A1 il y aura toujours des préleptotènes, des spermatocytes I tardifs, des spermatides rondes et des spermatides allongées. Tandis que dans les tubes où il y a des Sg A3 il y aura toujours des spermatocytes I précoces, des spermatocytes I tardifs ou des métaphases et des spermatides allongées. Ces associations cellulaires sont appelées stades de l'épithélium séminifère. Chez la souris, il y a 12 associations possibles de CG différentes qui correspondent à **12 stades de l'épithélium séminifères**. L'ensemble des 12 stades représente 1 cycle de l'épithélium séminifère (**Figure 11**).

Comment expliquer l'existence des stades de l'épithélium séminifères? Les spermatogonies souches s'engagent dans le processus de spermatogenèse à **intervalles de temps réguliers**. Chez la souris, à un endroit donné du tube séminifère, tous les 8,6 jours un pool de Sg souches localisées à la base de l'épithélium séminifère, transite de l'état de Sg indifférenciée à Sg A1 différenciée. Les Sg progressent alors dans l'étape de différenciation, entrent en méiose et génèrent des spermatozoïdes qui seront relargués dans la lumière des tubes séminifères. La différenciation des Sg A1 en spermatozoïdes dure un temps bien défini: 35 jours chez la souris. Des nouveaux pools de spermatogonies souches entament donc le processus de spermatogenèse avant que les spermatogonies précédentes aient terminé ce processus. À un endroit donné, il y aura donc quatre populations de CG ayant démarré la spermatogenèse avec 8,6 jours d'intervalle entre l'un et le suivant (pour revue (Clermont, 1972; Griswold, 2015; Russell, Ettlin, Hikim, & Clegg, 1990).

À cela se rajoute le fait que la spermatogenèse est asynchrone au sein du testicule. Cela signifie qu'à différents endroits, au sein du même testicule, les Sg souches démarrent la spermatogenèse à des moments différents. Cela permet d'avoir une production de spermatozoïdes constante, malgré l'intervalle de 8,6 jours entre un cycle de l'épithélium et le suivant. Cette asynchronicité de la spermatogenèse au sein du testicule est contrôlée par un facteur extrinsèque, l'acide rétinoïque (AR). En effet, ce dernier, est disponible, à un temps donné, uniquement au niveau de certains fragments des tubes séminifères. Les CG reçoivent donc de l'AR à intervalles réguliers. L'AR régule trois étapes au cours de la spermatogenèse: I) la transition Sg A indifférenciée/Sg A1; II) l'entrée en méiose avec la transition préleptotène/leptotène; et III) la spermiation des spermatozoïdes à l'intérieur du lumen (pour revue Teletin et al., 2017). Ces trois étapes ont lieu au même moment entre le stade VII et le stade VIII de l'épithélium séminifère (**Figure 12**).

De manière intéressante, cette régulation des cycles de l'épithélium séminifère par l'AR peut être exploitée pour synchroniser la spermatogenèse chez la souris (Hogarth et al., 2013; Romer, de Rooij, Kojima, & Page, 2018) (**Figure 13**). En effet, la privation du testicule de sa source initiale d'AR permet de bloquer le démarrage de la première vague de spermatogenèse, qui a lieu à 2 jpp. Une injection d'AR permet ensuite d'induire la différenciation des Sg (transition des Sg indifférenciées en Sg A1) de manière synchrone dans tout le testicule. Cette synchronicité est maintenue et les cycles suivants démarrent donc tous les 8,6 jours de manière synchrone. En analysant une coupe transversale d'un testicule après synchronisation de la spermatogenèse, on observe dans tous les tubes séminifères le même stade de l'épithélium séminifère (**Figure 14**).

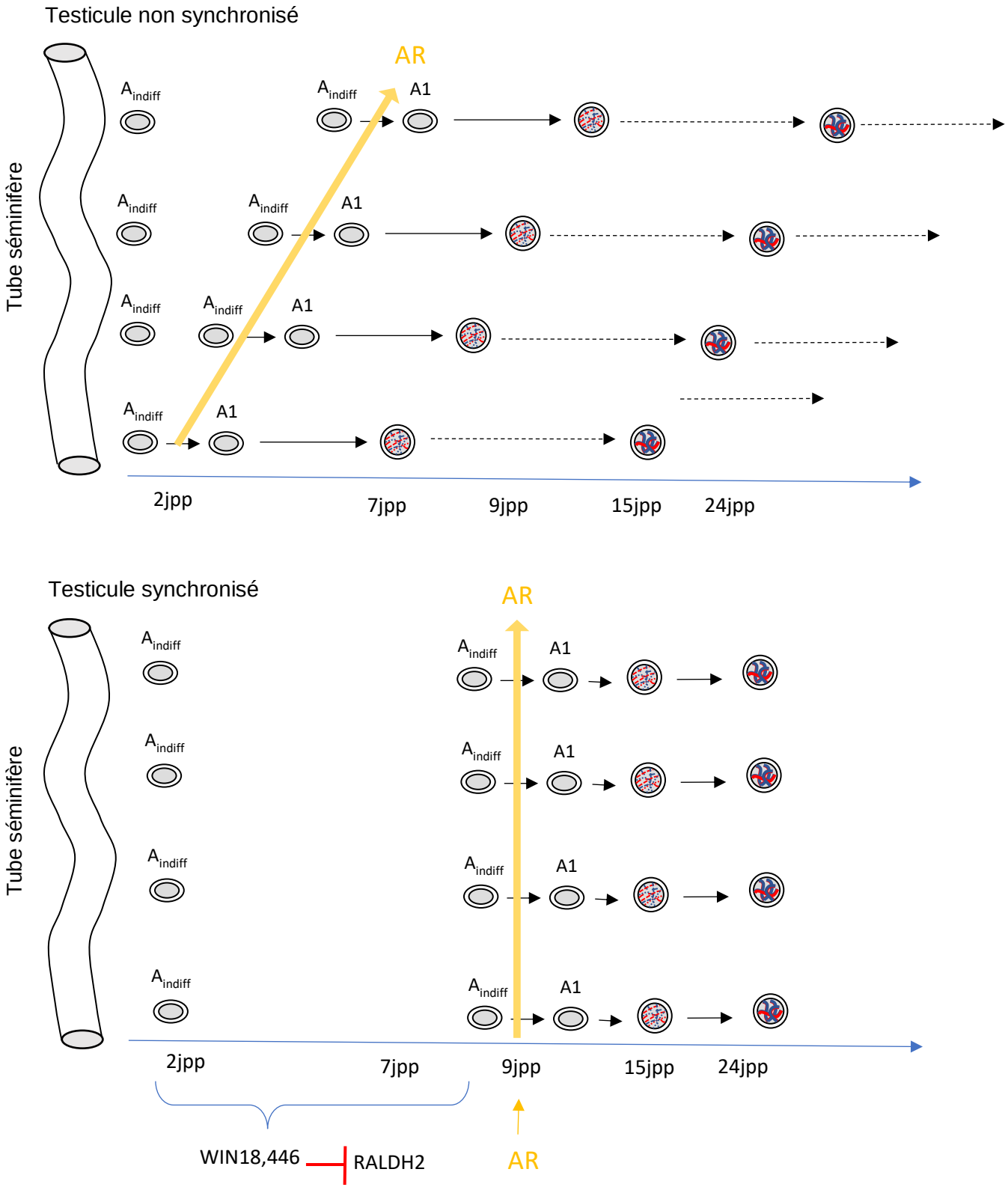


Figure 13: Synchronisation de la spermatogenèse. Représentation schématique de vagues de spermatogenèse asynchrones (en haut) et synchrones (en bas). Dans le tube séminifère d'un testicule non synchronisé, la première vague de spermatogenèse démarre à 2 jpp avec la différenciation d'un pool de spermatogonies A (A_{indiff}) en A1. La spermatogenèse démarre de manière asynchrone le long du tube séminifère, en fonction de la disponibilité de l'acide rétinoïque (AR, flèches jaunes). Dans un testicule synchronisé, la biosynthèse d'AR est inhibée par le traitement au WIN18,446 (inhibiteur RALDH2) entre 2 et 8 jpp. Ceci permet de prévenir la différenciation des spermatogonies. Une injection d'AR à 9 jpp induit la différenciation des spermatogonies A indifférenciées (A_{indiff}) à A1 différenciées de manière synchrone tout le long des tubes séminifères.

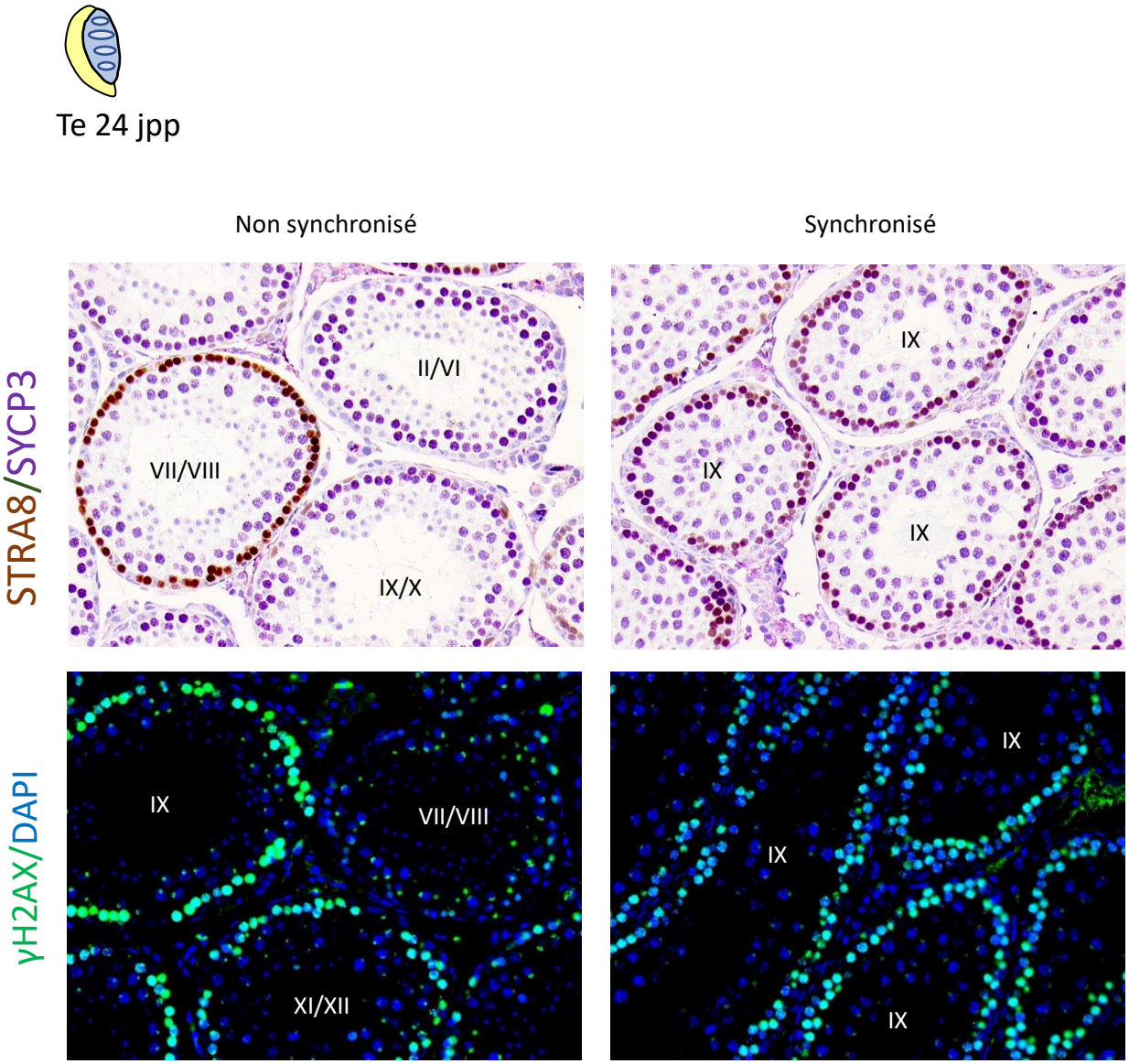


Figure 14: Immunohistologie d'un testicule synchronisé. Testicule (Te) synchronisé de 24 jpp. En haut, marquage immunohistochimique de STRA8 (marron) et SYCP3 (violet); En bas, marquage par immunofluorescence de γH2AX (vert); l'ADN est marqué en bleu (DAPI). Dans le testicule non synchronisé on observe différents stades de l'épithélium séminifère tandis que dans le testicule synchronisé on observe le même stade dans tous les tubes séminifères. Les images proviennent de mes propres résultats. J'ai choisi de les montrer ici pour une meilleure compréhension.

I.C.1. Rôle de l'AR dans la spermatogenèse

Nous venons de voir que l'AR régule trois étapes clés de la spermatogenèse : la différenciation des Sg, l'entrée en méiose et la spermiation. L'invalidation des trois enzymes de biosynthèse de l'AR (RALDH), spécifiquementdans les cellules de Sertoli (Aldh1a1-3$^{Sertoli\ -/-}$) prévient la différenciation des Sg A indifférenciées en Sg A1 différenciées (Raverdeau et al., 2012). Une injection d'AR est suffisante à induire la première différenciation des Sg en Sg A1 ; par la suite, la spermatogenèse continue normalement pendant des mois. Ceci montre que I) la première transition des Sg A indifférenciées en Sg A1 nécessite de l'AR synthétisé par les cellules de Sertoli mais que II) une fois cette première transition effectuée, les spermatocytes et spermatides synthétisent eux-mêmes l'AR nécessaire aux vagues de spermatogenèse suivantes. En accord, l'enzyme RALDH2 est présente dans les spermatocytes ainsi que dans les spermatides. Une observation intéressante a été faite récemment, dans un modèle murin d'invalidation des trois enzymes de biosynthèse de l'AR (RALDH) dans les cellules de Sertoli et dans les CG (*Stra8-Cre*) (Teletin et al., 2019). En effet, chez ces mutants, suite à une injection d'AR qui stimule la différenciation des Sg A indifférenciées en Sg A1, les cellules germinales activent STRA8 au stade préleptotène et entrent en méiose normalement, sans injections supplémentaires d'AR.

Dans l'ensemble, ces expériences prouvent le rôle clé de l'AR dans la différenciation des Sg ainsi que la présence de plusieurs sources d'AR. Cependant, elles sèment un doute sur le rôle de l'AR dans l'entrée en méiose chez le mâle (comme chez la femelle!).

I.D. Prophase I méiotique

La méiose débute par une longue prophase I, conservée et finement régulée. Cette phase est cruciale pour le bon déroulement de la méiose puisqu'elle assure de nombreux changements chromatiniens, parallèlement à la génération et à la réparation de nombreuses CDBs. La prophase I méiotique peut être subdivisée en cinq stades, en fonction du niveau de condensation chromatinienne et d'organisation chromosomique : leptotène (*leptos*, mince et *tenein*, étirer), zygotène (*zugon*, paire), pachytène (*pakhus*, épais), diplotène (*diploos*, double) et diacinèse (*dia*, séparation et *kinesis*, mouvement). Plusieurs événements clés ont lieu au cours de ces stades: I) la génération de nombreuses CDBs programmées, II) la réparation de ces dernières par recombinaison homologue (RH) méiotique; et III) l'alignement, appariement et *synapsis* des chromosomes homologues avec la formation du complexe synaptonémal (CS). Le tout contribue à la création de liens physiques entre les chromosomes homologues, qui sont visualisables sous forme de *chiasmata*, nécessaires à les ségréger proprement au moment de la métaphase I. Ces événements sont fortement interconnectés et interdépendants. Le défaut d'un de ces processus a des conséquences drastiques sur la progression de la prophase I, ce qui altère, par conséquence, les autres évènements. Cela rend donc très difficile de distinguer la cause et les conséquences de défauts concomitants de CDBs et de *synapsis* chez de nombreux mutants méiotiques ayant des altérations de la prophase I méiotique. Les événements de la prophase I sont très finement régulés, à chaque stade, par de nombreux acteurs clés. Cela nécessite une ample reprogrammation génétique, qui a lieu au moment de la transition mitose/méiose. Le profil méiotique-spécifique de nombreux facteurs clés de la prophase I, assure une régulation très fine de ces derniers.

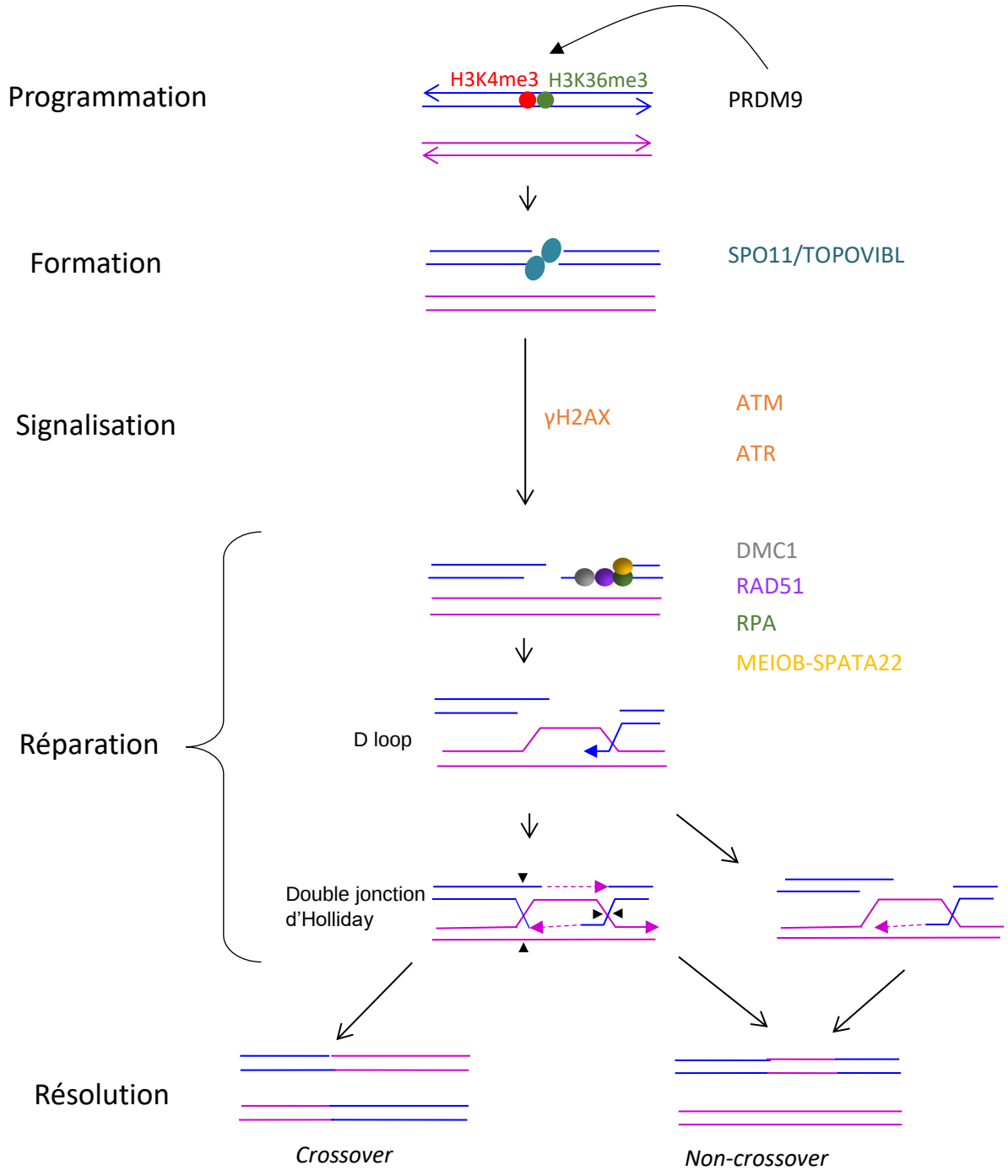


Figure 15: Étapes clés de la Recombinaison Homologue (RH) méiotique. En violet et en bleu deux chromosomes homologues (1 seule chromatide par chromosome est représentée), les extrémités avec les flèches indiquent la direction 3'. La formation des Cassures Double Brin (CDB) est programmée dans le temps et l'espace grâce à la méthyltransferase PRDM9 qui catalyse les méthylations H3K4me3 (rouge) et H3K36me3 (vert) aux sites des cassures. Le complexe SPO11/TOPOVIBL catalyse les CDB de l'ADN. La présence de CDB est signalée par les kinases ATM et ATR, qui phosphorylent H2AX (γH2AX). Les extremités simple brin de l'ADN sont prises en charge par les protéines de liaison RPA, MEIOB et SPATA22 et par les recombinases RAD51 et DMC1. L'invasion par l'extremité simple brin du chomosome homologue crée une D loop qui peut être resolue en crossover, en passant par une double jonction d'Holliday ou bien en non-crossover.

I.D.1. Cassures Double-Brins

En début de prophase I, des centaines de Cassures Double-Brins (CDBs) de l'ADN sont générées de manière programmée au niveau de sites définis, puis réparées (presque exclusivement) par Recombinaison Homologue (RH) méiotique. Dans ce paragraphe je vais détailler chacune de ces étapes ; Pour une meilleure compréhension, un schéma est proposé en **Figure 15**.

a) Formation des CDBs

Les CDBs méiotiques sont programmées dans le **temps** et dans l'**espace**. Elles ont lieu spécifiquement en début de prophase I (leptotène et zygotène) au niveau d'intervalles d'ADN spécifiques de 1-2 kb appelés « *hotspots*». Chez la souris et l'homme ces *points chauds* de recombinaison sont identifiés au niveau de régions enrichies en marques d'histones activatrices de la transcription, telles que H3K4me3 et H3K36me3.

Ces modifications d'histones au niveau des *hotspots* sont déposées par la protéine *PR domain-containing 9* (PRDM9) (pour revue Grey, Baudat, & de Massy, 2018; Yamada et al., 2017). PRDM9 est une histone méthyltransférase qui contient un domaine zinc finger et un domaine PR/SET capable de catalyser la triméthylation de l'histone H3. En son absence, des CDBs sont également générées et groupées sous forme d'*hotspots*, mais leur programmation spatiale est complètement perturbée. En effet, chez les mutants *Prdm9 -/-*, les CDBs sont générées de préférence au niveau de sites chromatiniens riches en H3K4me3, tels que les sites d'initiation de la transcription et les *enhancers*. La formation de cassures au niveau de sites de transcription a des conséquences catastrophiques sur la progression cellulaire en prophase I et induit une mort des spermatocytes, par apoptose, au stade zygotène-/pachytène-like; les spermatocytes présentent des défauts de réparation des CDBs par RH, ce qui induit, par conséquence, des défauts de *synapsis* des chromosomes homologues (**Figure 14**). Ceci est surprenant si on considère que PRDM9 est une innovation des mammifères qui est absent, en outre, chez certains d'entre eux (chien). Chez ces espèces démunies de PRDM9, les CDBs se localisent à proximité des promoteurs (Auton et al., 2013).

De manière intéressante les sites de *hotspots* évoluent très rapidement, et peuvent varier entre deux différentes souches de souris ou entre différentes populations d'êtres humains. Cette variabilité des *hotspots* est corrélée à une forte diversité allélique du *domain zinc finger* de PRDM9, responsable de la reconnaissance et liaison à des séquences spécifiques de l'ADN (pour revue (Frédéric Baudat, Imai, & De Massy, 2013).

L'utilisation d'une même marque d'histone, H3K4me3, pour signaler, à la fois, les sites de CDBs et les sites d'initiation de la transcription est assez surprenante. Pour générer une cassure, la présence de H3K4me3 est donc nécessaire, mais la présence de H3K4me3 ne signale pas forcément une cassure. Plusieurs questions restent donc ouvertes: *comment la machinerie de CDBs peut-elle distinguer entre les sites de cassures et les sites d'initiation de la transcription?* Un environnement chromatinien beaucoup plus complexe est probablement à la base de cette discrimination. D'autres marques d'histones, déposées spécifiquement au niveau des sites de cassures ou bien au niveau des sites d'initiation de la transcription, permettraient de distinguer ces deux sites. Dans cette idée, il a été récemment montré que la marque H3K36me3, catalysée aussi par PRDM9, semblerait être spécifiquement déposée au niveau des sites de cassures et pas aux sites d'initiation de la transcription (Lam, Brick, Cheng, Pratto, & Camerini-Otero, 2018). Récemment il a été identifié une nouvelle protéine méiotique-spécifique, ANKRD31, qui contribue à la régulation spatio-temporelle des

CDBs et qui permet de prévenir les cassures à des sites H3K4me3 PRDM9-indépendant (potentiels sites d'initiation de la transcription) (Boekhout et al., 2019; Papanikos et al., 2019).

Mais pourquoi « choisir » la marque H3K4me3 pour spécifier un site de cassure ? Un lien actif entre les cassures et l'inhibition ou l'activation de la transcription pourrait exister. Alternativement, cette marque pourrait juste faciliter l'ouverture de la chromatine pour le recrutement de la machinerie de cassure ou de transcription.

La génération des CDBs est catalysée par le complexe SPO11/TOPOVIB-Like (TOPOVIBL). SPO11 est une protéine méiotique-spécifique appelée topoisomérase-like du fait de la similarité de sa sous-unité catalytique avec celle de la DNA topoisomérase VI A (TopoVIA). L'implication de SPO11 dans la génération des CDBs au cours de la prophase I méiotique a été mis en évidence en 1997 (Bergerat et al., 1997; Keeney, Giroux, & Kleckner, 1997). Le partenaire de SPO11, TOPOVIBL, a été identifié récemment, en 2016, chez les mammifères (souris) (Robert et al., 2016) et les plantes (*Arabidopsis thaliana)* (Vrielynck et al., 2016).

L'absence de CDBs méiotiques chez les mutants *Spo11 -/-* et *Top6bl -/-*, ou bien une altération du nombre des CDBs (mutants hypomorphes *Spo11 Gal/Gal*) induit un défaut de progression méiotique en prophase I, avec un blocage au stade pachytène-like (F Baudat, Manova, Yuen, Jasin, & Keeney, 2000; Robert et al., 2016; Romanienko & Camerini-Otero, 2000; Smagulova et al., 2013). Cela suggère qu'un nombre minimal de CDBs est nécessaire, probablement pour assurer un bon *synapsis* des chromosomes homologues. D'autre part, un excès de CDBs (mutants *Atm -/-*) est aussi délétère, à cause de défauts de réparation de ces dernières (Lange et al., 2012 pour revue Cooper, Wardell, Garcia, & Neale, 2014).

b) Signalisation des CDBs

La signalisation des CDBs est dépendante des kinases *Ataxia Telangectasia Mutated* (ATM) et *ATM and Rad3-related* (ATR), qui phosphorylent le variant d'histone H2AX au niveau de la sérine 139 (γH2AX). Le marquage γH2AX dans les cellules méiotiques est concomitant à la génération des CDBs en début de prophase I (Leptotène) et disparaît progressivement au milieu de la prophase I (stade pachytène) lorsque les CDBs sont réparées. À noter que la disparition du marquage γH2AX est plus tardive dans la méiose femelle, ce qui suggérerait une réparation des cassures plus tardive/moins efficace.

ATM et ATR font partie de la famille des kinases phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinases (PIKKs), qui jouent un rôle fondamental dans l'activation de la *DNA Damage Response* (DDR) pour le maintien de l'intégrité génomique. En méiose, la kinase ATM est impliquée dans la première vague de phosphorylation de l'histone H2AX qui a lieu tout suite après la génération des CDBs, au stade leptotène. L'invalidation d'ATM induit des défauts de progression méiotique avec un arrêt au stade pachytène-like. Cela est dû à un défaut de réparation de cassures, entrainé par une mauvaise signalisation et une mauvaise prise en charge de ces dernières. En outre, il a été mis en évidence un rôle d'ATM dans l'homéostasie des CDBs, avec la mise en route d'un *feedback* négatif régulant le nombre de ces dernières. Chez les souris *Atm -/-* il y a, en effet, une augmentation des CDBs. Ce phénotype est diminué chez les souris invalidées pour *Atm* ayant un seul allèle *Spo11* (*Atm-/-Spo11+/-)* (Barchi et al., 2008; Lange et al., 2012).

Une deuxième vague de phosphorylation de H2AX a lieu plus tardivement, au cours du stade zygotène. Cette deuxième vague est catalysée par la kinase ATR. Récemment, l'invalidation conditionnelle d'ATR dans les CG a montré son importance dans le *synapsis* des chromosomes homologues, dans la bonne localisation des

recombinases DMC1 et RAD51 au niveau des CDBs, et donc dans la réparation correcte de ces dernières. ATR agit aussi au niveau des chromosomes sexuels X et Y au stade pachytène, en induisant une « troisième » vague de phosphorylation de H2AX qui est à la base du *silencing* des chromosomes sexuels (voir paragraphe I.D.3. *MSCI*) (Pacheco et al., 2018; Widger et al., 2018). La double-invalidation de *Atm* et *Atr* montre un phénotype plus sévère que les mutants *Atm* ou *Atr* simples, et met en évidence une troisième vague possible de phosphorylation de H2AX au stade pachytène catalysée par le troisième membre de la famille PIKKs, PRKDC (Widger et al., 2018). En effet, chez ces mutants, le marquage γH2AX apparaît tardivement, au stade pachytène-like; la triple invalidation de *Atm, Atr* et *Prkdc* prévient ce marquage tardif de γH2AX.

Des partenaires d'ATR jouant des rôles clés en début de prophase I ont aussi été identifiés. Récemment, l'invalidation de *Topoisomerase IIβ-binding protein 1* (*TopBP1 -/-*) a mis en évidence son rôle en tant qu'activateur de la signalisation d'ATR. L'invalidation de *TopBP1* perturbe le chargement de DMC1 et RAD51 ce qui induit des défauts de réparation des CDB et de *synapsis* (Jeon et al., 2019).

c) Réparation des CDBs

Les CDBs sont réparées par Recombinaison Homologue (RH) méiotique au cours des premiers stades de prophase I. La RH méiotique se différencie de la RH mitotique par plusieurs aspects. La réparation des CDBs par RH méiotique utilise le chromosome homologue comme matrice, plutôt que la chromatide sœur (mitose). Tandis que dans les cellules mitotiques les produits de la RH sont principalement des non-crossovers, la RH méiotique doit assurer la génération d'au moins un *crossover* par couple de chromosomes homologues (pour revue Guillon, Baudat, Grey, Liskay, & De Massy, 2005). Cela permet en effet la création de liens physiques, visualisés sous forme de « chiasmata », entre les chromosomes homologues. Ceux-ci sont nécessaires à la mise en place d'une tension correcte du fuseau méiotique en métaphase I et donc à la ségrégation correcte des chromosomes en anaphase I. En outre, ces échanges interchromosomiques génèrent un brassage génétique par la transmission de nouvelles combinaisons alléliques à la progéniture. La régulation précise du nombre des *crossovers* par cellule et par chromosome est donc importante. Les sites de *crossovers* sont identifiables à partir du stade pachytène par la détection de MLH1 (*MutL homolog 1*) et MLH3 (*MutL homolog 3*). Ces deux protéines, impliquées dans la voie du *DNA mismatch repair*, permettent de maturer les intermédiaires de recombinaison pour mener à la formation d'un crossover. En effet, en absence de l'une ou l'autre protéine (*Mlh1 -/-* ou *Mlh3 -/-*) le nombre de chiasmata est réduit. Enfin, une autre caractéristique propre à la RH méiotique est l'intervention de protéines méiotique-spécifiques, tels que SPO11, DMC1, MEIOB, SPATA22. Ces protéines présentent souvent des homologies avec des protéines mitotiques: DMC1/RAD51; MEIOB/RPA1; SPATA22/RPA2. De manière intéressante, les homologues méiotiques ne remplacent pas, mais plutôt collaborent avec, leurs homologues mitotiques.

Quelles sont les étapes de la RH méiotique?

SPO11 agit en dimère et coupe le double brin de l'ADN (ADNdb) par réaction transestérase, en se liant à chaque extrémité 5'. À la suite de la formation des CDBs, SPO11 est libéré, lié de manière covalente à des fragments d'ADN (oligo-Spo11), grâce à l'activité endonucléolytique du complexe MRN. Cela libère des extrémités d'ADN au niveau du site de la CDB. Ces extrémités sont dégradées par l'activité exonucléase 5'-3' de EXO1, ce qui génère des extrémités d'ADN simple brin (ADNsb) libres qui sont rapidement prises en

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 16: Structure et fonctions des cohésines. A) Représentation schématique des complexes de cohésines dans les cellules somatiques et méiotiques. **B) 1**. Les chromatides sœurs sont associées grâce aux complexes de cohésines selon deux modèles hypothétiques: un complexe entoure les deux chromatides sœurs (a) ou alors deux complexes de cohésines entourent chacun une chromatide et interagissent entre eux (b). 2. Durant la prophase I de méiose, les cohésines assurent la cohésion entre les chromatides sœurs, permettant d'établir la structure axe-boucle de la chromatine en favorisant la formation du complexe synaptonémal. Modifié de *Bolcun-Filas and Schimenti, 2012; Haering and Jessberger, 2012*.

charge par des protéines de liaison au simple brin. RPA et son paralogue méiotique MEIOB sont capables de lier l'ADNsb et sont indispensables pour la bonne résolution des CDBs. Les recombinases DMC1, méiotique spécifique, et RAD51, ubiquitaire, sont très rapidement chargées sur l'ADNsb, et permettent la recherche d'homologie ainsi que l'invasion du chromosome homologue. L'absence de MEIOB chez des souris transgéniques (*Meiob -/-)* induit des défauts de réparation et un arrêt de la progression méiotique au stade pachytène-like (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013).

Les intermédiaires de recombinaison peuvent donner comme produits finaux soit des crossovers soit des non-crossovers. Les non-crossovers induisent le transfert unidirectionnel d'un court segment d'ADN, d'environ 300pb, et ont donc un effet minimal sur le brassage génétique ; tandis que les crossovers induisent le transfert bidirectionnel, entre chromosomes homologues, de longs intervalles chromosomiques (jusqu'à l'échange réciproque de bras chromosomiques) (pour revue Frédéric Baudat et al., 2013). Le nombre de non-crossovers dépasse le nombre de crossovers d'environ 10 fois (chez les mammifères). Cet excès de non-crossovers peut être interprété de deux façons : soit l'excès assure qu'au moins un crossover aura lieu à un emplacement adéquat, soit la RH dans son ensemble (crossovers et non-crossovers) est nécessaire pour favoriser la recherche d'homologie et assurer un appariement correct entre homologues.

I.D.2. La structure chromatinienne

Un autre évènement clé de la prophase I méiotique, parallèle à la formation et réparation des CDBs, est l'appariement des chromosomes homologues avec la mise en place d'un échafaudage protéique le long des chromosomes, appelé Complexe Synaptonémal (CS). En prophase I, la chromatine subit ainsi un fort remaniement structurel. Les chromosomes commencent à se condenser dès l'entrée en méiose et à former une structure spécifique composée par des boucles d'ADN reliées à un axe. Les cohésines permettent la cohésion des chromatides sœurs et un premier assemblage de l'axe. Cela est suivi par le chargement, des éléments axiaux du CS (*Synaptonemal Protein Complex* 2 et 3, SYCP2 et SYCP3). Les chromosomes homologues vont ensuite s'aligner, s'apparier et *synapser* au niveau des axes. Le *synapsis* consiste donc dans la formation d'un CS complet, avec apparition d'un élément central reliant les axes. Les éléments axiaux sont alors appelés éléments latéraux.

a) Les cohésines

Les cohésines sont des complexes multiprotéiques qui jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'architecture chromatinienne. Les cohésines sont composées de quatre sous-unités: deux protéines de la famille SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), SMC1α et SMC3, qui forment un hétérodimère et permettent de former une structure à anneau qui entoure les chromosomes ; une α-kleisine, RAD21, qui permet la fermeture de l'anneau, et une protéine accessoire, *Stromal Antigen 1 ou 2* (SA1 ou SA2), qui s'associe à l'α-kleisine. La formation d'une structure à anneau permet aux cohésines d'entourer l'ADN et, ainsi, la cohésion des chromatides sœurs (pour revue Biswas, Hempel, Llano, Pendas, & Jessberger, 2016; Bolcun-Filas & Schimenti, 2012; Haering & Jessberger, 2012) (**Figure 16**).

Dans les cellules mitotiques, les cohésines jouent un rôle clé dans la cohésion des chromatides sœurs, et s'assemblent autour de ces dernières au cours de la réplication de l'ADN. La cohésion des chromatides sœurs

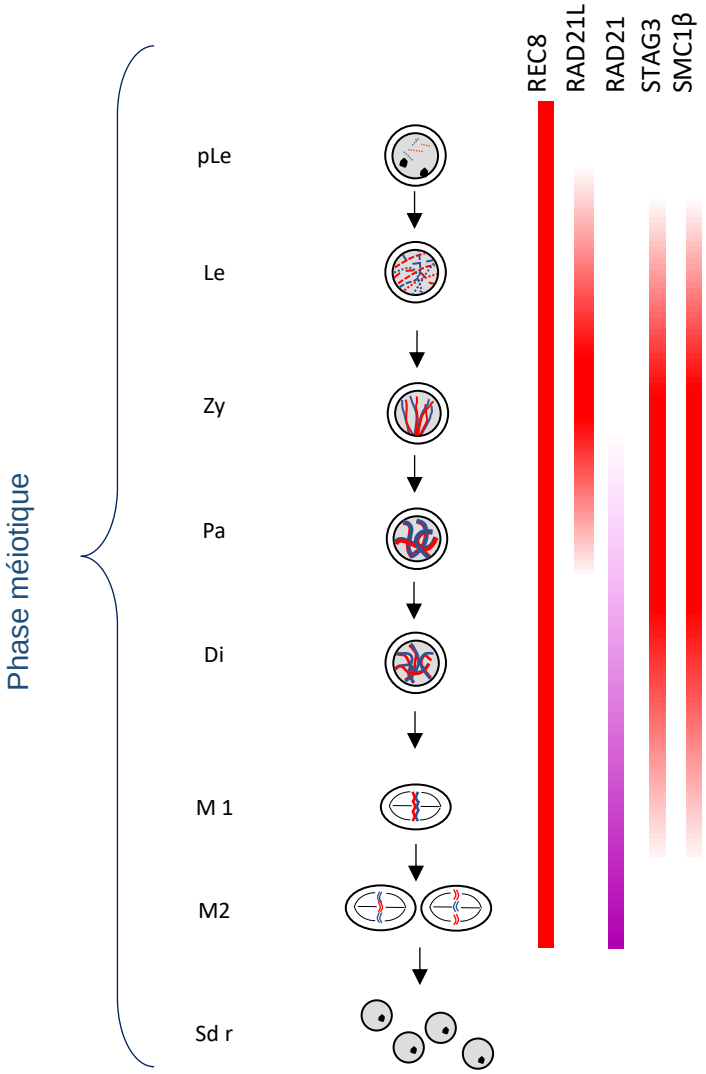


Figure 17: Représentation schématique des profils d'expression des cohésines au cours de la méiose. Chaque cohésine suit un profil d'expression spécifique au cours de la méiose. En rouge cohésines méiotiques-spécifiques et en violet cohésine ubiquitaire. pLe = préleptotène ; Le = leptotène ; Zy = zygotène ; Pa = pachytène ; Di = diplotène ; M1 = Métaphase I ; M2 = Métaphase 2 ; Sd r = spermatides rondes.

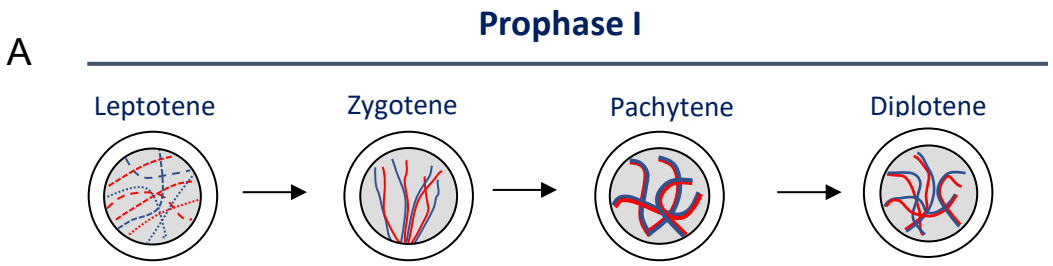
permet un alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique et leur ségrégation précise en anaphase. Des rôles supplémentaires des cohésines dans l'organisation tridimensionnelle de la structure chromatinienne, dans la condensation des chromosomes et dans la réparation des CDBs ont été décrits. En outre, les cohésines sembleraient participer à la régulation transcriptionnelle en interagissant avec le coactivateur transcriptionnel MEDIATOR et le facteur de transcription CTCF (Voir paragraphe II.B.2 *La transcription et les cohésines*).

En méiose, les cohésines jouent un rôle fondamental dans la cohésion des chromatides sœurs mais aussi dans l'assemblage des éléments axiaux du complexe synaptonémal (CS) au cours de la prophase I. Une particularité de la méiose réside dans la séparation des chromosomes homologues, et non des chromatides sœurs, lors de la première division méiotique. Cela nécessite 1) la cohésion des chromatides sœurs qui seront réparties dans la même cellule fille au cours de l'anaphase I et 2) la liaison des chromosomes homologues pour permettre de créer une tension au fuseau métaphasique en assurant ainsi leur ségrégation correcte en anaphase I.

Plusieurs cohésines méiotiques-spécifiques sont exprimées dans les CG au cours de la méiose. SMC1α ubiquitaire peut être remplacée par SMC1β; les deux α-kleisines méiotiques REC8 et RAD21L sont exprimées en plus de RAD21 et une troisième protéine SA, STAG3 (ou SA3), se substitue à SA1 et SA2 en méiose (**Figure 16**). L'expression de plusieurs cohésines méiotiques-spécifiques, en plus des cohésines ubiquitaires, permet aux CG d'avoir une multitude de complexes différents dérivant d'associations différentes entre les sous-unités. Les cohésines méiotiques sont exprimées à partir de la transition mitose/méiose: chaque cohésine suit un profil d'expression spécifique au cours de la méiose et leur localisation au niveau des axes est finement régulée dans le temps (pour revue Rankin, 2015) (**Figure 17**) et dans l'espace. Au cours de la prophase I, les cohésines se localisent à des sites spécifiques en formant des domaines enrichis de cohésines. Ces sites de liaison sont spécifiques à chaque cohésine.

Les deux kleisines méiotiques-spécifiques, REC8 et RAD21L, localisent le long des axes sous forme de foyers. De manière intéressante, leur localisation est mutuellement exclusive, ce qui suggère que leurs sites de liaison à la chromatine diffèrent. REC8 est exprimée très précocement, au stade préleptotène ; il lie les chromosomes avant la réplication de l'ADN et reste localisé aux axes jusqu'en métaphase II. L'invalidation de REC8 induit des défauts d'assemblage des éléments axiaux du CS. En outre, SYCP1 se localise de manière aberrante entre les chromatides sœurs plutôt qu'entre les chromosomes homologues. Cela suggère un rôle de REC8 dans l'inhibition du *synapsis* aberrant entre les chromatides sœurs, en faveur de l'appariement entre chromosomes homologues (H. Xu, Beasley, Warren, van der Horst, & McKay, 2005). RAD21L apparaît au niveau des axes principalement aux stades leptotène et zygotène; il se dissocie en fin du stade pachytène pour être remplacé par la cohésine ubiquitaire RAD21. L'invalidation de RAD21L induit des défauts de formation des éléments axiaux du CS, qui apparaissent discontinus et fragmentés. On retrouve en outre du *synapsis* aberrant entre les chromatides sœurs (Herrán et al., 2011). L'invalidation simultanée (double KO) de REC8 et RAD21L cause une absence presque totale des éléments axiaux (Ward, Hopkins, Mckay, Murray, & Jordan, 2016) .

La localisation précoce des kleisines au niveau des axes chromosomiques précède l'arrivée des protéines formant les éléments axiaux du complexe synaptonémal. En effet, l'invalidation de *Sycp2* ou *Sycp3* n'altère



Élément sous droit, diffusion non autorisée

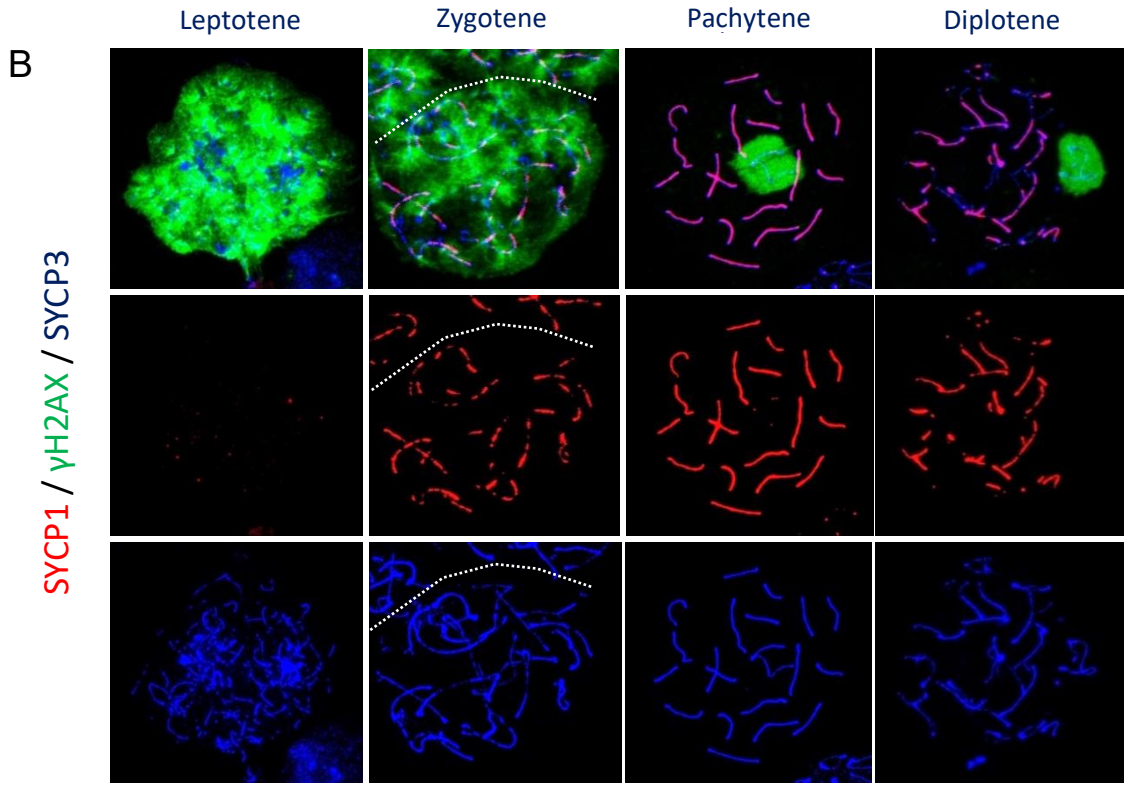


Figure 18: *Synapsis* des chromosomes homologues au cours de la prophase I méiotique. A) Représentation schématique de l'assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I méiotique. CDB = cassure double brin. Tiré de *Burgoyne et al. 2009.* **B)** Étalements de chromosomes de spermatocytes I. Détection par immunofluorescence des éléments du complexe synaptonémal SYCP3 (bleu, élément latéral) et SYCP1 (rouge, élément central) et des cassures double brin (vert, γH2AX). En pachytène les chromosomes homologues ont complètement synapsé et les cassures double brin ont été réparées. La vésicule sexuelle reste marquée pour γH2AX. Ces images sont tirées de mes résultats.

pas le chargement des cohésines au niveau des axes chromosomiques, ce qui suggère qu'un premier socle de cohésines est nécessaire pour l'assemblage correct des éléments axiaux du complexe. Les cohésines forment donc la base structurelle pour l'assemblage du CS et pour l'organisation correcte des chromosomes en méiose.

STAG3 est la sous-unité méiotique-spécifique commune aux différents complexes de cohésines. STAG3 est exprimé à partir du stade leptotène et son invalidation induit un phénotype plus drastique que les autres mutants simples des cohésines. Son invalidation annule quasi complètement la formation des éléments axiaux du complexe, qui apparaissent très courts et fragmentés (Hopkins et al., 2014; Winters, McNicoll, & Jessberger, 2014).

SMC1β est exprimé aussi à partir du stade leptotène. Son invalidation peut être partiellement compensée par la présence de SMC1α. Cependant, en absence de SMC1β, les éléments axiaux du complexe synaptonémal sont plus courts que chez le sauvage, ce qui provoque un échec d'assemblage du CS (Biswas et al., 2013).

En absence de cohésines méiotiques spécifiques la formation des axes est altérée, il en résulte des défauts de la taille des axes ou bien leur fragmentation. Cela a comme conséquences une altération générale de la structure axe-boucles, une altération du chargement des éléments axiaux du CS et donc par la suite des défauts d'appariement et *synapsis* des chromosomes homologues. Ces défauts structuraux se répercutent sur le processus de réparation des CDBs qui est alors défectueux. Le *synapsis* assure en effet le rapprochement des chromosomes homologues favorisant ainsi la réparation des cassures par RH méiotique. Les cohésines constituent donc la base de tous les évènements principaux ayant lieu en prophase I ; et leur absence a des conséquences catastrophiques pour la prophase I à tous les niveaux : structure, complexe, cassures.

b) Le Complexe Synaptonémal

Le Complexe Synaptonémal (CS) est une structure multiprotéique composée par les éléments latéraux et les éléments centraux (**Figure 18**). Les éléments latéraux sont appelés initialement éléments axiaux, car ils forment les axes chromatiniens à partir desquels s'étendent les boucles de l'ADN. Ces éléments axiaux se mettent en place très tôt, au début du stade leptotène, en s'assemblant au niveau des axes préalablement définis par les cohésines. Les éléments axiaux, en coopération avec les cohésines, maintiennent les deux chromatides sœurs ensemble. Les protéines SYCP3 et SYCP2 constituent les éléments axiaux du complexe synaptonémal. Elles apparaissent au stade leptotène au niveau de sites spécifiques situés le long des axes des chromosomes. Les éléments axiaux se propagent par la suite tout le long des axes chromosomiques en recouvrant toute leur longueur. Au stade zygotène, les chromosomes homologues s'alignent et les filaments transversaux, constitués par la protéine SYCP1, vont relier les éléments axiaux de deux chromosomes homologues. Les éléments axiaux prennent le nom, à ce moment, d'éléments latéraux. Aux filaments transversaux s'ajoutent les protéines constituant les éléments centraux du CS: SYCE1, SYCE2, SYCE3 et TEX12, SIX6OS1, avec formation d'une structure tripartite (deux éléments latéraux et un élément central). Au stade pachytène, le CS est complet et recouvre toute la longueur des axes chromosomiques. Le désassemblage du complexe, à partir des éléments centraux et des filaments transverses, démarre en début du stade diplotène. Les chromosomes restent reliés au niveau des *chiasmata*. L'invalidation d'un élément latéral, *Sycp2* ou *Sycp3*, cause des défauts dans la formation des axes (Kolas et al., 2004). L'invalidation de

Sycp1 ou d'un des cinq autres éléments centraux induit un défaut de *synapsis* (Benavente et al., 2016; Bolcun-Filas et al., 2007; De Vries et al., 2005; Hamer, 2006).

La forte interdépendance entre le complexe synaptonémal et les CDBs est fascinante. En effet, une connexion entre ces deux événements est présente à partir des premières étapes d'assemblage du CS: les premiers sites d'assemblages des éléments axiaux (SYCP3 et SYCP2) corrèlent avec les sites de CDBs. En outre, la diffusion du CS le long des axes chromosomiques est nécessaire pour l'appariement des chromosomes homologues et pour la réparation des CDBs. Vice-versa, la réparation des cassures est certes nécessaire pour créer un lien physique entre les chromosomes homologues mais aide aussi à compléter la mise en place du CS. C'est pourquoi, les défauts de *synapsis* observés dans les spermatocytes invalidés pour un des éléments du complexe sont toujours accompagnés par des défauts de réparation des CDBs et une absence de *crossovers*. Vice-versa, les spermatocytes invalidés pour un facteur clé de formation (*Spo11* -/-) ou réparation (*Meiob* -/-) des CDBs montrent des défauts de mise en place du CS, avec un assemblage incomplet de SYCP1 et des éléments centraux. Ces relations et connexions intriquées entre le *synapsis* et le *processing* des CDBs, rendent délicat la séparation de ces processus et donc l'analyse phénotypique de nouvelles souris mutantes pour des facteurs méiotiques inconnus.

Récemment, il a été identifié un nouvel élément associé au CS, appelé *Synaptonemal Complex Reinforcing Element* (SCRE), capable d'interagir avec les éléments centraux du complexe. Ce dernier se distingue des autres protéines du CS pour son rôle dans la stabilisation du complexe plutôt que dans sa mise en place. En effet, en absence de SCRE (souris mutantes *Scre* -/-), le CS se forme et se désassemble prématurément (Liu et al., 2019). De manière intéressante, dans les spermatocytes *Scre* -/- les CDBs sont réparées avec une cinétique comparable aux spermatocytes sauvages. Cependant, les cassures ne sont pas résolues en *crossovers* (absence de marquage MLH1). Cela suggère deux niveaux de connexion entre le *synapsis* et la réparation des cassures. Un premier assemblage du complexe, observable chez les mutants *Scre* -/-, suffit en effet pour induire la réparation des CDBs; mais le désassemblage précoce du complexe empêche la voie de réparation par *crossover*. Nous pouvons supposer que le chargement des facteurs permettant la stabilisation des intermédiaires de recombinaison, puis leur maturation en crossover et nécessite d'un temps plus long.

L'asynapsis (absence de *synapsis*) des chromosomes homologues est signalé au cours de la prophase I méiotique. Notamment, les protéines méiotiques-spécifiques à domaine HORMA (HORMAD1 et HORMAD2) sont associées aux axes des chromosomes non-synapsés en début de prophase I. Dès que le *synapsis* a eu lieu, ces protéines sont déchargées. Chez des mutants présentant des défauts de formation du CS (*Smc1β* -/-), les protéines HORMAD restent associées aux axes. Ces protéines sont considérées comme des « signalisateurs » *d'asynapsis*. De manière intéressante le chargement des protéines HORMAD et indépendant de la formation (*Spo11* -/-) et de la signalisation (*Atm* -/-) des CDB, ce qui signifie que l'accumulation des protéines HORMAD est indépendante des cassures (Wojtasz et al., 2009). En outre, la formation et la réparation de cassures exogènes chez des mutants *Spo11* -/- induit le *synapsis* des chromosomes homologues en présence mais pas en absence (*Hormad1* -/-) de HORMAD1. Ceci montre que chez les mutants *Hormad1* -/- les problèmes de synapsis sont indépendants des CDBs (Carofiglio et al., 2018). Enfin, la présence des protéines HORMAD corrèle fortement avec l'activité ATR. Wojtasz et al. montrent que

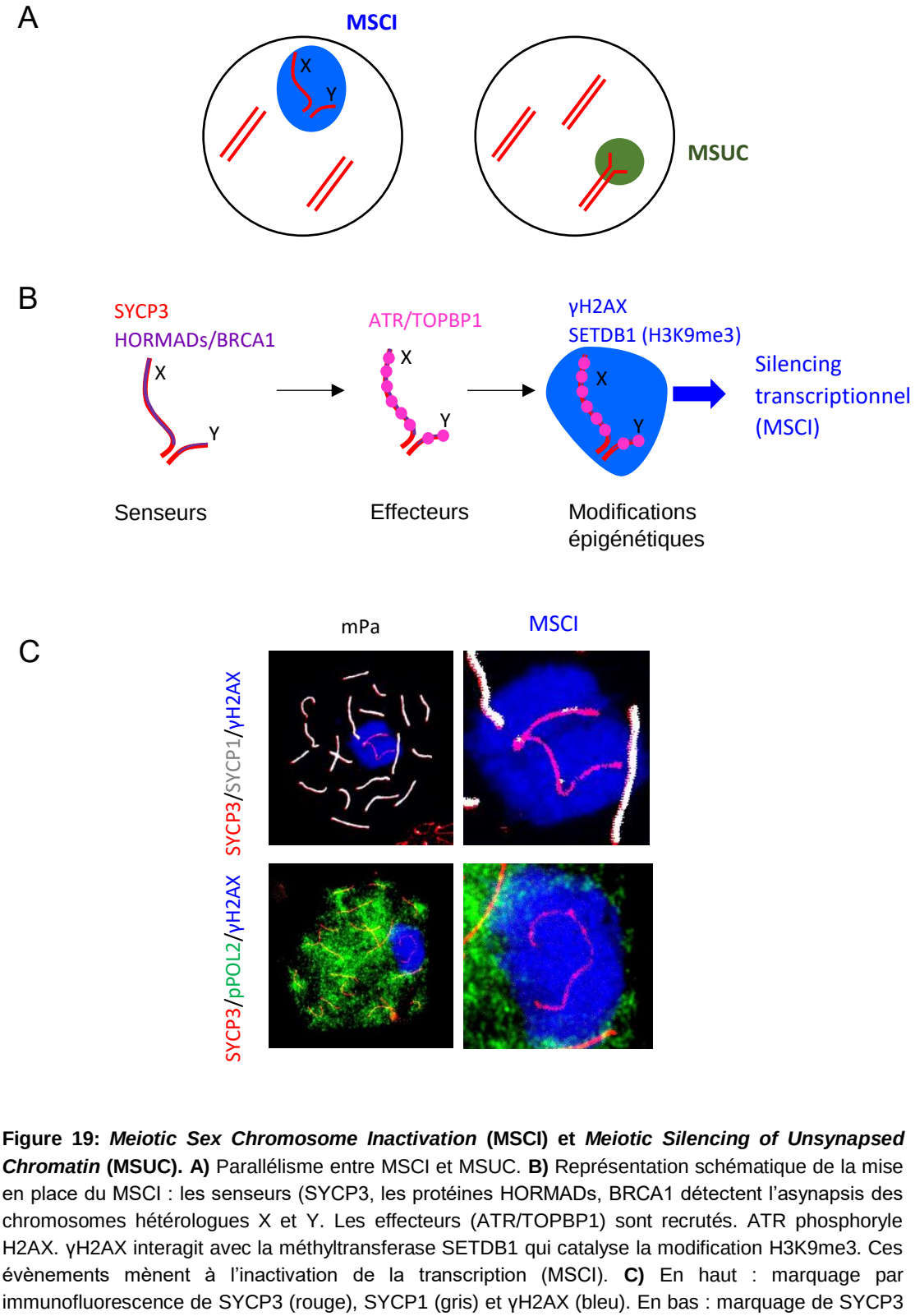


Figure 19: ***Meiotic Sex Chromosome Inactivation*** **(MSCI) et** ***Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin*** **(MSUC). A)** Parallélisme entre MSCI et MSUC. **B)** Représentation schématique de la mise en place du MSCI : les senseurs (SYCP3, les protéines HORMADs, BRCA1 détectent l'asynapsis des chromosomes hétérologues X et Y. Les effecteurs (ATR/TOPBP1) sont recrutés. ATR phosphoryle H2AX. γH2AX interagit avec la méthyltransferase SETDB1 qui catalyse la modification H3K9me3. Ces évènements mènent à l'inactivation de la transcription (MSCI). **C)** En haut : marquage par immunofluorescence de SYCP3 (rouge), SYCP1 (gris) et γH2AX (bleu). En bas : marquage de SYCP3 (rouge), et pPOL2 (vert) et γH2AX (bleu) dans des spermatocytes I en pachytène. À ce stade, γH2AX est spécifiquement détecté au niveau du *sex body* tandis que la pPOL2 est exclue. Les images de droite sont des aggandissemnet des images de gauche. Les images sont tirées de mes résultats.

la protéine HORMAD2 accumule ATR le long des axes asynapsés; cependant, elle ne contribue pas au chargement de ATR au niveau des CDB. Ceci suggère encore une fois que la signalisation de HORMAD2 est spécifique de *l'asynapsis* et pas des cassures (Wojtasz et al., 2012). Notons que γH2AX est également un « signalisateur » de l'asynapsis indépendamment de son rôle au niveau des CDBs.

I.D.3. Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI)

Dans ce paragraphe je vais parler d'un phénomène de *silencing* transcriptionnel ayant lieu au cours de la prophase I, le MSCI. J'ai choisi de parler de ce phénomène dans cette partie de l'introduction plutôt que dans la partie II (*Transcription),* pour une meilleure compréhension du lien entre les évènements connus de la prophase I.

Au stade pachytène, le *synapsis* des chromosomes homologues est complet et la totalité des CDBs a été réparée. Cependant, les chromosomes sexuels X et Y ne peuvent pas s'apparier à cause de leur manque d'homologie, à l'exception de la région pseudoautosomale (PAR, Pseudo Autosomal Region). Cette absence d'appariement des chromosomes sexuels induit un remodelage épigénétique spécifique. Les chromosomes subissent une forte condensation et forment un domaine hétérochromatinien appelé vésicule sexuelle *(sex body)*. La vésicule sexuelle est caractérisée par un phénomène d'inactivation de la transcription, appelé *Meiotic Sex Chromosome Inactivation* (MSCI), qui persiste dans les spermatocytes tout le long des stades pachytène et diplotène (**Figure 19**). Le MSCI est facilement mis en évidence par l'absence de détection de la forme active de l'ARN polymérase II (pPol2) (Voir chapitre II.A. *L'ARN polymérase II*) et par l'absence de détection, par hybridation *in situ,* d'ARNm codés par les gènes situés le long des chromosomes X et Y (tels que *Smcl2* et *Zfy2*). Un défaut de cette inactivation de la transcription induit l'expression de gènes localisés sur les chromosomes sexuels et toxiques pour les spermatocytes. Les spermatocytes s'arrêtent donc au stade pachytène et meurent par apoptose.

Nous avons vu qu'en prophase I il existe une forte interdépendance entre l'appariement des chromosomes homologues et la réparation des CDBs. Une absence de *synapsis*, notamment au niveau des chromosomes sexuels, est donc corrélée à une réparation tardive des CDBs. De manière intéressante, il a été montré que des facteurs clés de ces processus, le *synapsis* et la DDR (*DNA Damage Response*), sont impliqués dans la mise en place du MSCI. SYCP3, l'élément latéral du CS, HORMAD1, HORMAD2 et BRCA1, se localisent tout le long des axes des chromosomes sexuels. Ces protéines jouent le rôle de « senseurs », en détectant l'absence de synapsis des chromosomes sexuels, et transmettent le signal aux « effecteurs » (pour revue James M.A. Turner, 2015). ATR, TOPBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*) et MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1)*, trois acteurs clés de la DDR, sont les effecteurs clés du MSCI. En premier, ATR est recruté aux axes grâce aux senseurs et, deuxièmement, ATR transloque tout le long des boucles grâce à ses partenaires TOPBP1 et MDC1. Ceci se traduit par la phosphorylation de l'histone H2AX (γH2AX) tout le long de la chromatine. De manière intéressant, cette phosphorylation est hautement corrélée à l'inactivation de la transcription. L'invalidation d'un de ces facteurs clés du MSCI (senseurs ou effecteurs) induit un défaut de mise en place du MSCI, une absence de condensation de la chromatine et une transcription

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 20: Conservation du MSCI entre les mammifères (souris) et les oiseaux (poulet). Représentation schématique du MSCI chez la souris et le poulet aux différentes phases de la prophase I. Modifié de *Namekawa et al. 2009*

aberrante de gènes localisés au niveau des chromosomes sexuels (Ojarikre et al., 2017; Royo et al., 2013; Shin et al., 2010; James M.A. Turner et al., 2004; Widger et al., 2018; Wojtasz et al., 2009).

Le MSCI est associé à un ample remodelage épigénétique. Notamment, des marques activatrices de la transcription, tels H3K9ac et H3K79me2 sont spécifiquement exclues du *sex body*. En revanche, H3K9me3, une marque répressive de la transcription, y est enrichie. Récemment, il a été démontré que la méthyltransferase SETDB1, grâce à son interaction avec γH2AX, est recrutée aux chromosomes sexuels, où elle triméthyle l'histone H3K9 (H3K9me3), marque inactivatrice de la transcription. L'invalidation de SETDB1 n'altère pas la localisation des autres acteurs du MSCI (senseurs et effecteurs) mais induit une transcription anormale des gènes situés sur les chromosomes X et Y. SETDB1 permet donc de relier les effecteurs du MSCI, la phosphorylation d'H2AX et le *silencing* transcriptionnel (Hirota et al., 2018).

Le phénomène de MSCI est une manifestation du processus beaucoup plus ample appelé *Meiotic silencing of unsynasped chromatin* (MSUC). Ce dernier représente un « mécanisme de contrôle » qui permet de détecter les défauts de *synapsis* au stade pachytène et d'inactiver la transcription au niveau de ces sites. Cela permettrait de priver les cellules défectueuses de gènes clés nécessaire à leur survie et à la progression méiotique. L'activation du MSUC dans les spermatocytes avec des défauts de *synapsis* induit donc leur arrêt en prophase I et leur élimination par apoptose. Les femelles X0 représentent un modèle d'étude du MSUC, indiquant que cet évènement n'est pas spécifique de la méiose mâle. En effet, chez ces dernières, le chromosome X non-synaspé est éteint transcriptionnellement, tandis que chez les femelles XX les deux chromosomes synapsent normalement et sont transcriptionnellement actifs (J. M. A. Turner, 2007).

Alors que le MSCI est un processus physiologique qui répond à *l'asynapsis* des chromosomes hétéromorphiques X et Y, le processus de MSUC signale des anomalies de *synapsis* de chromosomes homologues et mène souvent à la mort des cellules.

Le phénomène de MSUC est donc conservé dans les deux sexes, mais est-il conservé chez d'autres espèces? L'analyse du processus de MSCI chez des espèces présentant un système de détermination sexuelle autre à XX/XY, où le mâle est hétérogamétique, est très intéressante. Chez le poulet, les mâles possèdent deux chromosomes Z (ZZ) tandis que les femelles sont hétérogamétiques, en possédant un chromosome Z et un chromosome W. Ce modèle est intéressant car les chromosomes Z et W synapsent de manière hétérologue et transitoire au stade mi-pachytène. La forte dépendance du processus d'inactivation sexuelle (MSCI et MSUC) vis-à-vis de l'*asynapsis* chez la souris suggèrerait que dans un modèle, comme le poulet, où les chromosomes sexuels arrivent à *synapser,* le MSCI devait être aboli. Cependant, de manière surprenante, chez le poulet on observe une condensation des chromosomes Z et W, un chargement de marques épigénétiques répressives de la transcription (H3K9me3) et une exclusion de la pPOL2 des chromosomes sexuels au cours de la prophase I ((Schoenmakers et al., 2009). Ce processus de MSCI démarre très précocement, au stade zygotène, et est maintenu au cours du stade pachytène pendant la phase de *synapsis* des chromosomes ZW (**Figure 20**). La persistance de CDBs au niveau des chromosomes Z et W jusqu'au stade diplotène, malgré leur *synapsis*, permet peut-être de maintenir l'état d'inactivation transcriptionnelle. Le poulet pourrait donc être un bon modèle pour séparer, bien que de manière transitoire, les deux processus, *synapsis* et réparation des cassures, dans la régulation du MSCI.

En conclusion, le *silencing* des chromosomes sexuels est une caractéristique commune aux deux sexes, ainsi qu'aux différents systèmes de détermination sexuelle (XY/ZW) (pour revue Namekawa & Lee, 2009). Le maintien de ce processus dans l'évolution démontre son importance vis-à-vis du processus méiotique. Cette incorporation des chromosomes sexuels dans le *sex body*, extrêmement compact et transcriptionnellement inactif, pourrait être un système évolutif pour prévenir la formation d'évènements de RH et donc l'échange de matériel génétique entre les deux chromosomes hétérologues.

I.D.4. Les Points de contrôle en prophase I

Comme déjà vu, la prophase I repose sur différents processus interconnectés et interdépendants : l'organisation chromatinienne, le *synapsis* des chromosomes homologues, la formation et réparation des CDBs. Cette forte interdépendance entre les différents processus clés de la prophase I, permet de coordonner finement leur *timing*, leur déroulement et leur progression. En présence d'altérations d'un de ces processus, la prophase I est retardée et, si l'erreur n'est pas résolue, les cellules meurent par apoptose (pour revue (Cahoon & Libuda, 2019; Subramanian & Hochwagen, 2014).

Des facteurs permettent de signaler le bon déroulement des différents processus. Les protéines HORMAD (HORMAD1 et HORMAD2) signalent l'*asynapsis* des chromosomes homologues en début de prophase I; leur persistance, au stade pachytène, au niveau des autosomes signale un défaut de *synapsis* de ces derniers. Les kinases ATM et ATR signalent, elles, la présence de CDBs. ATR, en particulier, est active à partir du stade zygotène et son maintien au stade pachytène au niveau des autosomes signale un retard ou défaut de réparation. ATR peut en outre signaler une absence de *synapsis* en pachytène, dans les phénomènes de MSUC et de MSCI. Ces facteurs de *signaling,* HORMAD et ATR, représentent les senseurs clés régulant les mécanismes de *checkpoint* méiotiques. Ces *checkpoints*, ou points de contrôle, interviennent pour réguler chaque étape de la prophase I: contrôle du *synapsis*, contrôle des cassures (*DNA damage checkpoint*) et contrôle du MSCI (chez les mâles). L'activation d'un point de contrôle via les senseurs implique l'activation d'effecteurs (tels les checkpoint kinases CHK1 et CHK2), le ralentissement de la progression méiotique et éventuellement l'élimination des CG par apoptose. Ces points de contrôle sont nécessaires pour éviter la formation de gamètes anormaux.

Un dimorphisme sexuel est rencontré vis-à-vis des mécanismes de checkpoint. En effet, chez la femelle les points de contrôles apparaissent moins stricts. Dans les spermatocytes, l'activation de points de contrôle se traduit, la plupart des fois, par un arrêt méiotique au stade pachytène, plus précisément au stade IV du cycle de l'épithélium séminifère. Chez la femelle, les mécanismes de surveillance sont plus permissifs. En effet, les ovocytes peuvent progresser jusqu'aux divisions métaphasiques (métaphase I ou II) à la suite de l'activation de *checkpoints* due à des problèmes de réparation ou de *synapsis*. En outre, certains ovocytes arrivent à dépasser les deux divisions métaphasiques malgré les défauts de prophase I, ce qui peut induire la formation de gamètes ayant des défauts chromosomiques (aneuploïdie).

Un exemple est retrouvé dans l'analyse du phénotype des souris invalidées pour la cohésine *Smc1b -/-.* En effet, son absence, induit des défauts de formation des axes dans les deux sexes. Ces défauts se traduisent par l'activation des mécanismes de contrôle et un arrêt en pachytène chez le mâle; tandis que les ovocytes

progressent jusqu'en métaphase II. Cette différence est probablement liée à une sévérité majeure des *checkpoints* méiotiques dans les spermatocytes comparés aux ovocytes (pour revue McNicoll, Stevense, & Jessberger, 2013).

Enfin, le phénotype de la souris *Spo11 -/-,* représente un autre exemple de dichotomie mâle/femelle d'arrêt méiotique. L'invalidation de *Spo11*, et donc l'absence de CDBs méiotiques, induit des défauts de *synapsis* et donc une absence de la RH dans les spermatocytes et les ovocytes. Cependant, les spermatocytes ne progressent pas au-delà du stade pachytène, tandis que les ovocytes terminent la prophase I de méiose et atteignent le stade diplotène avant la naissance. Les ovocytes *Spo11 -/-* sont éliminés tardivement après la naissance par apoptose (F Baudat et al., 2000).

En conclusion, plusieurs exemples montrent une dichotomie, entre mâles et femelles, du stade d'arrêt méiotique à la suite de l'activation d'un point de contrôle (*checkpoint*). À ma connaissance, dans tous les exemples de dichotomie mâle/femelle, les mâles ont un phénotype plus sévère que les femelles. Ceci pourrait être dû à une différence dans le mécanisme-même de surveillance méiotique, qui serait plus sévère dans les spermatocytes I que dans les ovocytes I.

I.D.5. Dimorphisme sexuel

Plusieurs aspects du processus méiotique montrent un dimorphisme sexuel (pour revue Cahoon & Libuda, 2019; Morelli & Cohen, 2005). Ce dimorphisme concerne le *timing* et la durée de la méiose, mais aussi les aspects biologiques et moléculaires de ce processus.

Chez la femelle, la méiose démarre en vie fœtale de manière quasi-synchrone et s'arrête en fin de prophase I au stade diplotène pour redémarrer au moment de l'ovulation, au cours de la vie postnatale. Les deux divisions méiotiques donnent naissance à un seul ovocyte, avec deux globules polaires (le génome femelle ne devient haploïde qu'au moment de la fécondation, pronoyau).

Chez le mâle, les spermatogonies s'engagent en méiose de manière asynchrone pendant toute la vie postnatale et adulte ; une fois engagées, la méiose se poursuit de manière continue sans interruption, avec l'obtention de quatre spermatides haploïdes.

Les phénotypes observés suite à l'invalidation de certains gènes clés de la prophase I méiotique diffèrent entre les mâles et les femelles. Cela suggère une spécificité sexuelle vis-à-vis de certains aspects moléculaires de la prophase I. Un exemple est retrouvé chez les mutants des cohésines *Rad21L -/-.* Chez les mâles, leur invalidation induit des défauts de formation des axes avec, comme conséquences, un blocage de la progression au stade pachytène et une stérilité totale. Chez les femelles, les axes se forment correctement et les souris sont fertiles, malgré une baisse de leur fertilité à un âge plus précoce à cause d'une perte plus rapide des ovocytes (Herrán et al., 2011). De façon similaire, les mutants pour les protéines SYCP3 ou SYCP2 montrent une absence d'assemblage du CS chez les mâles, ce qui induit un blocage de la progression méiotique au stade pachytène, tandis que dans les ovocytes le CS est partiellement formé et les souris femelles sont alors hypofertiles (Yang et al., 2006; Yuan et al., 2000, 2002).

En outre, la prise en charge des cassures peut aussi différer entre les deux sexes. L'invalidation de Meilb2 (*Meilb2 -/-*) montre une dichotomie mâle/femelle lié au *DNA damage checkpoint* (J. Zhang, Fujiwara, Yamamoto, & Shibuya, 2019). MEILB2 (Meiotic Localizer of BRCA2) a été identifié en tant que partenaire de BRCA2. MEILB2 est un régulateur clé de la recombinaison méiotique: il se localise le long des axes chromosomiques aux sites de CDBs en favorisant la localisation de BRCA2. Bien que la localisation de MEILB2 soit équivalente dans les spermatocytes et dans les ovocytes en prophase I méiotique, l'invalidation de *Meilb2 -/-* n'a pas la même conséquence dans les deux sexes. Elle induit une absence quasi-complète de RAD51 et DMC1 et un blocage en prophase I chez le mâle. Chez la femelle, le nombre de foyers DMC1 et RAD51 sur les axes est réduit de moitié et les souris sont hypofertiles.

Dans la même idée, l'absence de l'histone H2AX induit une stérilité chez le mâle, avec un blocage au stade pachytène; tandis que la femelle est hypofertile (Celeste et al., 2002).

Dans le chapitre précédent (I.D.4 *Les Checkpoints en prophase I*) nous avons vu que les mécanismes de contrôle de la prophase I méiotique sont moins stricts dans des ovocytes défectueux que dans des spermatocytes avec les mêmes défauts. Dans ce chapitre nous avons vu que l'invalidation de facteurs clés dans la méiose mâle peut avoir, chez la femelle, des conséquences beaucoup moins sévères. Ceci peut être dû à des diversités au niveau de la structure chromatinienne qui induiraient des différences au niveau de la longueur des axes, ainsi que dans le nombre et la localisation des crossovers. Généralement, chez la femelle, les axes sont plus longs et ceci est associé à plus de crossovers. *Brick et al.* ont montré que certains hotspots sont plus actifs dans un sexe que dans l'autre (Brick et al., 2018). Ceci semble dépendant de l'état de méthylation de l'ADN : chez le mâle l'ADN est méthylé au moment de la méiose et la méthylation pourrait influencer la liaison de PRDM9, et donc les sites de recombinaison. En revanche, chez les femelles, l'ADN est hypométhylé au moment de la méiose et les sites de cassures sont ainsi influencés surtout par la structure chromatinienne.

II. La transcription

If DNA is a book, then how is it read? Learn more about the DNA transcription process, where DNA is converted to RNA, a more portable set of instructions for the cell.

Clancy, 2008 DNA transcription. Nature Education

Chez les eucaryotes la transcription est assurée principalement par trois ARN polymérases (Pol): Pol I, Pol II et Pol III. La Pol I transcrit les ARN ribosomiaux (ARNr); la Pol III transcrit les petits ARN non-codants comme les ARN de transfert (ARNt); la Pol II transcrit les ARN messagers (ARNm) et certains ARN non-codants. Dans cette deuxième partie de l'introduction, je me focaliserai sur la transcription des ARNm, correspondant aux gènes codants pour des protéines, catalysée par la Pol II.

II.A. L'ARN polymérase II

La Pol II transcrit essentiellement les ARNm à partir de gènes codants. Les ARNm sont initialement transcrits en tant que pré-ARNm. La transcription de ces derniers est étroitement connectée à leur métabolisme*: capping*, épissage et polyadénylation des ARN. Les ARNm sont ensuite transportés dans le cytoplasme, ou ils sont traduits en protéines (pour revue (Ben-Yishay & Shav-Tal, 2019).

La Pol II est une holoenzyme composée par 12 sous-unités (pour revue (Sainsbury, Bernecky, & Cramer, 2015). La sous-unité la plus large, RPB1 (*RNA Polymerase II Subunit B1*), possède l'activité catalytique, tandis que les autres sous-unités ont une fonction structurelle. La sous-unité RPB1 est caractérisée par un domaine C-terminal (CTD). Le CTD est unique à la Pol II et est associé à la régulation des différentes étapes transcriptionnelles. Il constitue en effet une base d'ancrage pour plusieurs facteurs impliqués dans la transcription en elle-même ou bien dans le métabolisme des pré-ARNm et dans la modification de la chromatine (remodelage, modification d'histones). Le CTD a la particularité d'être composé par une répétition d'une séquence de sept aminoacides: *Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7*. Cette séquence est répétée en tandem de nombreuses fois (52 répétitions chez les mammifères). Les différents résidus peuvent subir des modifications post-traductionnelles (PTM): Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5 et Ser7 peuvent être phosphorylés ; Thr4, Ser5 et Ser7 peuvent être glycosylés et les deux prolines peuvent être isomérisées dans la configuration *cis* ou *trans,* ce qui rend la structure mobile (pour revue Buratowski, 2009; Eick & Geyer, 2013).

En particulier, la phosphorylation des trois sérines du CTD (Ser2, Ser5 et Ser7) a été largement étudiée. Leur état de phosphorylation est très dynamique au cours de la transcription et permet la régulation des différentes phases transcriptionnelles: l'initiation, l'élongation et la terminaison (pour revue Margaritis & Holstege, 2008) (**Figure 21**).

La Pol II est initialement recrutée au niveau du promoteur via son interaction avec plusieurs facteurs généraux de transcription (GTF, General Transcription Factors). TFIIA et TFIIB lient l'ADN au niveau de séquences spécifiques, appelées « core promoter elements (CPEs) », localisées à proximité du site d'initiation de la transcription (*upstream* ou *downstream*) des gènes cibles. Ce premier assemblage du complexe de pré-initiation au niveau du promoteur permet le recrutement de la Pol II, associée à TFIIF, du complexe *Mediator* ainsi que d'autres GTF (TFIIH et TFIIE). Le *mediator* est un complexe multi-protéique nécessaire pour

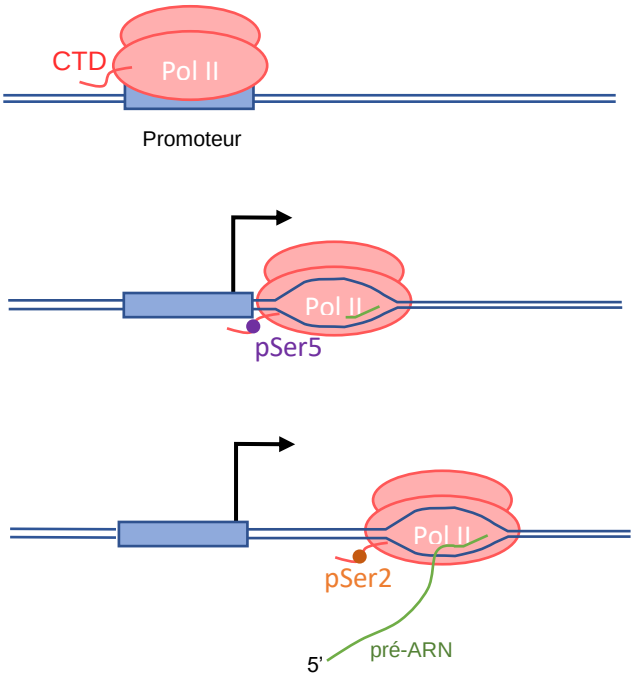


Figure 21: Modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal (CTD) de la sous-unité majeure de l'ARN polymérase II (Pol II) au cours de la transcription. Quand la Pol2 est recrutée au niveau du promoteur, le CTD n'est pas phosphorylé. La phosphorylation de la Sérine en position 5 (pSer5) active l'initiation de la transcription. La phosphorylation de la Serine en position 2 (pSer2) active l'élongation de la transcription. L'ARN néosynthétisé (pré-ARN) est représenté en vert.

l'assemblage et la stabilisation du complexe de pré-initiation de la transcription (pour revue Eychenne, Werner, & Soutourina, 2017).

Au moment du recrutement, le CTD de la Pol II n'est pas phosphorylé. Le *mediator* est un coactivateur de la Pol II: il stimule la kinase CDK7, sous-unité de TFIIH, qui phosphoryle le CTD au niveau de la Ser5 (pPol2-Ser5) (pour revue Buratowski, 2009). Cette phosphorylation active l'initiation de la transcription. Au fur et à mesure que la Pol II s'éloigne du site d'initiation; les niveaux de phosphorylation de la Ser5 diminuent, tandis que la phosphorylation de la Ser2 augmente (pPol2). La phosphorylation de la Ser2 est assurée par la kinase CDK9, sous-unité du facteur d'élongation P-TEFb (*positive transcription elongation factor*). Cette phosphorylation marque l'état d'élongation active de la Pol II. La phosphorylation du CTD régule la transcription de manière indirecte, en régulant l'interaction entre la Pol II et d'autres facteurs transcriptionnels. La terminaison de la transcription est aussi favorisée par la phosphorylation de la Ser2 et est souvent associée à la polyadénylation de l'ARNm (pour revue Shandilya & Roberts, 2012).

II.B. Transcription et contexte chromatinien

La transcription a lieu dans le contexte de la chromatine. Cela implique que la machinerie de transcription doit faire face à I) la présence de nucléosomes qui compactent l'ADN plus ou moins étroitement et II) un métabolisme actif de l'ADN (réplication de l'ADN, réparation des dommages). L'activité transcriptionnelle est donc strictement reliée à la structure de la chromatine ainsi qu'au contexte métabolique.

II.B.1. La transcription, l'architecture de la chromatine et les histones

L'ADN contenu dans les noyaux des cellules est condensé dans un complexe nucléoprotéique, appelé chromatine. Les nucléosomes constituent les unités de base de la chromatine. Un nucléosome est composé par un segment d'ADN d'environ 147 paires de base (pb) qui s'enroule autour d'une structure protéique, composée par les histones. Huit histones forment le cœur protéique du nucléosome: les histones H2A, H2B, H3 et H4, chacun présent en deux copies. Une histone de liaison, l'histone H1, lie le cœur d'histones au segment d'ADN qui l'entoure. Des variants d'histones peuvent remplacer les histones canoniques (H2A, H2B, H3 et H4) au cours de certains processus ou spécifiquement dans certains tissus. En exemple, H2AX est un variant de l'histone H2A ubiquitaire et sa phosphorylation contribue à la réponse des dommages à l'ADN; H1t est un variant de l'histone de liaison H1, spécifiquement exprimé en méiose.

Cette compaction de l'ADN en chromatine implique que, au cours de l'élongation transcriptionnelle, la Pol II rencontre sur son chemin des obstacles, les nucléosomes! Pour permettre à la transcription de se dérouler correctement, la chromatine doit changer transitoirement sa structure en modifiant son niveau de compaction *via* des modifications post-traductionnelles (PTM) d'histones et/ou *via* l'éviction de nucléosomes (pour revue Moreno, Giono, Botto, Muñoz, & Kornblihtt, 2015; Luke A Selth, Sigurdsson, & Svejstrup, 2010). De manière intéressante, le processus d'élongation de la transcription et la régulation de la compaction chromatinienne sont strictement interconnectés. Des PTM de la Pol II au niveau du CTD peuvent induire indirectement (via le

recrutement de co-facteurs) une modification des PTM des histones et, éventuellement, leur désassemblage. À leur tour, les PTM des histones régulent l'avancement de la Pol II et donc l'élongation de la transcription.

Les enzymes qui catalysent les PTM des histones, ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine, jouent un rôle essentiel dans la réorganisation de la chromatine.

Les PTM des histones peuvent réguler la transcription I) indirectement, en modifiant l'état de compaction de la chromatine ou II) directement, *via* l'interaction avec des facteurs d'élongation de la transcription ou avec des remodeleurs de la chromatine. Il existe différents types de modifications d'histones. Les plus connues sont l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et la sumoylation. A l'heure actuelle plus de 200 PTM d'histones ont été identifiées et caractérisées et d'autres ont été identifiées mais pas encore caractérisées; la liste est encore en augmentation (Zhao & Garcia, 2015). Les modifications des histones peuvent se localiser au niveau du promoteur et réguler ainsi l'initiation de la transcription et/ou le long de la région codante en influençant l'élongation de la transcription.

L'acétylation des histones est associée à un état transcriptionnel actif. L'état d'acétylation des histones est très dynamique au niveau des régions transcriptionnellement actives. En effet, l'acétylation des histones au niveau des promoteurs et de la région codante des gènes est liée à une activation de l'élongation. Dès le passage de la Pol II, le recrutement des histones désacétylases (HDAC) permet la désacétylation des histones. De manière intéressante, *Elongator,* une histone acétyltransférase (HAT), peut directement s'associer à la Pol II en stimulant son mouvement le long de la région codante.

La méthylation des histones peut être associée à un état permissif ou répressif de la transcription, en fonction du résidu méthylé et en fonction du nombre des groupes méthyles transférés (un, deux ou trois). Les méthyltransférases MLL(1-5) et SET(1A-1B) di- et tri-méthylent H3K4 au niveau des promoteurs. Cela est associé à l'ouverture de la chromatine et à l'activation de la transcription. Au contraire, SUV39(H1-H2) et G9A triméthylent H3K27 en créant un environnement répressif pour la transcription (pour revue Shandilya & Roberts, 2012). Le complexe COMPASS (*Complex Proteins Associated with Set1*) triméthyle H3K4 au niveau du promoteur et stimule la transcription (pour revue Shilatifard, 2012). De manière intéressante, COMPASS est recruté par la Ser5 phosphorylée au niveau du CTD, ce qui crée une sorte de boucle d'amplification. La méthyltransférase SET2 méthyle H3K36, une modification associée à une élongation active de la transcription.

La monoubiquitination de H2BK120 est associée aussi à une stimulation de la Pol II. Cette modification est associée à un changement de la structure chromatinienne et/ou active la di et triméthylation de H3K4 et de H3K79 par le complexe COMPASS (pour revue L A Selth & Sigurdsson, 2010).

Ces exemples montrent une interconnexion étroite entre les modifications des histones, la structure chromatinienne et la transcription et aussi entre les complexes de modification des histones et la machinerie d'élongation.

En plus des PTM des histones, qui agissent surtout en modifiant l'accessibilité de la chromatine, des facteurs de remodelage de la chromatine agissent plus spécifiquement dans le désassemblage et réassemblage des nucléosomes. Ces facteurs sont des *chromatin remodelers* et des chaperonnes d'histones. La chaperonne d'histones FACT (Facilitates Chromatin Transcription) régule directement l'élongation de la transcription en stimulant la dissociation du dimère H2A/H2B au moment du passage de la Pol II. De manière intéressante,

certains *remodelers* et chaperonnes d'histones peuvent interagir directement avec la machinerie de transcription (pour revue L A Selth & Sigurdsson, 2010).

Enfin, la méthylation de l'ADN au niveau de cytosines sur l'atome de carbone numéro 5 (5mC) contribue aussi à la régulation de l'activé transcriptionnelle. Chez les mammifères cela se produit surtout au niveau d'îlots CpG. La méthylation de l'ADN est établie et maintenue par les ADN méthyltransférases DNMTs et induit une compaction majeure de l'ADN. Ceci est associé à une répression transcriptionnelle. Une hyperméthylation de l'ADN est donc observée au niveau de *loci* transcriptionnellement inactifs (empreinte parentale, chromosome X inactivé) et au niveau des régions d'hétérochromatine (pour revue Nieto Moreno, Giono, Cambindo Botto, Muñoz, & Kornblihtt, 2015).

En conclusion, la transcription est régulée par l'état épigénétique de la chromatine: les PTM des histones et l'état de méthylation de l'ADN influencent le niveau de compaction de la chromatine et ainsi son accessibilité par la machinerie de transcription. En outre, des interactions directes entre la machinerie de la transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine et chaperonnes d'histones ont aussi été mises en évidence.

II.B.2. La transcription et les cohésines

Les cohésines forment une structure à anneau qui entoure l'ADN; elles se mettent en place au cours de la réplication et elles assurent la cohésion entre les chromatides sœurs.

Est-ce que les complexes des cohésines sont compatibles avec la transcription?

Des études chez la levure montrent que la Pol II mobilise les cohésines en les faisant glisser le long de l'ADN, au dehors des régions géniques, au cours de la transcription. Néanmoins, les cohésines restent fonctionnelles et continuent à maintenir les chromatides sœurs au cours de leur déplacement (pour revue Borrie, Campor, Joshi, & Gartenberg, 2017). De manière intéressante, il a été récemment montré que la transcription peut relocaliser les cohésines le long de la chromatine aussi chez les mammifères (Busslinger et al., 2017).

Un rôle des cohésines a été associé à la régulation transcriptionnelle, *via* leur collaboration avec le facteur CTCF (CCCTC-binding factor) et le complexe coactivateur transcriptionnel Mediator (pour revue (Braccioli & de Wit, 2019; Ishiguro, 2019; Wendt & Peters, 2009). CTCF est une protéine à doigt de zinc (zinc finger) qui lie l'ADN à des sites spécifiques et régule son architecture, ainsi que l'expression génique, via l'activation ou répression de la transcription. Des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré une forte colocalisation entre les cohésines et le facteur CTCF (Busslinger et al., 2017). De manière intéressante, l'invalidation conditionnelle de CTCF dans les testicules induit une stérilité des souris mâles. Tandis que la progression méiotique est normale, la spermiogénèse est altérée à cause de défauts de compaction de l'ADN, de rétention d'histones et de défauts de chargement des protamines (Hernández-Hernández, Lilienthal, Fukuda, Galjart, & Höög, 2016). En plus, une protéine CTCF-like (CTCF-L, ou BORIS) est exprimée spécifiquement dans le testicule. CTCF-L est une protéine de liaison à l'ADN avec un domaine central de 11 doigts de zinc qui est très similaire au domaine zinc-finger de CTCF. CTCF-L est exprimé de manière transitoire dans les spermatocytes préméiotiques STRA8-positives, tandis que CTCF est exprimé de manière ubiquitaire dans le testicule. Des analyses par ChIP-Seq montrent que CTCFL est enrichi aux promoteurs

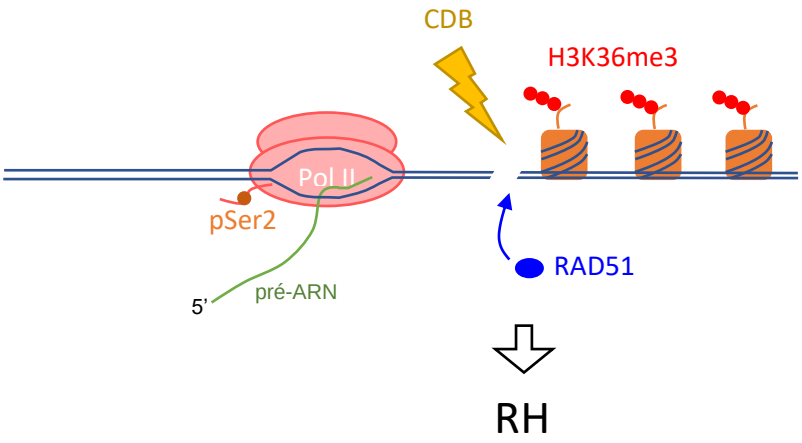


Figure 22: Lien entre une transcription active et la réparation des Cassures Double Brin (CDB) de l'ADN par Recombinaison Homologue (RH). La localisation d'une CDB dans la région codante d'un gène transcriptionnellement actif (présence de la Pol II phosphorylée au niveau de la Ser2) favorise le recrutement d'acteur de la RH, tels RAD51. La présence de la marque activatrice H3K36me6 est associée a un recrutement plus important de RAD51.

transcriptionnellement actifs qui sont marqués par H3K4me3 et occupés par la Pol II phosphorylée sur la Ser5 du CTD (pPol2-Ser5) (Sleutels et al., 2012). En revanche, aux sites de liaison de CTCF, H3K4me3 et la pPol2-Ser5 sont majoritairement exclus. Ceci suggère que dans les testicules il pourrait exister un lien entre architecture de la chromatine/cohésines et transcription et que ce lien pourrait être médié par CTCF et CTCFL. À cela se rajoute la démonstration que CTCF peut interagir avec PRDM9 dans les testicules (Grey et al., 2017), ce qui pourrait suggérer un lien supplémentaire entre chromatine, transcription et sites des cassures double brin.

Le mediator est un coactivateur de la machinerie de transcription. Il se localise (analyses par ChIP-Seq) au niveau d'*enhancers* et de promoteurs de gènes transcriptionnellement actifs. De manière intéressante, les cohésines peuvent colocaliser avec le mediator et la machinerie de transcription. En particulier, les cohésines sembleraient colocaliser alternativement (de manière exclusive) avec le mediator ou les sites CTCF. Une colocalisation avec le mediator est généralement associée à une présence, au même site, de la Pol II et donc à une transcription active ; tandis qu'au niveau des sites où les cohésines colocalisent avec CTCF, la Pol II est généralement absente, et donc la transcription est inactive (Kagey et al., 2010).

II.B.3. La transcription et les dommages à l'ADN

La relation entre la transcription, les dommages à l'ADN et leur réparation est complexe (pour revue Khobta & Epe, 2012). En effet, le lien entre ces processus peut être à la fois de caractère positif et négatif. La transcription aux sites de dommages à l'ADN peut avoir des conséquences délétères pour les cellules et donner lieu à des transcrits *missense* (mutations d'un aminoacide), *nonsense* (codon de stop prématuré) ou à des mutations telles que les délétions ou les translocations. Ce n'est donc pas étonnant que les dommages à l'ADN soient souvent associés à un arrêt de la Pol II, et donc de la transcription, pendant le processus de réparation. D'autre part, la transcription peut jouer un rôle favorable à la réparation de l'ADN: une transcription active rend l'ADN plus accessible à la machinerie de réparation. En outre, la Pol II peut directement interagir (et donc recruter) des protéines impliquées dans les processus de réparation.

Le Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER ou TCR) est la voie de réparation la mieux connue pour son lien avec la transcription. Le Nucleotide Excision Repair (NER) est une voie de réparation qui permet d'exciser des sections de nucléotides contenant une lésion et d'utiliser le brin complémentaire non-endommagé comme matrice. De manière intéressante, la voie du NER est souvent couplée à la transcription (au niveau de gènes activement transcrits) et prend alors le nom de TC-NER. Dans le TC-NER, la Pol II en élongation détecte le dommage à l'ADN et bloque son élongation au site endommagé en favorisant le recrutement de facteurs de réparation (pour revue Pani & Nudler, 2017).

De manière intéressante, une protéine impliquée dans le processus de TC-NER, CSA, semblerait également jouer un rôle dans un mécanisme de réparation des CDBs par recombinaison homologue (RH) aux sites transcriptionnellement actifs (pour revue Ouyang, Lan, & Zou, 2017). Les CDBs constituent les cassures les plus délétères pour une cellule et peuvent engendrer une instabilité génétique suite à des défauts de réparation. Les CDBs peuvent être réparées par *non-homologous-end-joining* (NHEJ) ou par RH. Il est assumé que cette dernière voie assurerait une fidélité plus importante. De manière intéressante, plusieurs études

indépendantes ont montré une corrélation, au niveau des sites de CDBs, entre le recrutement de facteurs clés de la RH, tel RAD51, et une transcription active. Cela suggère que les CDBs situées au niveau de gènes transcriptionnellement actifs seront de préférence réparées par RH (Aymard et al., 2014; Iacovoni et al., 2010 ; pour revue Ouyang et al., 2017). Cela est conforté par l'observation que la marque activatrice de la transcription H3K36me3 est associée à un majeur recrutement de RAD51 au niveau des CDBs situées dans les régions transcriptionnellement actives (**Figure 22**). En outre, l'invalidation de la H3K36 méthyltransférase SETD2 diminue le recrutement de RAD51 au niveau de ces sites de cassure (Aymard et al., 2014).

Le lien entre réparation de dommages à l'ADN et transcription est donc bien connu pour la voie du TC-NER mais reste encore confus pour les autres voies de réparation, telle la recombinaison homologue. Notons aussi que certains acteurs de la réparation de l'ADN peuvent s'associer au complexe de transcription.

II.C. Complexité transcriptomique et dynamique transcriptionnelle du testicule

Le progrès des technologies de séquençage à haut-débit a permis de mettre en évidence l'énorme complexité du transcriptome testiculaire. Le nombre de transcrits détectés dans les testicules dépasse, en effet, le nombre détecté dans les autres organes (cerveau, cœur, foie, poumons). Ceci est vrai pour des transcrits de toute nature: ARNm, ARN non codants et séquences intergéniques (pseudogènes, éléments transposables) (Soumillon et al., 2013). Cette complexité est augmentée par l'existence d'un grand nombre de transcrits et d'isoformes de transcrits qui sont spécifiques du testicule, telles des formes d'épissage alternatif, des promoteurs alternatifs ou des transcrits tronqués (pour revue Chalmel & Rolland, 2015). L'analyse transcriptomique de populations testiculaires isolées: cellules de Sertoli, spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes, a permis de mettre en évidence l'existence de transcrits spécifiques à chaque population (Hammoud et al., 2014; Maezawa, Yukawa, Alavattam, Barski, & Namekawa, 2018; Margolin, Khil, Kim, Bellani, & Camerini-Otero, 2014; Soumillon et al., 2013). Ces changements transcriptomiques sont fortement associés à une réorganisation dynamique de la chromatine au cours de la spermatogenèse, à des changements épigénétiques majeurs, à des variations de l'état transcriptionnel des cellules et à des régulations post-transcriptionnelles des ARNm.

Dans les dernières années, l'augmentation d'analyses en cellules uniques (Single-cell RNA-seq) a permis de tracer les changements transcriptomiques à l'échelle de chaque sous-population germinale. Ceci a mis en évidence l'énorme hétérogénéité transcriptomique des cellules au cours de la spermatogenèse. Le transcriptome change de manière progressive avec la différenciation des CG ; des populations de transcrits spécifiques permettent de discriminer chaque stade de la spermatogenèse, dès la spermatogonie souche jusqu'au spermatozoïde (Ernst, Eling, Martinez-jimenez, Marioni, & Odom, 2019).

Les analyses transcriptomiques identifient donc un grand nombre de transcrits spécifiques de chaque stade de la spermatogenèse. Cependant, il ne faut pas oublier, que le programme transcriptomique d'une cellule à un moment « t », ne dérive pas uniquement de l'activité transcriptionnelle de la cellule mais, plutôt, d'un fin équilibre entre **la transcription, la stabilisation et la dégradation des ARN.** Une cellule peut donc contenir

un large panel de transcrits sans, pourtant, avoir une forte activité transcriptionnelle. Nous avons vu, dans les chapitres précédents, que la transcription est influencée par une multitude de processus cellulaires, tels le remodelage de la chromatine et les modifications épigénétiques, la réplication de l'ADN et la réparation de dommages à l'ADN.

Nous avons donc vu que différents niveaux de régulations font de la transcription un processus hautement dynamique. Ce dynamisme permet aux cellules de s'adapter à la complexité de l'environnement cellulaire, aux changements de ce dernier et aux stress environnementaux et intrinsèques qu'une cellule peut subir (pour revue (Hager, Mcnally, & Misteli, 2009). Ces régulations transcriptionnelles ciblent des gènes/régions spécifiques de la chromatine.

Les cellules germinales constituent un étonnant exemple d'inactivations transcriptionnelles à l'échelle du génome. Ces cellules peuvent, au cours de leur vie, **passer d'états transcriptionnellement actifs (ou hyperactifs) à des états transcriptionnellement silencieux**, aux cours desquels la transcription est globalement inactive. Ceci pourrait permettre aux CG de faire face aux changements majeurs qu'elles subissent au cours de la gamétogenèse. Les étapes associées à une inactivation de la transcription sont: I) l'activation du génome embryonnaire à la suite de la fusion des gamètes; II) la compaction de l'ADN dans la tête des spermatozoïdes et III) la spécification des cellules germinales primordiales (CGP). En outre, un *silencing* transcriptionnel semblerait être présent au moment de la transition mitose/méiose.

Dans les prochains paragraphes je traiterai ces phénomènes d'inactivation transcriptionnelle dans « l'ordre chronologique »: à partir des CGP jusqu'à arriver aux embryons.

II.C.1. Quiescence transcriptionnelle des CGP

But in many embryos, the cells that enter the germ line, the primordial germ cells, avoid the crunch and find a quiet spot. If only for a little while, and sometimes only parking one frenetic activity. There they plot their fate with care and know their time and important job will come.

Oulhen and Wessel, 2017

Les CGP doivent se maintenir dans un état de pluripotence et garder leur potentiel pour devenir des gamètes hautement différenciés. Elles doivent donc finement réguler leur programme transcriptionnel: éteindre les gènes somatiques, exprimer des gènes de pluripotence et réprimer leur différenciation, en se maintenant dans un état transcriptionnellement « quiescent ». Chez plusieurs organismes, cet état de quiescence est maintenu grâce à un phénomène de *silencing* transcriptionnel. À ce stade, les mécanismes d'inactivation temporaire de la transcription sont spécifiques aux différents organismes et ils ont été bien caractérisés dans deux modèles d'étude: la mouche (Drosophile melanogaster) et le ver (Caenorhabditis elegans) (pour revue Blackwell, 2004; Oulhen & Wessel, 2017).

a) Drosophile

Chez la Drosophile il existe une zone du cytoplasme ovocytaire, appelée plasme germinal, riche en ARN et protéines maternelles nécessaires pour le développement germinal (*germ-cell determinants*) et qui apparaissent comme des granules (granules P). Chez la Drosophile, les CGP, dérivent de cellules

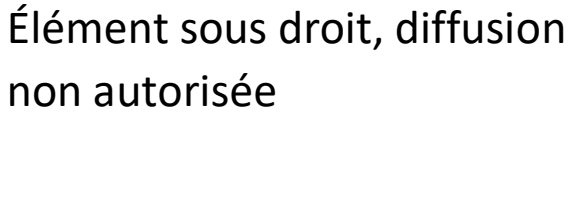


Figure 23: Origine des cellules germinales chez la Drosophile. Chez la Drosophile le zygote effectue une série de divisions rapides en générant un syncytium multi-nucléaire. Les noyaux qui migrent au pole postérieur où englobent le plasme germinal deviennent des cellules germinales primordiales. (ou cellules polaires). Ces cellules sont les premières à s'individualiser. Tiré de *Seydoux et al., 1997*



Figure 24: Inactivation transcriptionnelle des cellules germinales primordiales chez la Drosophile. Visualisation du pôle postérieur d'un embryon de Drosophile. Immunomarquage de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la Ser2 (pPOL2, vert). Les cellules germinales (flèche blanche) sont marquées par DDX4 (rouge). La pPol2 est absente dans les cellules germinales primordiales tandis qu'elles est présente dans les noyaux des cellules somatiques (pointe de flèche blanche). Modifié de *Seydoux et al. 1997*

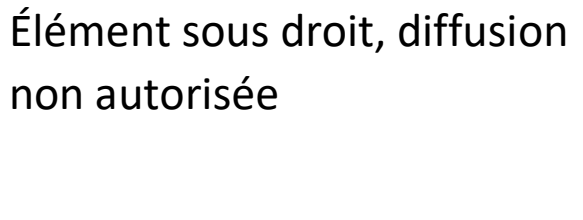


Figure 25: Origine des cellules germinales chez C. elegans. Chez C. elegans, le zygote (P0) effectue quatre divisions asymétriques en generant quatre blastomères somatiques (AB, EMS, C et D) et les blastomères germinaux P1, P2, P3 et P4 qui contiennent les granules P. P4 se divise symétriquement et donne naissance à deux cellules germinales primordiales Z2 et Z3. Tiré de *Seydoux et al. 1997*



Figure 26: Inactivation transcriptionnelle des cellules P chez C. elegans. Visualisation d'un embryon de C. elegans au stade 15 cellules. Immunomarquage de PIE-1 (rouge) et de l'ARN polymérase 2 phosphorylée sur la Ser2 (pPOL2, vert). La cellule P3 (flèche blanche), contenant les granules P, est positive pour PIE-1 et transcriptionnellement inactive (absence de pPOL2). Les cellules somatiques sont négatives pour PIE-1 (pointe de flèche blanche) et sont marquées pour la pPOL2. L'ADN est marqué en bleu (DAPI). Modifié de *Seydoux et al. 1997*

embryonnaires qui vont se localiser à l'extrémité postérieure de l'embryon en englobant le plasme germinal (pour revue Mahowald, 2001; Santos & Lehmann, 2004) (**Figure 23**).

En 1976, il a été montré par une expérience d'incorporation d'uridine-H^3 l'absence d'activité néo-transcriptionnelle dans les CGP (Zalokar, 1976). Seydoux et al. montrent, en 1997, l'absence de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la Ser2 (pPol2) (Seydoux & Dunn, 1997) (**Figure 24**). Le mécanisme de répression transcriptionnelle repose sur un ARN non codant, le *polar granule component* (pgc) localisé au niveau du plasme germinal dans l'ovocyte et retrouvé uniquement dans les CGP après leur spécification. Pgc interagit avec P-TEFb pour inhiber la phosphorylation et l'activation de la Pol II (phosphorylation de la Ser2 du CTD, pPol2). En plus de l'absence de détection de la pPol2, les CG présentent un faible niveau de méthylation de H3K4, marque activatrice de la transcription (C. E. Schaner, Deshpande, Schedl, & Kelly, 2003; Seydoux & Dunn, 1997). L'invalidation de *pgc* induit, à la fois, une augmentation de la pPol2 et une augmentation de la méthylation de H3K4. Malgré cette activation aberrante de la transcription, les CG se différencient du reste des cellules somatiques mais meurent précocement.

Un deuxième mécanisme d'inhibition régulation transcriptionnelle repose sur l'action de nanos et son partenaire pumilio, deux autres composants du plasme germinal. Nanos est une protéine de liaison aux ARN qui régule la traduction et est impliquée indirectement dans l'inhibition transcriptionnelle. En effet, Nanos et son partenaire Pumilio, inhibent, de manière gène-spécifique, la traduction d'ARN codant pour des activateurs de la transcription et donc inhibent l'activation transcriptionnelle (Sonoda & Wharton, 1999). L'invalidation de Nanos ou Pumilio induit des défauts de transcription : activation de la transcription dans les CG avec une expression aberrante de gènes somatiques.

b) Caenorhabditis elegans

Chez le nématode *C. elegans*, de manière similaire à la Drosophile, il existe des granules polaires (granules P) dans l'ovocyte, riches en ARN et en protéines maternelles, essentiels pour le développement germinal. Le zygote entame 4 divisions successives asymétriques: à chaque division, les granules P sont repartis entièrement dans une des deux cellules filles. La cellule fille contenant les granules P est appelé cellule P : P1 après la première division jusqu'à P4 après la quatrième division. La cellule P4 se divise une fois de manière symétrique: les deux cellules filles, Z2 et Z3, constituent les deux premières cellules germinales primordiales qui vont générer environ 1000 cellules germinales dans la gonade adulte (**Figure 25**). Les CG dérivent donc des cellules qui héritent les granules P (cellules P), tandis que les autres cellules (sans granules P) entament la voie somatique.

Les cellules contenant les granules P sont facilement distinguables par leur inactivation transcriptionnelle qui se manifeste par l'absence de marquage de la forme active de la Pol II, phosphorylée sur la Ser2 (pPol2) (Seydoux & Dunn, 1997) (**Figure 26**). Une protéine de liaison aux ARN, PIE-1, est responsable de cette inactivation globale de la transcription. PIE-1 agit directement sur la machinerie transcriptionnelle en inhibant la phosphorylation du CTD de la Pol2 par p-TEFb (Batchelder et al., 1999; Mello et al., 1996). Ce mécanisme est similaire à celui impliquant *pgc* chez la Drosophile. En absence de PIE-1, toutes les cellules montrent une activité transcriptionnelle et elles s'engagent vers un destin somatique. Ceci suggère que le destin germinal est dépendant de l'inactivation transcriptionnelle, ce qui diffère par rapport à la Drosophile où, en absence de

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 27: Inactivité transcriptionnelle dans les Cellules Germinales Primordiales (CGP) chez la souris. CGP dans un embryon de souris de 8,75 jpc. Les CGP sont identifiées par le marqueur stella (vert, marqueur spécifique des CGP). Les CGP ne sont pas marquées pour l'ARN polymérase 2 phosphorylée sur la Ser2 (rouge, pPOL2) ni pour H3K9me2 (gris, en haut), marque répressive de la transcription, mais elles sont marquées pour H3K27me3 (gris, en bas). L'ADN est marqué en bleu (DAPI). La pointe de flèche blanche indique une CGP. Barre: 100 µm. Modifié de *Seki et al. 2007*

pgc, les cellules entament la voie germinale, malgré la transcription active, et meurent peu après (Seydoux & Dunn, 1997 pour revue Oulhen & Wessel, 2017).

Contrairement à la Drosophile, chez C. elegans les CG montrent un haut niveau de H3K4me2, marque active de la transcription. Cela assure une reprise de la transcription rapide dans la cellule fille qui n'hérite pas des granules P et qui va donc entamer la voie somatique. Au moment où la lignée germinale est formée, PIE-1 disparaît; cependant, le *silencing* transcriptionnel est maintenu, avec une perte des marques actives H3K4me2, H3K4me3 et H4K8ac (C. E. Schaner et al., 2003 ; pour revue C. Schaner, 2006). L'homologue de Nanos du nématode est également impliqué dans la cascade menant au *silencing* des CGP.

c) Souris

Différemment à la Drosophile et à C. elegans, où la spécification des CGP se met en place très tôt, aux cours des premières divisions embryonnaires, chez la souris les CGP se séparent de la lignée somatique tardivement, au cours de la gastrulation (Mclaren, 2003). Les CGP n'héritent donc pas directement de déterminants germinaux d'origine maternelle (Drosophile et C. elegans) mais doivent subir un processus de reprogrammation pour rester dans un état de pluripotence (Voir chapitre I.A.I *Les Cellules Germinales Primordiales*). Cette reprogrammation se base donc sur la répression ciblée de gènes somatiques (gènes *Hox*) et l'allumage de gènes de pluripotence. Des régulateurs transcriptionnels (PRDM1, PRDM14, AP2γ) sont impliqués dans cette reprogrammation. Au moment de leur spécification, les CGP sont donc transcriptionnellement actives et le mécanisme qui se met en place est très différent de celui de la Drosophile et de C. elegans .

Cependant, Saitou et al. ont décrit, en 2007, une inhibition globale de la transcription dans les CGP qui aurait lieu au cours de leur migration (Yamaji et al., 2007) (**Figure 27**). À partir de 7,5 jpc, les CGP subissent de nombreuses modifications épigénétiques, telles l'acquisition de la mono- et di-méthylation de H3K9 et une augmentation de H3K27me3, marques répressives de la transcription. Ces marques d'histones sont accompagnées par un niveau faible de Pol II phosphorylée, à la fois au niveau de la Ser5 et de la Ser2. Ceci est confirmé par un niveau faible d'incorporation de BrUTP dans les CGP à ce stade, par rapport aux cellules somatiques. Cet état de *silencing* transcriptionnel est maintenu jusqu'à 9,25-10,5 jpc.

Le régulateur traductionnel *Nanos3* est le seul membre de la famille Nanos exprimé dans les CGP murines à partir 7,25 jpc, et joue un rôle fondamental pour le bon développement des CGP. Cependant, les mutants invalidés pour *Nanos3* ne montrent pas d'altérations épigénétiques ni une activation aberrante de la transcription (Yamaji et al., 2007). *Nanos3* n'est donc pas requis pour le *silencing* dans les CGP murines bien que ses homologues jouent un rôle important dans l'arrêt de la transcription dans les CGP de la mouche et du nématode.

En conclusion, la spécification des CG nécessite l'acquisition d'un programme génique spécifique. L'inactivation globale de la transcription semblerait être un mécanisme commun à différentes espèces, nécessaire pour le développement de la lignée germinale. Cette inactivation de la transcription pourrait protéger les CG d'une expression aberrante de facteurs somatiques en réponse, par exemple, à des signaux extracellulaires au cours de leur migration (souris).

A

Élément sous droit, diffusion non autorisée

B

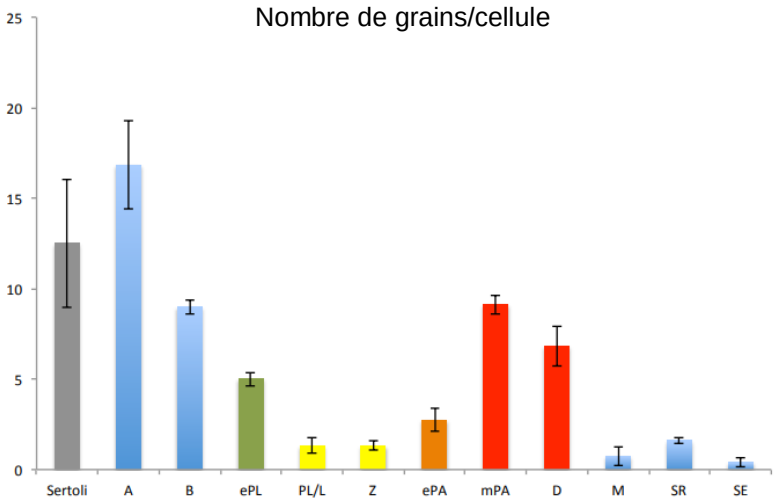


Figure 28: Incorporation de l'Uridine-H^3 et autoradiographie dans des testicules de souris. A) Autoradiographie suite à l'incorporation de l'Uridine H^3. Les spermatocytes I en leptotène (L) ainsi que les spermatides rondes au stade 8 (S8) ont moins de grains d'Uridine H^3 que les spermatocytes I en pachytène (P). Tiré de *V. Monesi 1964*. **B)** Comptage des grains d'Uridine H^3 à partir des autoradiographies publiées par *V.Monesi 1964. A = spermatogonies A ; B = spermatogonies B ; ePL = préleptotène précoce ; PL/L = préleptotène/leptotène ; Z = zygotène ; ePA = début pachytène ; mPA = mi-pachytène ; D = diplotène ; M = métaphases méiotiques ; SR = spermatides rondes ; SE = spermatides allongées*

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 29: Absence de l'ARN polymérase II active en début de méiose. Détection de l'ARN polymérase II active phosphorylée sur la Ser2 (rouge, pRNA pol II) sur des étalements de chromosomes de spermatocytes I. Visualisation des stades de prophase I méiotique par le marquage SYCP3 (vert). L'ARN polymérase 2 active est absente au stade zygotène et réapparait progressivement en pachytène. Les chromosomes sexuels X et Y sont transcriptionnellement inactifs (MSCI). La pointe de flèche blanche indique l'appariement des chromosomes sexuels au niveau de la région pseudoautosomale. Tiré de *Page et al. 2012*

II.C.2. La transcription pendant l'entrée en méiose

En 1964, V. Monesi décrit pour la première fois une absence d'activité transcriptionnelle au moment de l'entrée en méiose des spermatocytes murins (MONESI, 1964). Il a étudié la synthèse d'ARN via l'incorporation de l'uridine-H^3 et autoradiographie, à chaque stade de la spermatogenèse dans des testicules murins (**Figure 28**). L'analyse des images de sa publication initiale nous a permis d'estimer la transcription en quantifiant les grains d'autoradiographie correspondant à l'uridine-H^3. Le nombre de grains uridine-H^3 détectés dans les CG diminue progressivement avec la progression des spermatogonies vers la méiose. En fin de stade préleptotène et en début de stade leptotène le nombre de grains uridine-H^3 compté est comparable aux cellules en métaphase et aux spermatides allongées, connues pour être transcriptionnellement inactives. Au stade pachytène et diplotène, le nombre de grains uridine-H^3 ré-augmente, signe d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle. En 1974, Kierszenbaum et Tres confirment les observations de V. Monesi et, en plus, ils mettent en évidence l'absence d'incorporation d'uridine-H^3 dans la vésicule sexuelle aux stades pachytène et diplotène (Kierszenbaum & Tres, 1974a, 1974b).

Une étude de l'incorporation de polyuridine-H^3 dans des testicules de rats par Morales et Hecht, en 1994, décrit également la détection de moins de grains polyuridine-H^3 dans les spermatogonies et dans les spermatocytes en début de prophase I (du stade préleptotène au stade zygotène), par rapport aux spermatocytes aux stades pachytène et diplotène (Morales & Hecht, 2005). De manière intéressante, les cellules avec moins de néosynthèse d'ARN, montrent un nombre de grains dans le cytoplasme supérieur au nombre des grains nucléaires. Cela suggèrerait que les ARN sont stabilisés et stockés, pour contrebalancer la synthèse réduite de néotranscrits.

En 2012, Page et al. observent ce phénomène d'inactivation/baisse transcriptionnelle en début de prophase I par une autre approche, l'immunomarquage de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la Ser2 (pPol2) sur des étalements de spermatocytes de souris (Page et al., 2012) (**Figure 29**). Ils détectent un signal de la pPol2 très faible en début de méiose, aux stades leptotène et zygotène; ce signal augmente en début de pachytène et apparaît très fort en fin de prophase I, à l'exception de la vésicule sexuelle qui reste transcriptionnellement inactive (MSCI). Dans cette étude, Page et al. proposent que la nécessité pour les spermatocytes d'inhiber la transcription soit liée à la formation et réparation des CDBs et au *synapsis* des chromosomes homologues. Selon leur hypothèse, le *silencing* transcriptionnel permettrait d'éviter la synthèse de transcrits tronqués (*collapse* de la pPol2 au niveau des CDBs) ainsi que d'éviter l'encombrement au niveau de la chromatine pour laisser la place à la machinerie de réparation des cassures et aux éléments du CS.

J.Page et al. proposent ainsi une vision alternative du MSCI: l'inactivation des chromosomes sexuels ne dériverait pas d'un *silencing* « de novo » des chromosomes X et Y, mais plutôt d'une absence de réactivation transcriptionnelle suite à l'inactivation globale en début de prophase I. Ils proposent donc que les chromosomes soient globalement silencés en début de prophase I et qu'au cours du stade pachytène les autosomes soient réactivés transcriptionnellement tandis que les chromosomes sexuels maintiennent leur état inactif.

À la différence du MSCI qui a été largement caractérisé, aucune étude plus approfondie de ce phénomène d'inactivation transcriptionnelle en début de prophase I n'a été effectuée à l'heure actuelle. Cependant, ce

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 30: Baisse de transcription concomitante à la transition des histones en protamines dans les spermatides. Schéma synthétisant le profil de l'ARN polymérase II active phosphorylée sur la Ser2 (pPOL2), des histones, des protéines de transition, des protamines ainsi que de l'hyperacétylation de l'histone H4 au cours de la spermiogenèse (16 stades). Inspiré de *Klaus et al. 2016.*

phénomène est très intriguant, car il survient au moment de la reprogrammation globale du génome et parallèlement aux évènements clés de la prophase I: les cassures double brin et le *synapsis* des chromosomes homologues.

II.C.3. La transcription dans les spermatides

Les cellules post-méiotiques subissent des changements morphologiques majeurs, qui permettent de passer d'une spermatide ronde à un spermatozoïde. Ce processus, appelé spermiogénèse, est classé en 16 stades consécutifs. Les spermatides doivent progressivement acquérir les caractéristiques nécessaires à féconder un ovocyte: petite tête allongée, flagelle, acrosome. L'ADN des spermatides doit devenir extrêmement compact pour être contenu dans la petite tête du spermatozoïde. Ce haut niveau de compaction est possible grâce à la substitution des histones par les protamines. Cela est accompagné par une réduction progressive de l'activité transcriptionnelle jusqu'à l'extinction presque complète de la transcription dans les spermatozoïdes (**Figure 30**). Les expériences de V. Monesi et de Kierszenbaum et Tres d'incorporation de l'uridine-H^3 dans les ARN néotranscrits avaient déjà permis de mettre en évidence la réduction de l'activité transcriptionnelle dans les spermatides, par rapport aux spermatogonies et aux spermatocytes en fin de prophase I (Kierszenbaum & Tres, 1974a; MONESI, 1964). Une analyse approfondie des spermatides 3h après l'injection d'uridine-H3 a mis en évidence la diminution progressive du nombre de grains radioactifs présents dans le noyau des cellules, au fur et à mesure que le spermatides maturent et s'allongent (Kierszenbaum & Tres, 1975). Aucun grain est présent dans les derniers stades de spermatides allongées. Le profil d'expression de la pPol2 dans les spermatides a confirmé les résultats obtenus avec l'incorporation d'Uridine radioactive. En effet, la pPol2 est fortement détectée par immunomarquage jusqu'au stade 7, ainsi que les activateurs transcriptionnels TBP et TFIIB (pour revue Sassone-Corsi, 2002) et des facteurs transcriptionnels testicule-spécifiques (TFIIAt ou ALF) (pour revue Kimmins et al., 2004).

Dans les spermatides rondes, le signal de la pPol2 diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable à partir du stade 10. Cela correspond à la substitution des histones par les protéines de transition (TP1 et TP2 chez les mammifères), des petites protéines basiques qui permettent de compacter l'ADN. Leur incorporation est facilitée par l'état hyper-acétylé des histones, en particulier de l'histone H4. Cette hyperacétylation est associée à une ouverture de la chromatine qui déstabilise les nucléosomes et facilite l'éviction des histones (Klaus et al., 2016). L'incorporation des protéines de transition est très transitoire, car elles sont rapidement substituées par des protéines encore plus basiques, riches en arginines et cystéines, les protamines. Ces dernières jouent un rôle essentiel dans la compaction de l'ADN.

Cette diminution progressive de l'activité transcriptionnelle qui intervient au cours de la spermiogénèse est donc due à des changements physiques de la nature de la chromatine dans les spermatides. L'état d'inactivation de la transcription est maintenu dans les spermatozoïdes, où la chromatine persiste dans un état ultra-compacte.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 31: Représentation schématique de l'activation du génome embryonnaire (EGA) au cours des premières divisions de l'embryon chez la souris. Après fécondation de l'ovocyte, l'embryon passe du stade 1 cellule (PN0-PN3a) au stade blastocyste en environ 3,5 jours (E3.5). En orange, les ARN maternaux, stockés dans l'embryon, diminuent progressivement tandis que la transcription dans l'embryon (profil en vert) augmente progressivement. Cette activation a lieu en deux vagues (Minor wave, Major wave). Parallèlement, l'ADN paternel et maternel subissent une déméthylation globale au moment de la fécondation (profils rouge et bleu) diminution de la méthylation de l'ADN (5mC) qui est convertit en 5-hydroxymethylcitosine (5hmC). L'ADN paternel (bleu) est déméthylé plus rapidement que l'ADN maternel (rouge). Tiré de *Eckersley-Maslin et al. 2018*

II.C.4. La transcription après la fécondation

Dans ce paragraphe je vais traiter de l'activation du génome embryonnaire (EGA, *Embryonic Genome Activation*) qui a lieu dans l'embryon, suite à la fusion des deux gamètes. Au moment de la fécondation, les deux gamètes sont dans un état très différencié et ils présentent de nombreuses différences dans la structure chromatinienne. Les spermatozoïdes sont hautement compactés, l'ADN est fortement méthylé, les histones ont été remplacées par les protamines et le génome est transcriptionnellement inactif. En revanche, l'ovocyte doit encore compléter la métaphase II et l'ADN est dans un état moins méthylé et moins condensé. Fascinante est la capacité de ces deux génomes à fusionner et se reprogrammer pour générer un zygote totipotent. Ce dernier va enchaîner une série de divisions rapides pour former un blastocyste. La reprogrammation du génome du zygote dans l'état de totipotence est un évènement clé indispensable pour assurer l'origine de tous les types cellulaires d'un individu. Au cours de cette reprogrammation, le génome du zygote est transcriptionnellement inactif ; tous les évènements dépendent donc des ARN et des protéines maternelles préalablement stockées dans l'ovocyte. Le zygote passe d'un état transcriptionnellement « silencieux » à un état transcriptionnellement actif au cours de son développement embryonnaire précoce. Cette activation du génome (EGA) a lieu en deux phases, une première vague dite mineure et une deuxième vague dite majeure (pour revue Schulz & Harrison, 2019; Tadros & Lipshitz, 2009) (**Figure 31**). Parallèlement à l'EGA, les ARNs et protéines maternaux sont dégradés. On parle donc de transition maternelle-zygotique (MZT, *Maternal to zygotic transition*). Le *timing* du MZT est dépendant de chaque espèce et varie de 1 heure après fécondation (Drosophile et C.elegans), jusqu'à 10 et 48 heures après (chez la souris et l'homme respectivement).

Comment la MZT est-elle régulée? Deux modèles principaux pourraient expliquer ce phénomène: I) des facteurs qui inactivent la transcription sont présents dans le zygote ou II) des protéines nécessaires à l'activation du génome du zygote ne sont pas présentes au moment de la fécondation. Dans le premier cas, un éventuel répresseur transcriptionnel serait dilué au fur et à mesure que l'embryon se divise ; quand la quantité du répresseur dans une cellule est descendue au-dessous d'un niveau seuil, la transcription est activée. Dans le deuxième cas, les ARN maternaux stockés nécessitent d'être processés et traduits pour mener à l'accumulation d'un facteur activateur de la transcription. Ces deux modèles peuvent coexister (pour revue Pálfy, Joseph, & Vastenhouw, 2017).

De manière intéressante, la MZT coïncide avec des changements épigénétiques majeurs qui pourraient donc être à la base de la régulation transcriptionnelle chez le zygote (l'inactivation suivie par l'activation de la transcription). Ces modifications épigénétiques ont lieu au niveau de l'ADN et au niveau des histones. Chez la souris et l'homme, l'ADN paternel et maternel subissent une déméthylation globale au moment de la fécondation (**Figure 30**). L'ADN paternel subit une déméthylation rapide globale (à part pour certains gènes soumis à empreinte parentale) ; en revanche, l'ADN maternel subit une déméthylation plus lente, dépendante de la réplication de l'ADN (pour revue Sanz, Kota, & Feil, 2010). La déméthylation de l'ADN est associée avec un état chromatinien plus ouvert et accessible aux machineries, telle la machinerie de transcription. Cela pourrait donc aider à l'activation du génome zygotique (pour revue Eckersley-Maslin, Alda-Catalinas, & Reik, 2018; Schulz & Harrison, 2019).

En parallèle, les histones montrent aussi une dynamique de modifications post-traductionnelles (PTM) qui coïncide avec la MZT. En particulier, l'acétylation des histones H3 et H4, qui est associée à une activation

transcriptionnelle, augmente au cours de l'EGA. Plus précisément, H4K8ac, H3K18ac et H3K27ac sont présents sur les promoteurs des gènes actifs au moment de l'EGA chez la Drosophile ; une augmentation de la marque H3K27ac a été identifiée aussi chez la souris. Similairement, la marque activatrice H3K4me3 augmente au moment de l'EGA chez la Drosophile, le Zebrafish et le Xénope. En revanche, chez la souris, des larges domaines de H3K4me3 sont présents avant l'activation du génome; tandis qu'après l'EGA H3K4me3 est relocalisée spécifiquement au niveau des promoteurs transcriptionnellement actifs. H3K27me3 est une marque associée à la répression transcriptionnelle ; elle est largement présente dans l'ovocyte mais diminue au niveau des promoteurs dans le zygote, avant la reprise de la transcription (pour revue Eckersley-Maslin et al., 2018; Schulz & Harrison, 2019).

Dans l'ensemble, l'EGA repose sur des modifications épigénétiques (PTM) qui sont couplées à une ouverture de la chromatine qui favorise le recrutement de la Pol II et l'activation de la transcription. Cependant, les mécanismes à la base de l'état transcriptionnellement inactif de l'embryon précoce demeurent hypothétiques.

II.D. Les modifications épigénétiques au cours de la méiose

Le dynamisme transcriptionnel au cours de la spermatogenèse est fortement associé aux modifications épigénétiques, notamment aux modifications post-traductionnelles (PTM) des histones. Ces dernières influencent le niveau de compaction des nucléosomes, ce qui impacte l'architecture chromatinienne et son accessibilité aux complexes protéiques, notamment la machinerie de transcription, de réplication, de réparation ou de recombinaison. Les PTM des histones sont donc souvent reliées à la régulation de ces processus biologiques fondamentaux. Les profils des PTM des histones varient en fonction des phases de la spermatogenèse. Leurs rôles clés sont mis en évidence par l'invalidation des enzymes qui catalysent les différentes PTM, ce qui est souvent associé à une spermatogenèse défectueuse: dérégulations transcriptionnelles, défauts de réparation de cassures, absence de MSCI.

Dans ce paragraphe, je vais recapituler les dynamiques des PTM d'histones au cours de la phase méiotique de la spermatogenèse. Les profils des différentes PTM ont été décrits dans des études indépendantes, en immunohistochimie sur coupe ou sur étalements de spermatocytes (S. R. Adams et al., 2018; Godmann et al., 2007; Khalil, Boyar, & Driscoll, 2004; Page et al., 2012; SHIRAKATA, HIRADATE, INOUE, SATO, & TANEMURA, 2014; Song, Liu, An, Nishino, & Hishikawa, 2011; Tachibana, Nozaki, Takeda, & Shinkai, 2007). Les spermatocytes aux stades pachytène et diplotène montrent souvent des profils de PTM d'histones distinctes entre les autosomes et gonosomes (XY), à cause du processus de MSCI. Les dynamiques des PTM d'histones dont je vais traiter dans le paragraphe sont schématisés dans la **Figure 32.** Notons qu'il existe différentes études reportant parfois des dynamiques différentes pour une même marque d'histone. J'ai donc fait le choix de ne reporter que les profils traçables (présentation de marquages histochimiques).

En début de prophase I on observe une coexistence de marques d'histone activatrices et de marques répressives de la transcription. Cette période correspond: à la formation des cassures, à la mise en place des cohésines et du CS, à l'inactivation globale de la transcription. Les PTM d'histones peuvent donc être impliquées dans ces différents processus, ce qui pourrait expliquer la concomitance de PTM de nature différentes (activatrice/répressive). Des PTM répressives, telle la H3K9me et H3K27me3, pourraient être

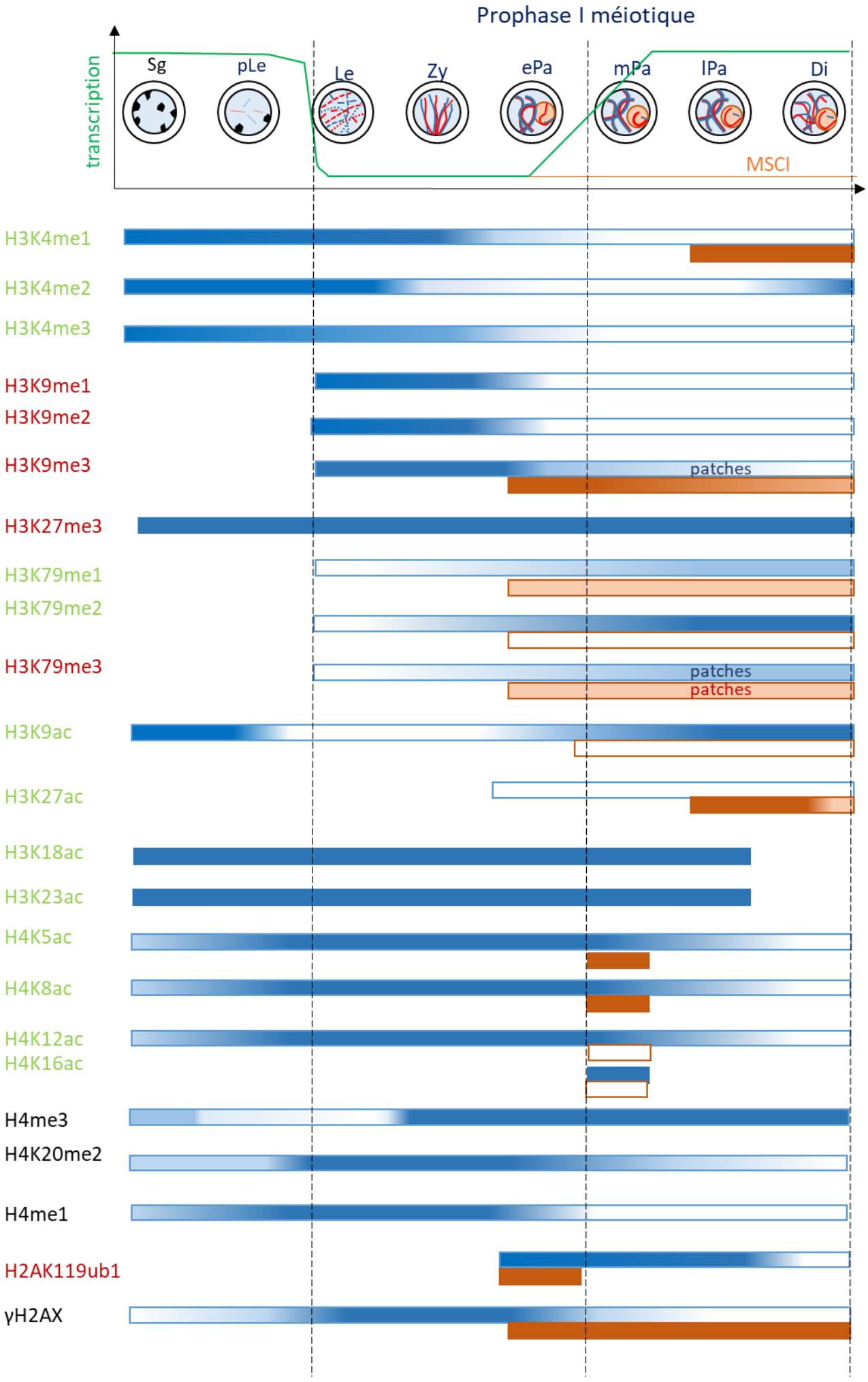

Prophase I méiotique
transcription
Sg
pLe
Le
Zy
ePa
mPa
lPa
Di
MSCI
H3K4me1
H3K4me2
H3K4me3
H3K9me1
H3K9me2
H3K9me3
patches
H3K27me3
H3K79me1
H3K79me2
H3K79me3
patches
patches
H3K9ac
H3K27ac
H3K18ac
H3K23ac
H4K5ac
H4K8ac
H4K12ac
H4K16ac
H4me3
H4K20me2
H4me1
H2AK119ub1
γH2AX

Figure 32: Schéma synthétisant les profils de modifications post-traductionnelles d'histones (PTM) au cours de la prophase I méiotique. En haut, graphique représentation le profil putatif de la transcription (vert) à partir du stade spermatogonie jusqu'au stade diplotène. Une inactivation de la transcription a été décrite en début de prophase I. En fin de prophase I la transcription redémarre par les autosomes; les chromosomes X et Y restent éteints (MSCI). Profils bleus encadrés: profils des PTM des histones au niveau global dans les cellules. En orange, profils de la PTM de l'histone au niveau de la vésicule sexuelle. À l'intérieur des cadres bleus et oranges, plus la couleur est forte, plus la PTM est présente à ce stade; si blanc, absence de la PTM avérée. Marque d'histone indiquée en vert = associée à une transcription active, marque d'histone indiquée en rouge = associée à une transcription inactive. Profils tirés de différentes études, en particulier : *Khalil et al. 2004* ; *Shirakata et al. 2014* ; *Tachibana et al. 2007* ; *Page et al. 2012* ; *Godmann et al. 2007* ; *Song et al. 2011* ; *Adams et al. 2018.*

impliquées dans le *silencing* global de la transcription. Des marques activatrices, mono- di- et tri-méthylation de H3K4 et l'acétylation de plusieurs lysines de l'histone H3 (H3K18ac, H3K23ac) et de l'histone H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac), pourraient rendre la chromatine plus accessible à la machinerie de CDBs, à la machinerie de réparation et aux éléments du CS. En particulier, la marque H3K4me3 déposée par PRDM9 est connue pour son rôle dans la signalisation des *hotspots* en leptotène et zygotène (voir chapitre I.D.1. *Cassures Double Brin*). De manière intéressante, une modification globale des PTM d'histones a lieu à la transition zygotène/pachytène, juste avant la reprise globale de la transcription et au moment où I) la plupart des cassures sont réparées et II) le CS est quasi-complet. Des marques répressives disparaissent (H3K9me1 et H3K9me2), tandis que des marques activatrices telles H3K79me1 et H3K79me2 et H3K9ac apparaissent. H3K9me3 disparaît, sauf au niveau de zones d'hétérochromatine, notamment au niveau des centromères. La mono- di- et tri-méthylation de H3K4 disparaît en début de pachytène, bien que ces marques soient favorables pour la transcription. Leur enlèvement pourrait indiquer la réparation des cassures. Les acétylations des lysines sur les histones H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac), ainsi que la H4K20me2 persistent plus longtemps, jusqu'en fin de pachytène. De rares PTM (H3K27me3) ne varient pas au cours de la prophase I. D'autres marques d'histones, telles la phosphorylation (γH2AX), l'ubiquitylation (H2AK119ub1) et la sumoylation (non présentée) ont aussi été décrites au cours de la prophase I.

De manière intéressante, les chromosomes sexuels se distinguent des autosomes pour certaines marques d'histones au cours des stades pachytène et diplotène, en concomitance au phénomène d'inactivation transcriptionnelle (MSCI) (Page et al., 2012). En particulier, H3K4me1 et H3K27ac sont enrichies exclusivement au niveau des chromosomes X et Y. H3K9me3, qui marque les zones d'hétérochromatine, est aussi enrichie au niveau de la vésicule sexuelle. Récemment, il a été montré que la marque H3K9me3 est responsable de l'inactivation de la transcription au cours du MSCI; en effet, l'invalidation de la méthyltransférase SETDB1 en prophase I prévient la H3K9me3 et induit une activation transcriptionnelle aberrante des chromosomes X et Y (Hirota et al., 2018). Inversement, des marques activatrices de la transcription comme H3K9ac, H3K79me2, sont absentes au niveau des chromosomes sexuels spécifiquement. D'autres PTM, H4K12ac et H4K16ac, disparaissent plus rapidement au niveau des chromosomes X et Y qu'au niveau des autosomes. L'histone H2A peut aussi subir des modifications au cours de la prophase I. Notamment, l'ubiquitination de la lysine 119 (H2AK119ub1) catalysée par PRC1 est impliquée dans le MSCI (S. R. Adams et al., 2018).

L'invalidation d'enzymes associées aux PTM induit souvent une stérilité chez les souris. La double invalidation des H3K9-lysines méthyltransférases *Suv39h1* et *Suv39h2* induit des défauts de progression en prophase I. Les spermatocytes montrent des défauts de *synapsis* et la plupart meurent par apoptose en pachytène (Peters et al., 2001). G9a est une H3K9 mono- et di-méthyltransférase qui est exprimée dans les spermatogonies ainsi que dans les spermatocytes en début de prophase (leptotène). En absence de G9a, le nombre de CG est significativement réduit et la spermatogenèse ne progresse pas au-delà du stade leptotène (Tachibana et al., 2007). PRC2 catalyse la tri-méthylation de H3K27. La double invalidation de ces deux sous-unités avec activité méthyltransférase, EZH1 et EZH2, induit un arrêt en prophase I (Mu, Starmer, Shibata, Yee, & Magnuson, 2017). PRC1 catalyse l'ubiquitination de H2AK119. Cette enzyme est déjà présente dans les spermatogonies indifférenciées et son invalidation conditionnelle induit une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées et la spermatogenèse ne progresse pas au-delà du mi-pachytène (Maezawa et al., 2017).

DOT1 est la seule enzyme responsable de la méthylation de H3K79. Son activité augmente avec l'avancement de la prophase I, ce qui corrèle bien avec l'augmentation progressive de la détection de H3K79-me1, -me2 et -me3 au cours de la prophase I (Ontoso, Kauppi, Keeney, & San-Segundo, 2014).

Outre les PTM des histones, il existe des variants d'histones qui peuvent également modifier la structure chromatinienne et par conséquence modifier et réguler des processus biologiques telles la transcription, la réparation des cassures, la réplication de l'ADN. Au cours de la spermatogenèse on retrouve plusieurs variants d'histones. Notamment, le variant H2A.X de l'histone H2A, joue un rôle clé au cours de la prophase I. Sa phosphorylation au niveau de la Serine 139 (γH2AX) par les kinases ATM et ATR signalent les CDBs. Cette signalisation est nécessaire pour la réparation correcte des cassures. En effet, l'invalidation de H2AX active le *checkpoint* méiotique et induit un arrêt de la spermatogenèse en prophase I à cause de défauts de réparation (Celeste et al., 2002). Un autre variant de H2A, H2A.Z, est présent surtout en pachytène et participe à la mise en place du MSCI (Greaves, Rangasamy, Devoy, Marshall Graves, & Tremethick, 2006; Guillemette & Gaudreau, 2006). Le variant H3t, corrélé à une structure chromatinienne plus ouverte, apparaît dans les spermatogonies en cours de différenciation et persiste en prophase I. Son invalidation induit une réduction du nombre de spermatogonies et de spermatocytes en début de prophase, ce qui met en évidence son rôle clé dans la différenciation correcte des spermatogonies (Ueda et al., 2017). Un autre variant d'histones, H1t, est spécifique du testicule et est exprimé spécifiquement au stade mi-pachytène. Malgré sa spécificité, il ne semble pas indispensable à la spermatogenèse, car son invalidation n'altère pas la formation des spermatozoïdes (Drabent, Saftig, Bode, & Doenecke, 2000). De nombreux autres variants d'histones, ubiquitaires et spécifiques du testicule, sont exprimés au cours de la spermatogenèse.

En conclusion, les modifications épigénétiques des histones (PTM), ainsi que le chargement de variants d'histones, montrent un profil très dynamique au cours de la prophase I méiotique. Ces modifications pourraient influencer l'état de la chromatine et participer ainsi à la régulation des événements clés de la prophase I : réparation des CDBs, transcription. Des analyses par ChIP-Seq des PTM d'histones à l'échelle chromatinienne ont permis de caractériser certaines signatures d'histones au niveau de sites spécifiques, notamment au niveau des sites des CDBs ou bien des sites d'initiation de la transcription. En outre, un lien direct entre la modification de l'histone H3K9me3 et la transcription au cours de la prophase I est démontré par l'invalidation de SETDB1 (Hirota et al., 2018).

II.E. Les régulations post-transcriptionnelles

L'activité transcriptionnelle est très dynamique et discontinue au cours de la spermatogenèse. Cependant, chaque étape nécessite l'expression de facteurs spécifiques. Les cellules doivent donc garantir la régulation fine du réseau protéique et assurer la traduction des facteurs nécessaires à chaque phase de la spermatogenèse, y-compris au cours des phases transcriptionnellement inactives. Ceci est possible grâce aux régulations post-transcriptionnelles, qui constituent une interface de contrôle entre le transcriptome et le protéome.

Des mécanismes de stabilisation des ARN avaient déjà été mis en évidence grâce aux expériences d'incorporation d'uridine-H^3. En effet, l'analyse de son incorporation longtemps après (jusqu'à 20 jours après injection dans les souris) permettait d'observer des grains dans les stades de spermatogenèse transcriptionnellement silencieux, notamment dans les spermatides en élongation (MONESI, 1964). Plus récemment, l'analyse du transcriptome de populations germinales isolées, par séquençage d'ARN a permis d'identifier un grand nombre de transcrits dans les spermatozoïdes. En tenant compte de l'état transcriptionnellement inactif de ces gamètes, les ARN détectés représentent une population de transcrits synthétisés au cours des phases de spermatogenèse précédentes (méiose, spermatides rondes) et stockés/stabilisés dans les cellules (Soumillon et al., 2013).

En 2017, Naro et al. ont obtenu un résultat similaire suite à l'injection de souris avec de l'Ethynyl-Uridine (EU) qui s'incorpore aux ARN néotranscrits (Naro et al., 2017). L'immunoprécipitation de l'EU, 9 jours après l'injection, permet d'identifier les ARN stabilisés dans les spermatides. Ces ARN sont impliqués dans le développement des spermatozoïdes et dans leurs fonctions principales, notamment la fécondation des ovocytes. Cette stabilisation des ARN permet de contrebalancer le *silencing* transcriptionnel qui se met en place dans les spermatides allongées à cause du fort niveau de compaction chromatinien.

Un processus au cœur de cette stabilisation des ARN est l'épissage alternatif. De manière intéressante, des analyses d'exons ont mis en évidence un grand nombre d'événements d'épissage alternatif dans le testicule (pour revue (Chalmel & Rolland, 2015; Schmid et al., 2013). Plusieurs types d'épissage alternatif ont été identifiés: saut d'exon, UTR 5' alternatif, rétention d'introns. Certains variants d'épissage sont spécifiques de la méiose. La modification de l'épissage d'un même transcrit au cours de la méiose permet de moduler son expression. Naro et al. montrent que certains transcrits testicules-spécifiques communs aux spermatocytes et aux spermatides, peuvent être identifiés dans les spermatocytes en deux isoformes différentes : complètements épissée ou avec un intron non épissé. Cette rétention d'introns fournit aux transcrits une stabilité plus importante, jusqu'au stade spermatides. Cela représente donc une méthode pour stabiliser et stocker les transcrits en vue de la diminution de transcription qui a lieu dans les spermatides.

De manière intéressante, il a été identifié un lien entre ce mécanisme de stabilisation des ARN via un épissage altératif et les PTM d'histones. Notamment, les gènes codants pour des transcrits cibles d'épissages alternatifs sont souvent associés à des marques d'histones activatrices de la transcription (H3K27ac, H3K4me3). Une transcription active de ces gènes est responsable de la rétention d'introns, probablement à cause d'un encombrement stérique et donc à un défaut de chargement du spliceosome (Naro et al., 2017). En accord

avec cela, en fin de prophase I (mi- fin-pachytène et diplotène) la transcription est très active (hypertranscription).

D'autres mécanismes de stockage des ARN ont été décrits dans les CG. Notamment, les ribonucléoprotéines (RNP) lient et protègent les ARNm jusqu'au moment de la traduction. Plusieurs RNP sont exprimées au cours de la gamétogenèse et à des stades bien précis. *Nanos2* et *Nanos3* sont des RNP exprimés dans les cellules germinales primordiales et dans les cellules germinales quiescentes; DAZL apparait tôt, dans les cellules germinales bipotentielles, et persiste au cours de la méiose; SAM68 est une RNP qui participe au métabolisme et à l'épissage des ARN et est exprimée dans les spermatogonies, ainsi qu'en fin de prophase I méiotique et dans les spermatides rondes. Cette liste n'est pas exhaustive car il existe des nombreuses RNP exprimées au cours de la spermatogenèse. Leur invalidation est souvent associée à une stérilité des souris, ce qui démontre leur rôle essentiel (pour revue Paronetto & Sette, 2010). À partir du stade pachytène une organelle cellulaire appelée *chromatoid body* est visible dans le cytoplasme des CG. Cette organelle a été décrite pour son implication dans la séquestration de RNP et d'ARN et participe à leur répression traductionnelle (Meikar et al., 2014).

Le complexe YTHDC2/MEIOC, récemment caractérisé dans différentes études, est aussi impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm (Voir chapitre I.B.3. *Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose,* paragraphe c)

En conclusion, au cours de la spermatogenèse, plusieurs mécanismes post-transcriptionnels sont impliqués dans la régulation de l'expression génique. Ces mécanismes s'ajoutent aux régulations transcriptionnelles présentes au cours de la spermatogenèse.

III. Conclusion

La transition des cellules germinales d'un état mitotique à un état méiotique représente une étape clée de la spermatogenèse et du cycle de reproduction. Cette transition nécessite une ample reprogrammation génique qui inclue I) l'extinction du programme mitotique, avec le maintien de certains gènes mitotiques impliqués également dans le processus méiotique et II) l'allumage du programme méiotique.

Il existe encore de nombreuses inconnues sur la régulation du switch mitose/méiose.

D'une part, l'acide rétinoïque (AR) est considéré LE régulateur clé de l'activation de *Stra8* et donc de l'induction de la méiose. Cependant, son rôle est remis en question.

STRA8 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, mitotiques et méiotiques, au moment du switch mitose/méiose. Pendant longtemps il a été considéré le seul régulateur de l'entrée en méiose, d'où son nom de « gatekeeper ». Cependant, la découverte récente du complexe MEIOC/YTHDC2 montre que d'autres facteurs jouent un rôle fondamental dans la régulation de la transition mitose/méiose. Nous pouvons supposer qu'un réseau de gènes encore à découvrir est impliqué dans la régulation de cette transition

Les régulateurs STRA8 et MEIOC/YTHDC2 agissent respectivement au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel pour réguler l'entrée en méiose. Ceci est concomitant à un phénomène de *silencing* transcriptionnel qui semblerait avoir lieu dès l'initiation méiotique. Cette inactivation de la transcription pourrait être la conséquence du besoin des CG de « cohabiter » avec de nombreuses cassures de l'ADN et des remaniements chromatiniens qui interviennent en début de prophase I méiotique.

Résultats

I. Rôle de l'Acide Rétinoïque dans l'entrée en méiose en vie fœtale

Est-ce que l'Acide Rétinoïque endogène induit réellement l'expression de Stra8 et l'entrée en méiose des cellules germinales femelles? Est-ce que CYP26B1 prévient l'entrée en méiose des cellules germinales mâles via la dégradation de l'AR? Ou d'autres produits de CYP26B1 sont-ils envisageables?

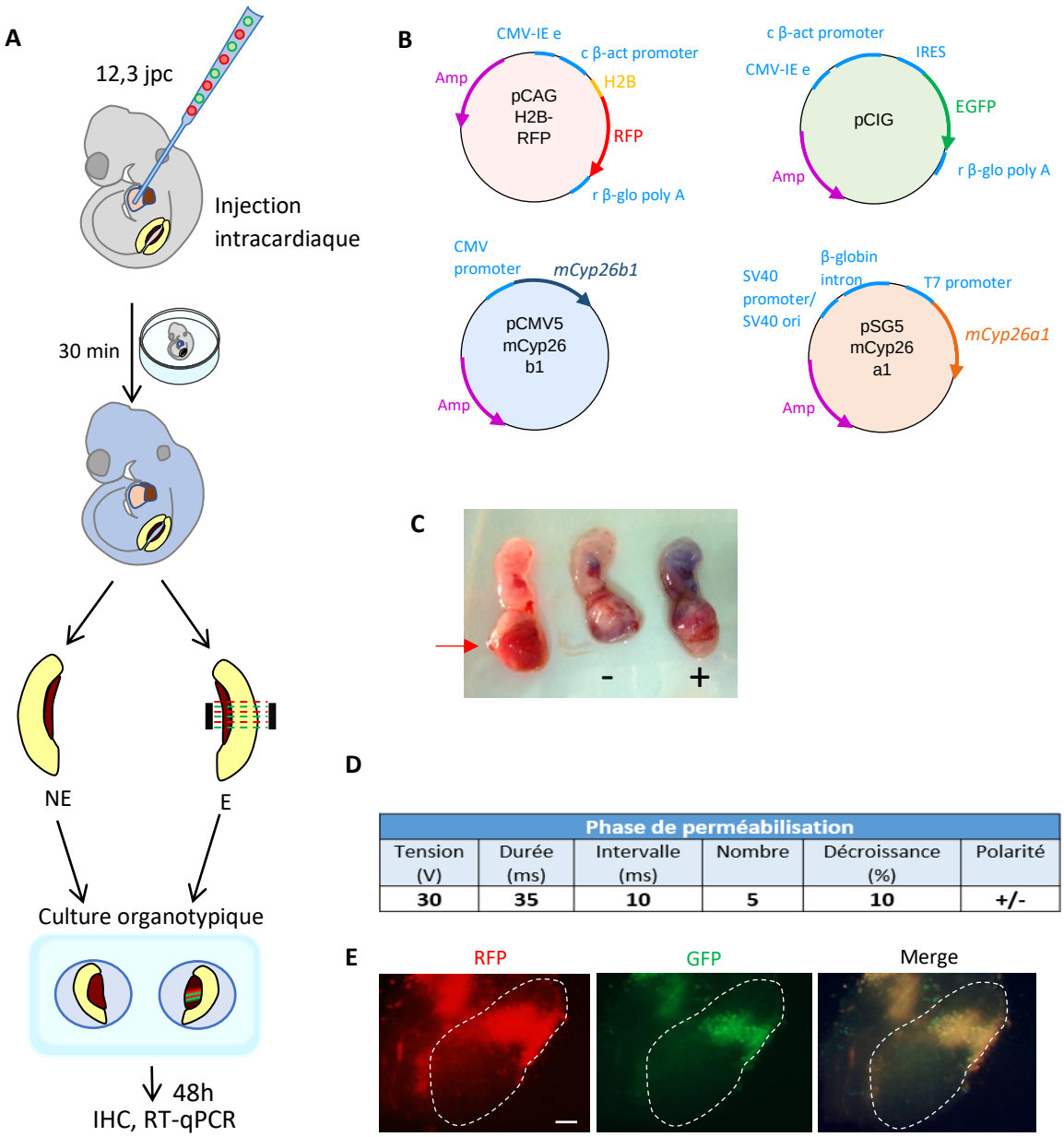
L'AR est considéré comme le principal régulateur de l'expression de *Stra8,* le gardien de l'entrée en méiose, dans les CG fœtales (ovaires) et post-natales (testicules). Cependant, au moment où j'ai commencé la thèse, certaines publications ainsi que des observations du laboratoire, semaient le doute autour du rôle clé de l'AR dans l'induction de *Stra8* dans l'ovaire fœtal.

Les objectifs de ces travaux consistent donc à: 1) clarifier le rôle de l'**AR endogène** au cours de la **vie fœtale**, chez la souris, et, de manière complémentaire, 2) déterminer si l'action "anti-méiotique" de **CYP26B1** est dépendante ou non de la dégradation de l'AR. Aborder ces questions est délicat car le modèle actuel de l'entrée en méiose dichotomique repose sur ces deux grands dogmes: l'induction de *Stra8* par l'AR et la dégradation de l'AR par CYP26B1.

Le point de départ de ce travail consiste en l'analyse de "vieilles" donnés du laboratoire qui mettent en évidence des nouveaux rôles de l'AR dans les gonades fœtales. En particulier, un excès d'AR est capable d'agir à la fois sur les cellules de Sertoli et sur les cellules de Leydig dans les testicules fœtaux. Si l'action de CYP26B1 dans les testicules fœtaux passe par la dégradation de l'AR, l'invalidation de *Cyp26b1* devrait avoir le même effet que l'ajout d'AR. Bizarrement, l'effet de l'AR sur la baisse de la prolifération des cellules de Sertoli n'est pas mimé par l'invalidation de *Cyp26b1*. Ceci met donc un premier doute sur l'action de CYP26B1 sur la dégradation de l'AR dans les testicules fœtaux.

Pour essayer de clarifier les choses, nous avons développé un modèle d'expression ectopique de CYP26B1 ou CYP26A1 dans les ovaires fœtaux. Dans ce modèle, on part du principe que: I) l'inhibition de STRA8 par CYP26B1 représente une certitude, mais on ne sait pas si cela passe par la dégradation de l'AR ou non ; II) la capacité catalytique de CYP26A1 à dégrader spécifiquement l'AR a été démontrée, et son efficacité *in vitro* est supérieure à celle de CYP26B1. Donc, si CYP26B1 prévient l'expression de STRA8 à travers la dégradation de l'AR, l'expression ectopique de CYP26A1 devrait mimer complètement l'effet de CYP26B1.

Dans cette partie des résultats je détaillerai, en premier, le protocole d'électroporation de gonades fœtales. Puis suivra l'article, en cours de soumission, et je terminerai par la présentation de quelques résultats complémentaires.



Phase de perméabilisation					
Tension (V)	Durée (ms)	Intervalle (ms)	Nombre	Décroissance (%)	Polarité
30	**35**	**10**	**5**	**10**	**+/-**

Figure 1 : Électroporation de gonades fœtales. A) Les plasmides sont dilués dans le bleu de trypan et injectés dans le ventricule gauche du fœtus à 12,3 jpc. Après 30 min à 37° et 5% CO2, le fœtus apparaît bleu. Une gonade est électroporée en placent les électrodes de part et d'autre de la gonade. Les deux gonades, une électroporée (E) et la contra-latérale non-électroporée (NE), sont cultivées sur insert pendant 48 h. Après culture, les gonades sont fixées pour l'immunohistochimie (IHC) ou lysées pour l'extraction des ARN et la RT-qPCR. **B)** Cartes des différents plasmides utilisés: pCAG H2B-RFP; pCIG; pCMV5 mCyp26b1; pSG5 mCyp26a1. H2B = Histone 2B; RFP = Red Fluorescent Protein; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein; mCyp26b1 = mouse Cyp26b1; mCyp26a1 = mouse Cyp26a1; Amp = Ampicilline; CMV-IEe = CMV-IE enhancer, cβ-act promoter = chicken β-actine promoter, rβ-glo poly A = rabbit β-globin poly A. **C)** Photographies d'un fœtus non-injecté (à gauche) et de deux fœtus injectés (à droite) après 30 min d'incubation. Au milieu, un fœtus mal injecté, au niveau de la cavité péricardique, avec absence de diffusion de la solution bleue dans la circulation sanguine (-); à droite un fœtus bien injecté complètement bleu (+). Le placenta (flèche rouge) n'est pas détaché des fœtus pour favoriser leur survie et le maintien d'une circulation sanguine active. **D)** Tableau résumant les paramètres d'électroporation utilisés. Tension= tension appliquée, en Volt ; durée= durée du choc électrique ; Intervalle= temps entre deux chocs consécutifs ; Nombre= nombre de chocs par série ; Décroissance= pourcentage de diminution du voltage entre deux chocs consécutifs ; Polarité= polarité du choc électrique. E) Observation au microscope inversé d'un ovaire électroporé avec les plasmides pCAG H2B-RFP et pCIG. On observe une bonne colocalisation des fluorescences rouge (RFP) et verte (GFP) (Merge). Barre: 200 µm

I.A. Mise au point du protocole d'électroporation de gonades fœtales

Notre modèle d'expression ectopique des CYP26 (CYP26B1 ou CYP26A1) dans les gonades fœtales se base sur un protocole relativement élaboré d'électroporation. Ce protocole consiste en trois principales étapes: I) **l'injection intracardiaque** des plasmides d'intérêts dans des embryons à 12,2 jpc, suivi par II) **l'électroporation** des gonades fœtales et III) la culture organotypique de ces dernières (**Figure 1A**).

L'âge des embryons a été choisi par compromis. En effet, à 12,2 jpc les gonades se trouvent en début de différenciation: les CG n'expriment pas encore *Stra8* et les gonades sont plus résistantes aux chocs électriques par rapport à des gonades moins développées. Lors du prélèvement des embryons dans la cavité utérine, ceux-ci sont maintenus à l'intérieur du sac amniotique, avec le placenta relié aux embryons. Lors de l'injection intracardiaque, l'amnios est légèrement déchiré pour permettre l'accès au cœur. Il est important de ne pas abîmer les vaisseaux sanguins et de maintenir le placenta relié au fœtus pour assurer le maintien d'une activité cardiaque et donc d'une circulation sanguine. L'injection est effectuée dans le ventricule gauche. Avant injection, les plasmides sont dilués dans le bleu de trypan. Cette approche a été choisie car, en dépit de la toxicité modérée du bleu de trypan, cela permet de visualiser aisément la solution lors de l'injection et de suivre son flux dans la circulation sanguine. L'étape d'injection est une étape critique : en effet, l'injection doit être continue pour éviter de percer le cœur plusieurs fois avec le capillaire. La délivrance de la solution doit suivre le rythme des battements du cœur pour éviter de remplir trop le ventricule avec la solution « exogène », ce qui provoquerait un reflux. Si la procédure d'injection est effectuée correctement, le cœur continue à battre et les vaisseaux sanguins de l'embryon deviennent bleus au fur et à mesure que la solution plasmidique avance dans la circulation sanguine: les premiers vaisseaux bleus apparaissent au niveau de la tête de l'embryon, du bas du corps et du placenta. Après 30 min, les embryons sont complétement bleus. À ce stade de développement, les gonades fœtales sont vascularisées, ce qui permet à la solution plasmidique de les rejoindre. Si l'injection a été mal effectuée (battements cardiaques interrompus ou solution injectée au dehors du cœur), l'embryon ne devient pas bleu; dans ce cas, il n'est pas pris en compte pour la suite des expériences. À titre d'exemple, une injection dans la cavité péricardique ne colore que le pourtour du cœur sans diffusion au reste de l'embryon (**Figure 1C**). Après incubation des embryons, les gonades sont électroporées. En premier, nous prélevons une des gonades qui constituera la gonade contrôle non-électroporée. L'autre gonade est ensuite électroporée dans le fœtus, en positionnant les électrodes de part et d'autre de la gonade. Cette seconde étape est critique : en effet, les électrodes doivent être positionnées assez près de la gonade pour que le courant passe à travers, mais pas trop proches pour ne pas abîmer le tissu gonadique. Les deux gonades, électroporée (E) et non-électroporée (NE), sont cultivées sur insert pendant 48 h. Après culture les gonades ont un âge équivalent à 14,5 jpc: la quasi-totalité des CG exprime STRA8 dans les ovaires, tandis que dans les testicules la plupart des CG sont en quiescence.

Comme montré dans le manuscrit qui suit, pour valider le protocole d'électroporation nous avons injecté les plasmides pCAG H2B-RFP (don du Dr S. Tajbakhsh), exprimant l'histone H2B couplée à la *Red Fluorescence Protein* (RFP) et pCIG, exprimant la protéine *Green Fluorescence Protein* (GFP) (**Figure 1B**). Après les 48 h de culture organotypique, nous avons observé la fluorescence au microscope inversé (**Figure 1E**) et validé la présence de cellules gonadiques RFP-positives sur coupes (**Figure 2A**). En parallèle, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de la GFP: son expression est augmentée spécifiquement dans les gonades

électroporées (**Figure 2B**). Pour la suite des expériences nous avons électroporé le plasmide codant pour *Cyp26b1* (pCMV5-mCyp26b1, don du Dr. Hajima Takeuchi) ou le plasmide codant pour *Cyp26a1* (pSG5-mCyp26a1).

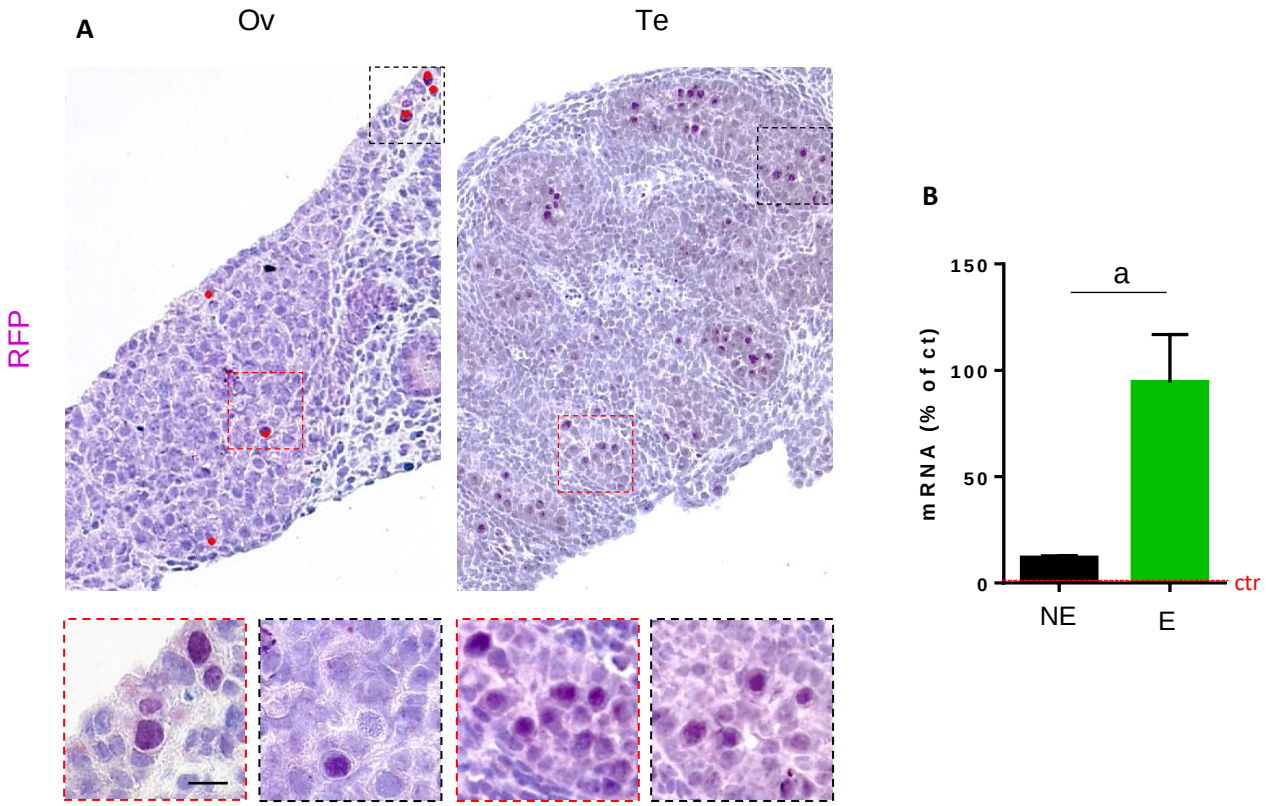


Figure 2: Validation de l'efficacité de l'électroporation. Des gonades fœtales sont électroporées avec les plasmides codant un pour la RFP et l'autre pour la GFP. **A)** Analyse immunohistochimique de la RFP (violet) dans un ovaire (Ov, droite) et un testicule (Te, gauche) électroporés. Points rouges dans l'ovaire: cellules RFP-positives dans l'ovaire électroprés. Les encadrés noirs et rouges en pointillés représentent la zone de la gonade agrandie en dessous. Barre: 10 µm. **B)** Analyse par RT-qPCR de l'expression de la GFP dans des gonades électroporées (E) et les gonades controlatérales non-électroporées (NE). Les valeurs sont normalisées sur les gonades contrôles provenant de fœtus non injectés ni électroporés (ctr; rapportés à 1, ligne rouge). Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM, n=3. a=0.06 (test t apparié)

I.B. Article I:

Endogenous retinoic acid regulates Sertoli cell proliferation but not Stra8 primary induction in mouse developing gonads

biomolecules

MDPI

Article

Endogenous retinoic acid regulates Sertoli cell proliferation but not Stra8 primary induction in mouse developing gonads

Laura Bellutti[1], Emilie Abby[1], Josephine Bowles[2], Sophie Tourpin[1], Sébastien Messiaen[1], Delphine Moison [1], Emilie Trautmann [1], Marie-Justine Guerquin[1], Virginie Rouiller-Fabre[1], Peter Koopman[2], René Habert[1], and Gabriel Livera[1,*]

[1] Laboratoire de Développement des Gonades ; UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations ; Université de Paris ; Université Paris-Saclay ; CEA/DRF/iRCM/SDRR/LDG, 18 route du Panorama, Fontenay aux Roses, F-92265, France

[2] Institute for Molecular Bioscience ; The University of Queensland ; Brisbane QLD 4072 ; Australia

* Correspondence: Gabriel.livera@cea.fr; Tel.: +33-1 46 54 99 12.

Abstract:

In mammals, germ cells enter meiosis in fetal ovaries while in males, meiosis is prevented until post-natal development. Retinoic acid (RA) is considered the main inducer of meiotic entry as it stimulates *Stra8* that is required for mitotic/meiotic switch. In fetal testes, the RA-degrading enzyme CYP26B1 prevents meiosis initiation. However, the role of endogenous RA in female meiosis entry has never been demonstrated.

In this study, we evidence RA effects on mouse testicular somatic cells that are not recapitulated by the invalidation of Cyp26b1. In organ culture, RA inhibits Sertoli cell proliferation and stimulates testosterone production. We thus develop an original gain-of-function model to ectopically express CYP26A1 or CYP26B1 in fetal ovaries. Only CYP26B1 fully prevents STRA8 induction in female GC, confirming its role as part of the meiotic preventing machinery. CYP26A1, a very potent RA degrading enzyme, does not impair the formation of STRA8-positive cells but decreases *Stra8* transcription.

Collectively, our data reveal that CYP26B1 has other activities apart metabolizing RA in fetal gonads and suggest a role of endogenous RA in amplifying Stra8, rather than being the initial inducer of Stra8. Such should reactivate the quest for identifying meiotic preventing or inducing substances.

Keywords: Meiotic entry, Retinoic acid, CYP26, fetal gonad electroporation (List three to ten pertinent keywords specific to the article; yet reasonably common within the subject discipline.)

1. Introduction

Germ cells (GC) are unique in their ability to switch from a mitotic to a meiotic program, which is a crucial feature for gamete production. In mammals, timing of meiotic entry is sexually dichotomic, taking place during fetal life in ovaries and during postnatal life in testes. The different fates of male and female fetal GC, is influenced and regulated by the somatic environment, independently of their genetic sex (XX or XY) [1–3]. The somatic cells of the developing testis repress meiotic entry while that of the embryonic ovary licence GC to initiate meiosis. *Stimulated by RA gene 8 (Stra8)* is considered as key regulator of meiotic entry.

In both males and females, meiotic initiation is preceded by the expression of *Stra8*. The crucial role of *Stra8* in mitosis/meiosis transition was highlighted *in vivo* by analysis of *Stra8* -/- mutants, showing a pre-meiotic arrest of GC in fetal ovaries and in postnatal testes [4–7]. *Stra8* was originally identified in P19 embryonic carcinoma cells as a novel gene inducible by Retinoic Acid (RA) [8]. In a consistent way, the organotypic culture of fetal mouse testes in the presence of RA or agonists of RA receptors (RAR), induces *Stra8* expression and thus meiotic initiation [4], [9], [10]. Conversely, cultures in the presence of antagonists of RAR or inhibitors of RA synthesis prevents meiotic entry in fetal ovaries [4], [9]. RA was found to be expressed in fetal ovaries and in mesonephros of both sexes during fetal life [4], [9], [11], [12]. It is believed to diffuse in the adjacent gonad, where it induces meiosis in fetal ovaries. In parallel, it was found that the RA-degrading enzyme cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1 (CYP26B1) is expressed specifically in Sertoli cells of fetal testes. Culture of fetal testes with the cytochrome P450 inhibitor ketoconazole induces aberrant expression of *Stra8* and meiotic markers [4], [9]. The role of CYP26B1 in preventing meiotic entry was confirmed *in vivo* by the observation of GC initiating meiosis in fetal *Cyp26b1* -/- mutant testes [9], [13]–[15]. Altogether these findings suggest that RA plays a leading role in the GC decision to enter meiosis.

Despite the fact that *Stra8* and *Cyp26b1* have mandatory roles, respectively in inducing and preventing meiosis, the evidence that endogenous RA directly controls the mitosis/meiosis transition is still lacking. In this line, it is puzzling that RA signaling is exclusive to metazoans and *Stra8* is a much more recent innovation of vertebrates (ensembl ENSGT00390000017181) though it is absent in many fish species [16], while meiosis is a universal among eukaryotes. In human fetal ovary CYP26 inhibitor does not stimulate *STRA8* [17] and RA induces a mild stimulation of meiosis (10% in 14 days, [18]). In organ culture of rat and human fetal testis RA also poorly induces meiosis and triggers a massive GC apoptosis [19]–[22]. It may be considered that the meiotic entry in RA-treated testes is masked by GC loss, as in mice testes RA induces an aberrant meiotic entry that is rapidly accompanied by GC death [10], [14]. Albeit in the mouse fetal testis several studies observed meiotic entry following RA stimulation, some authors did not observe GC meiotic commitment in 11.5 dpc fetal testes cultured with RA [23]. In fetal ovaries cultured without mesonephros, GC enter meiosis questioning the source of RA [2]. Lastly, in female embryos lacking two RA synthetizing enzymes, *Aldh1a2 -/-; Aldh1a3 -/-, Stra8* is expressed and GC enters meiosis [24]. Altogether, most studies confirm that exogenous RA is able to stimulate the meiotic entry decision in fetal GC from various species but the heterogeneity of the observations appeals for caution about the exact role of endogenous RA in developing gonads.

Although somatic environment is determinant for GC entry into meiosis, the effect of RA on murine somatic cells has been poorly studied. In embryos, all three RAR (RARalpha, RARbeta, RARgamma) are expressed in both ovaries and testes [4], [25]; nevertheless, the exact pattern of RAR expression in fetal gonads has never been documented. In this study, we identified a new role of RA on Sertoli cell proliferation in mice, which is not retrieved in *Cyp26b1* mutants. We thus questioned the role of CYP26B1 as RA-depriving factor in fetal gonads and developed an original technique to ectopically express RA-degrading enzymes, CYP26B1 or CYP26A1, in fetal ovaries. Interestingly, only CYP26B1 reduced the number of STRA8-positive GC, while both enzymes were active on RA signaling.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the French Ministry of Agriculture (France). Mice were housed in controlled photoperiod conditions (lights on from 08:00 to 20:00) and were supplied with commercial food and tap water ad libitum. Embryos were collected from dated matings. Males were caged with females overnight, and the presence of vaginal plug was examined the following morning. The following midday was defined as 0.5 dpc. Mice were sacrificed by cervical dislocation and fetuses were removed from uterine horns before gonad isolation under a binocular microscope.

The mice used in this study were NMRI (Naval Maritime Research Institute), *Oct4*-GFP, *Rara* and *Cyp26b1* mutant mice. [26], [27]. The Oct4-GFP mice were previously described and were used in cell sorting experiments (Yoshimizu et al., 1999). *Rara* mice were previously described [28] and generously provided by Pr. P. Chambon.

2.2. Plasmids

Several plasmids were used for experimental procedures: pCAG H2B-RFP (gift from Dr S. Tajbakhsh); pCIG; pCMV5-Cyp26b1 (gift from Dr HajimaTakeuchi) coding for the mouse protein CYP26B1 and pSG5-Cyp26a1 (Addgene) coding for the mouse protein CYP26A1. Plasmids were extracted from recombinant E.Coli cultures, using Plasmid DNA Maxiprep Kits (Thermo Fisher), according to manufacturer's instructions.

Starting from pSG5-Cyp26a1 and pCMV5-Cyp26b1 plasmids, we subcloned *Cyp26a1* and *Cyp26b1* sequences into pCIG plasmids. Clonage was achieved through the CIGEX platform (CEA, Fontenay-aux-Roses).

2.3. Cell lines and plasmid transfection

Human epithelial kidney cells (HEK-293, DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultivated in high-glucose DMEM (Gibco) containing 10% FBS (Gibco). Plasmids were transfected into cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were cultured for 36h before collecting them for RT-qPCR analysis. After 24h of culture, medium was changed and DMSO (control) or 10-7M RA was added to the medium for the analysis of RA-target genes expression. After culture, cells were collected in RLT for RT-qPCR analysis.

2.4. Electroporation of fetal gonads

Glass capillaries (Harvard Apparatus) were heated and pulled under gravity with a vertical pipette puller (David Kopf Instruments). The appropriate sharpness was about 0.05–0.1 mm. Embryos were collected at 12.3 dpc and placed into PBS (Phosphate Buffered Salin) with the amniotic sac intact and the placenta attached. The amniotic sac was opened carefully, to inject 5 µl of plasmids solution in left ventricle of the heart of embryos using a glass capillary. The injected solution contained plasmids diluted at 300 ng/µl in PBS 1X and Trypan blue (1/10). Trypan blue allowed us to visualise the injected solution and to follow its circulation through the embryos. Solution was injected slowly, following the beating of the heart. During injection, embryos became blue. Hearts were still beating after injection; embryos with non-beating hearts were excluded from the study. After injection, embryos were incubated 30min in pre-warmed PBS at 37°C and 5% CO2 to allow plasmids solution to join gonads vascularisation.

After incubation, whole embryos are blue-coloured. One gonad is directly collected and placed into culture medium (DMEM, 10% FBS). The other one is held between a pair of electrodes for electroporation; electric pulses were applied two times (forward and reverse directions) using an electroporator (NEPA21, Nepagene) using the following conditions: 30 V for 35 ms at 50 ms intervals per pulse, 5 pulses with a decrease of 10% between two consecutive pulses.

The two gonads (the non-electroporated and the electroporated one) were cultured as follow during 48h. After culture, gonads were observed at inverted microscope (Zeiss, axiovert 200) to visualize RFP and to assess the percentage of electroporated gonads surface. Of note, pCAG H2B-RFP was always coinjected with pCIG, pCMV5-Cyp26b1 or pSG5-Cyp26a1 to verify the efficacy of electroporation. Next, gonads were used for immunohistochemical or RT-qPCR analysis. For RT-qPCR analysis, three electroporated or non-electroporated gonads were pooled together.

2.5. Organotypic culture

Organotypic culture of fetal gonads was performed as previously described [29]. Briefly, fetal gonads were placed on a single Millicell standing insert (HA, pore size: 0.45 μm; diameter: 12 mm). The inserts bearing the explants were floated on 320μl culture medium (DMEM, 10% FBS) in 24 wells tissue culture plates and incubated at 37°C, 5% CO2. For long cultures, medium was changed every 24h. For RA treatments of electroporated gonads, exogenous RA was diluted in DMSO at 10-7M. 12.2 dpc fetal ovaries were cultured for 6h or 24h with or without RA at 10-7M or the pan-RAR inverse agonist BMS-493 at 10-6M. WT or *Rara* -/- mutant fetal testes were cultured at 11.5 dpc or 13.5 dpc for 36 h or 48 h, respectively. RA was added to culture medium at 10-6M. Talarozole was used at 1 μM (Sigma-Aldrich).

2.6. Measure of testosterone production

12.5 dpc fetal testes were cultured for 3 days in the presence or not of 10-6M RA. Last 3h of culture,; 100ng/ml of LH was added to the medium. The testosterone secreted into the medium was measured daily as previously described [22], [30]. At day 3, testosterone secretion was measured before and after LH treatment. Briefly, culture medium was incubated with anti-testosterone antibody (gift from Dr.Meusy-Dessolle). Then, ^{3}[H]testosterone tracer was incubated for 2h at 4°C. The bound hormone was counted in a scintillation solution.

2.7. Measure of Sertoli cell proliferation

The percentage of proliferative AMH-positive Sertoli cells was evaluated by BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation, using the Cell Proliferation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's recommendations. BrdU (1%) was added at the end of the culture period or injected to pregnant mice for 3 h before tissue fixation. Next, three to five randomly selected sections were stained for 1h with anti-BrdU antibody. Peroxidase activity was detected by DAB. The BrdU incorporation index was determined by the counting of, at least, 500 stained and unstained Sertoli cells.

2.8. RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using Rneasy minikit (QIAGEN, Valencia, CA). cDNA was obtained by reverse transcription using the high capacity kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The 7900HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) and SYBR-green labelling were used for quantitative RT-PCR (RT-qPCR). The Comparative Ct method was used to determine the relative quantities of mRNA, using *β-actin* or *Ddx4* (GC-specific marker) mRNA as the endogenous reporter. Results are presented as a percentage of the control (i.e. expression of the control condition being defined as 100%) or as a percentage of the max (i.e. expression of the maximal condition being defined as 100%). Each RNA sample was analysed in duplicate. All primers were used at a final concentration of 400 nM. Sequences of oligonucleotides used are listed in supplementary Table 1.

174 **Table 1. List of RT-qPCR primers used in this study**

Name	Species	Applications	Forward	Reverse
B-actine	mouse	RT-qPCR	5′-GCCCTGAGGCTCTTTTCCAG-3′	5′-TGCCACAGGATTCCATACCC-3′
Cyp26a1	mouse	RT-qPCR	5′-CTCGCACAAGCAGCGAAAG-3′	5′-GATCACGGGCACGTAGCACT-3′
Cyp26b1	mouse	RT-qPCR	5′-TGGACTGTGTCATCAAGGAGGT-3′	5′-GTCGTGAGTGTCTCGGATGCTA-3′
Ddx4	mouse	RT-qPCR	5′-GAAGAAATCCAGAGGTTGGC-3′	5′-GAAGGATCGTCTGTCTGAACA-3′
Rarb2	mouse	RT-qPCR	5′-TTTAATCTGTGGAGACCGCCA-3′	5′-TTGTCTACTTTTGTTGGTTCCTCAAG-3′
Stra8	mouse	RT-qPCR	5′-TGAAGCTCAAAGCATCCTTCAA-3′	5′-CTAAGCTGTTGGGATTCCCATC-3′

175

176 *2.9. Purification of fetal germ and somatic cells*

177 13.5 dpc fetal testes and ovaries were collected from *Oct4*-GFP transgene embryos. Gonads were
178 devoid of mesonephros and enzymatically digested as previously described [2]. Briefly, 5 min
179 Trypsin (Trypsin/EDTA solution, Sigma-Aldrich) digestion was followed by incubation with 2mg/ml
180 collagenase and 0.02 mg/ml of DNase I.
181 *Oct4* specific expression in GC allowed the purification of GC from somatic cells. For purification
182 of Sertoli cells we used α6-integrin staining: the primary antibody, R-phycoerythrin conjugated
183 monoclonal anti-CD49f (BDpharmingen) was diluted 1/100 in 2% BSA/PBS (w/v). HO33258 (0.5
184 mg/ml-Sigma-Aldrich) was added to exclude dead cells. Cell sorting was performed using ARIA
185 (Becton Dickinston). Germ and somatic cells were sorted in RLT buffer (Qiagen) for RT-qPCR
186 analysis.

187 *2.10. Histology and immunohistochemistry*

188 Gonads were fixed in 4% Formaldehyde. Fixed gonads were dehydrated, embedded in paraffin
189 and cut into 5-µm-thick sections. Sections were mounted on slides, dewaxed and rehydrated. For
190 histological analysis, sections were stained with haematoxylin and eosin.
191 For immunohistochemical staining, sections were boiled for 20 min in citrate buffer after dewax
192 and rehydration. Endogenous peroxidase activity was blocked incubating sections for 15 min with
193 3% hydrogen peroxid. Sections were then blocked 30 min with 2% horse serum and incubated
194 overnight at 4°C with primary antibody (see Supllementary Table 2 for antibodies). After 3 washes
195 in PBS, slides were incubated with peroxidase conjugated secondary antibodies (ImmPRESSTM
196 reagent kit, Vector Laboratories) 30min at room temperature. Antibodies were revealed with DAB
197 (DAB substrate reagent kit, Vector Laboratories) or VIP Vector VIP substrate reagent kit, Vector
198 Laboratories).

199 **Table 1. List of the antibodies used in the study**

Name	Company	Host species	Mono/poly	Concentartion	Applications
AMH	Santa Cruz	Goat	Poly	1/200	IHC
DDX4	Abcam	Mouse	Mono	1/200	IHC
DDX4	Abcam	Rabbit	Poly	1/200	IHC
RFP	Abcam	Rabbit	Poly	1/200	IHC
STRA8	Abcam	Rabbit	Poly	1/1000	IHC

200
201

3. Results

3.1. Rar expression in fetal gonadal cells

RA binds nuclear RAR, which act as transcription factors to activate RA-target genes. The three *Rar* genes have been reported expressed in embryonic germ cells but their expression in somatic gonadal cells has not been detailed during development. Therefore, we first analysed mRNA expression profiles of *Rara*, *Rarb* and *Rarg* in different purified cell populations of 13.5 dpc fetal gonads from both sexes (Figure 1). GC were separated from somatic cells using *Oct4*-GFP mice and male somatic cells were further divided into a6-integrin-positive cells (Sertoli) and -negative cells (interstitium). Cell purity was assessed using markers: *Ddx4*, *Stra8*, *Amh* and *Hsd3b,* respectively specific of germ, pre-meiotic, Sertoli and Leydig cells (Figure S1). *Rar* are expressed in somatic as well as in GC, in both fetal testes and ovaries. Female GC express the three *Rar*, whereas male GC express only *Rara* and *Rarg*. In Leydig cells the three *Rar* are expressed, whereas Sertoli cells express almost exclusively *Rara* (Figure 1).

3.2. RA increases mouse fetal testosterone production

We next questioned the role of RAR in somatic cells of fetal testes. Therefore, we cultured 12.5 dpc mouse fetal testes in presence of exogenous RA and measured testosterone production. RA increases the secretion of testosterone starting at day 2 of culture (Figure 2). RA stimulation of testosterone production is maintained in LH-stimulated Leydig cells on the third day. As in rat fetal testes RA effect on steroidogenesis are mimicked by RARalpha agonist [31], we investigate RA effect in *Rara -/-* mutant mice. Of interest, RA does not increase testosterone production in mouse fetal testes from *Rara -/-* mice.

3.3. RA inhibits Sertoli cell proliferation

We next analysed RA effect on Sertoli cell proliferation in cultured fetal testes. RA treatment reduces the percentage of BrdU-positive/AMH-positive cells in 13.5 dpc testes after 48h (Figure 3). A similar inhibition is retrieved in 11.5 dpc testes cultured for 36h when BrdU incorporation is measured in pre-Sertoli cells located beneath the coelomic epithelium. This suggests that Sertoli cell proliferation is inhibited by RA as early as these cells begin to differentiate. The effect of RA-inhibited Sertoli cell proliferation is abolished in fetal testes from *Rara -/-* mutant mice. Altogether, this indicates that exogenous RA inhibits the activity of male somatic cells via RARalpha.

3.4. Cyp26b1 invalidation does not inhibit Sertoli cell proliferation

Having established that exogenous RA inhibits Sertoli cell proliferation does not imply that endogenous RA has a similar activity. We thus measured Sertoli cell proliferation in the presence of talarozole, a well-known inhibitor of CYP26 RA-degrading enzymes. In 13.5 dpc fetal testes cultured for 48h with talarozole, Sertoli cell proliferation is inhibited and this effect is absent in *Rara* mutant (Fig 3). Thus, endogenous RA indeed inhibits Sertoli cell proliferation via RARalpha. This is also consistent with RARalpha being the sole RAR present in Sertoli cells. We thus speculated that CYP26B1 presence in fetal testes should favour Sertoli cell proliferation. To test this hypothesis we analysed BrdU incorporation *in vivo* in *Cyp26b1 -/-* fetal testes. Surprisingly, in these mutants Sertoli cell proliferation is unchanged compare to wild-type fetal testes (Figure 3). This discrepancy may be due to the difference of models (ie constitutive invalidation vs punctual drugs treatments). Nonetheless, it casts a first doubt about the CYP26B1 exact function in the mouse embryonic gonads.

3.5. Short-term inhibition of RA signaling does not affect Stra8 expression

Currently, CYP26B1 is considered as the meiotic preventing factor in fetal testis due to its RA-degrading activity. On the other hand RA is considered as the key inducer of *Stra8* in fetal ovaries. As we observed in the fetal testis a RA role that is not retrieved in *Cyp26b1 -/-* embryos, we also detailed the RA-dependency of STRA8 in fetal ovaries. Mouse fetal ovaries were collected precisely

at 12.2 dpc when *Stra8* start to be expressed at low level and set in organ culture for a short time. After 6h, the level of *Stra8* spontaneously increases (Figure 4).

In these conditions, addition of BMS-494, an inverse agonist of the three RAR, does not prevent the increase of *Stra8* nor decreases *Stra8* mRNA, while exogenous RA strongly enhances *Stra8* expression. To verify the efficacy of BMS-493 treatment in organ culture, we measured the expression levels of well-known RA-targets, namely *Cyp26a1* and *Rarb2*. As expected, both were significantly decreased in the presence of BMS-494, confirming the efficiency of RA-signaling inhibition (Figure 4). These results may appear odd as several studies reported that inhibition of RAR activity diminished *Stra8* expression in the mouse ovary. However, most have measured *Stra8* expression after long-term treatment (over 24h, Figure S2). We thus performed similar experiments and after 24h BMS-493 decreases *Stra8* expression in culture mouse fetal ovaries. These results suggest that either *Stra8* is less sensitive to RA-signaling inhibition or that endogenous RA is a poor regulator of *Stra8* induction.

3.6. Ectopic exression on Cyp26b1 ou Cyp26a1 differentially regulate Stra8 in fetal ovaries

In order to clarify the role of RA and CYP26B1 in mouse gonads, we developed an original approach to artificially induce CYP26 proteins in fetal gonads. The experimental protocol was based on intracardiac injection of plasmids into 12.3 dpc embryos, followed by their electroporation in fetal gonads. For each embryo, one gonad was electroporated (E), while the other one was used as non-electroporated (NE) control. Gonads were next cultured during 48h (Figure 5A).

First, we validated the experimental procedure by electroporating plasmids coding for Red Fluorescence Protein (RFP) and Green Fluorescence Protein (GFP) in fetal gonads. The macroscopic observation of whole ovaries and testes after 48h of culture allowed us to detect red and green fluorescence in electroporated gonads (Figure 5 + Figure S3), in over 20% of the gonad area (Figure S3). This corresponds roughly to the place were electrodes were positioned. RFP immune-detection revealed its presence exclusively in electroporated gonads albeit in lower abundance (Figure S3). When RFP and GFP plasmids were co-injected, they displayed a near perfect colocalization indicating incorporation of plasmids in the same area. In all later experiments, RFP plasmid was systematically co-injected with plasmid of interest to ensure the efficacy of electroporation. Finally, we analysed the morphology of gonads at histological level. Electroporated and non-electroporated gonads displayed comparable morphologies (GC presence, cords in testes and cells initiating meiosis in ovaries) suggesting that the electric pulses did not altered the tissues.

Second, we compare the activity of CYP26B1 to that of CYP26A1 in fetal ovaries. CYP26A1 is known to be a potent RA-degrading enzyme and its specificity towards retinoids has been well characterized. If both enzymes act solely through RA degradation we expect their ectopic expression will display identical phenotypes. As a control of the efficiency of the plasmids we transiently expressed *Cyp26b1* or *Cyp26a1* in HEK-293 cells and both reduced the expression of the RA-target gene *Rarb2* (Figure S4). This confirms that both CYP26B1 and CYP26A1 have indeed the ability to degrade RA *in vitro,* as expected. Of note cell sorting indicate that RA degradation by overexpressing CYP26 also affects untransfected nearby cells as *Rarb2* expression was also inhibited in cells from the same plate but that do not express CYP26 (Figure S4).

In *GFP-electroporated* fetal ovaries STRA8 protein was present in about 80% of GC after 48h of culture like in non-electroporated ovaries indicating that cells are entering meiosis (Figure 5C). Using this system, the ectopic expression of *Cyp26b1* reduces the number of STRA8-positive GC by 35 %. Of note, STRA8-negative cells are often grouped together likely corresponding to the electroporated region. Thus, CYP26B1 gain of function in the mouse ovary nicely confirms that CYP26B1 is sufficient to prevent meiotic entry. Surprisingly ectopic expression of CYP26A1 hardly reduced the number of STRA8-positive cells in the ovary. This evidences that CYP26A1 or CYP26B1 overexpression in mouse developing ovaries leads to different outcomes. Though the number of GC expressing STRA8 appears unchanged, CYP26A1 reduced the amount of *Stra8* mRNA indicating that RA does regulate *Stra8* transcription to some extent (Figure 5E). Confirming this, RA addition restore *Stra8* expression in the presence of CYP26A1. A similar antagonist regulation with CYP26A1 and RA occurs in the fetal testis

in which the basal expression level of *Stra8* is very weak compared to fetal ovaries (Figure S5). Altogether, this indicates that endogenous RA stimulates *Stra8* transcription and that this stimulation is abolished by electroporating CYP26A1 in fetal gonads. On the contrary, CYP26B1 fully abrogate STRA8 expression, likely preventing its induction, in GC.

4. Discussion

This report evidences for the first time that CYP26B1 addition in the fetal gonad is sufficient to prevent meiotic entry. We also bring forth new data demonstrating that RA addition modifies the behaviour of male somatic cells *in vitro*. Altogether this leads to a possible reconsideration of CYP26B1 and RA role in mitotic/meiotic switch.

Using organ culture of mouse fetal testes we demonstrate that RA increases testostosterone production. This RA action on steroidogenesis is opposite to that we described previously indicating that RA decreases testosterone production in the developing rat testis [22] but is similar to that reported in human fetal testis. RA effects on steroidogenesis is thus highly variable. Of interest RAR agonists in rats and *Rara* KO in mouse (present study) indicate that in both cases RA acts via RARalpha. That exogenous RA stimulates testosterone secretion in vitro does not mean that RA is a regulator of the fetal testicular steroidogenesis in vivo, especially as the fetal testis is considered to be deprived of RA due the presence of the RA-degrading enzyme CYP26B1. However, in *Cyp26b1* mutant mice it was recently reported that Leydig cell differentiation is impaired and that steroidogenesis was decreased [32]. Such data provide a first hint that RA addition does not recapitulate *Cyp26b1* invalidation.

We also report similarly that fetal Sertoli cell proliferation is inhibited by RA addition and by chemical inhibition of CYP26 in organ culture. This demonstrates that exogenous and endogenous RA inhibit Sertoli cell multiplication. We also demonstrate that this effect involves RARalpha as it is the sole RAR present in Sertoli cells and that Rara mutants are refractory to this RA-mediated inhibition of Sertoli cell proliferation. Collectively these data indicate that Sertoli cells are sensitive to RA which appears unexpected as these express high level of CYP26B1 that should protect them from RA. We also report that as for Leydig cells, the effect of RA on Sertoli cells is not recapitulated in *Cyp26b1 -/-* embryos. Altogether one may consider that *Cyp26b1* invalidation is constitutive and may thus have triggered compensatory mechanisms that are not observed when the gonads are stimulated by RA in culture. On the other hand, it may also suggest that RA degradation is not the main activity of CYP26B1 in the fetal gonads.

To challenge this hypothesis, we express artificially CYP26B1 or CYP26A1 in mouse fetal ovary and observed that they regulate differentially the apparition of pre-meiotic STRA8-positive cells. Only CYP26B1 prevents the apparition of STRA8 in GC. This effect is well correlated to the extent of electroporation and proves that CYP26B1 gain of function in a fetal ovary, just prior meiotic entry, is sufficient to inhibit the mitotic/meiotic switch. This data is complementary to *Cyp26b1* invalidation in the developing testis that is sufficient to allow the expression of *Stra8* [9]. Altogether it shows that CYP26B1 is necessary and sufficient and thus participates to the machinery that prevents meiotic entry in GC. Surprisingly CYP26A1 expression in fetal ovaries did not prevent the formation of new STRA8-positive cells. CYP26A1 is an enzyme that has been extensively characterized and proven highly specific and efficient to degrade RA [33]. Actually, its RA degrading activity is tenfold higher than that of CYP26B1. Thus, we consider two hypotheses: first, CYP26A1 was inefficient to degrade RA in our model. Such is unlikely as we ensure the efficiency of the *Cyp26a1* sequence used and prove that it efficiently inhibits RA-target genes in HEK293 cells. Additionally, though the number of STRA8-positive cells is not modified, the abundance of the *Stra8*-transcript is decreased in the *Cyp26a1*-electroporated ovary, indicating that the plasmid was able to display some activity. The second hypothesis would consider that if CYP26A1 function as a potent RA-degrading factor, then CYP26B1 should have an additional activity independent of RA. Such would equally fit with lack of equivalence between RA-observed effects and those of *Cyp26b1* invalidation in male somatic cells. While such a view is challenging, it should be noted that CYP26B1 and CYP26A1 only share 42% amino acid sequence identity [34] and that, based on this homology, CYP26B1 activity has mostly

been tested against retinoids. This opens the possibility that CYP26B1 may have other substrates. Such a speculation is strengthened by likely differences in active sites of the two enzymes revealed by their different responses to various selective inhibitors [35].

Nonetheless many studies including ours reported that RA stimulates *Stra8* expression in GC. And this is consistent with *Cyp26a1* gene transfer experiments in the embryonic ovary here-reported. We thus propose that such a RA stimulation of *Stra8* gene expression is only possible when a first signal have unlocked Stra8. This signal is likely dependant of CYP26B1. In such a model *Stra8* would first be induced by a RA-independent signal, that remains to be identified and is inhibited by CYP26B1. Such is compatible with our data demonstrating that in embryonic ovary when *Stra8* starts to be expressed, this early expression is insensitive to RAR blocking drugs. Later RA would reach the STRA8–positive GC and then possibly amplify the transcription of *Stra8*. Following this line, the actual regulator of the meiotic switch, that was once termed 'Meiotic preventing factor' remains to be identified. Of interest, based on co-culture and conditioned media, we previously proposed that such a factor should be a small diffusible molecule [2]. Such a description of course does not fit with CYP26B1 enzyme and may only potentially apply to one of its products.

5. Conclusions

To conclude, our study reveals enigmatic discrepancies between CYP26B1 supposed role and RA effects. These suggest that this enzyme, we confirmed key to orchestrate the mitotic/meiotic switch, may have additional activity apart degrading RA. Such implies that RA may not be the initial signal triggering STRA8 and meiosis.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Figure S1.** Purified germ and somatic cell populations of fetal gonads express specific markers. **Figure S2.** Long-term inhibition of RA signaling prevents Stra8 expression. **Figure S3.** Intracardiac injection and electroporation of plasmids allow the ectopic expression of proteins in fetal gonads. **Figure S4.** Cyp26b1 or Cyp26a1 overexpression equally inhibits Rarb2 expression. **Figure S5.** Ectopic expression of Cyp26b1 or Cyp26a1 decreases Stra8 expression in fetal testes.

Author Contributions: All authors contributed substantially to the work reported as follows: conceptualization, G.L., V.R.F., R.H. and L.B.; methodology, L.B., M.J.G., E.A., R.H, V.R.F., S.M., S.T., E.T. and D.M.; validation, M.J.G., G.L. and R.H.; formal analysis, E.A., M.J.G and L.B.; investigation, L.B., E.A., M.J.G., S.M., D.M., S.T., J.B.; writing—original draft preparation, L.B. and G.L.; writing—review and editing, L.B., G.L., E.A, J.B., PK.; visualization, L.B., E.A.; supervision, G.L. and R.H.; project administration, G.L..; funding acquisition, G.L. and P.K.

Funding: This research was funded by Institut Universitaire de France (GL) and Université Paris Diderot. LB holds a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Acknowledgments: We thank C. Duquenne for technical assistance and A. Gouret for her secretarial assistance. We are indebted to Dr Ohbo and Pr Chambon for generously providing Oct4-GFP and Rara mice. We also thank the iRCM platforms, notably the animal housing facility, and particularly V. Neuville, the CIGEX, the microscopy facility, for plasmid generation, and the Flow Cytometry Shared Resource, headed by Dr Jan Bayer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

[1] C. W. Feng, J. Bowles, and P. Koopman, "Control of mammalian germ cell entry into meiosis," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 1, pp. 488–497, 2014.

[2] M. J. Guerquin, C. Duquenne, J. B. Lahaye, S. Tourpin, R. Habert, and G. Livera, "New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice," *Dev. Biol.*, vol. 346, no. 2, pp. 320–330, 2010.

[3] A. Mclaren, "Primordial germ cells in the mouse," vol. 262, pp. 1–15, 2003.

[4] J. Koubova, D. B. Menke, Q. Zhou, B. Capel, M. D. Griswold, and D. C. Page, "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, pp. 2474–2479, 2006.

[5] A. E. Baltus, D. B. Menke, Y.-C. Hu, M. L. Goodheart, A. E. Carpenter, D. G. de Rooij, and D. C. Page, "In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication.," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 12, pp. 1430–1434, 2006.

[6] E. L. Anderson, A. E. Baltus, H. L. Roepers-Gajadien, T. J. Hassold, D. G. de Rooij, A. M. M. van Pelt, and D. C. Page, "Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, pp. 14976–14980, 2008.

[7] M. Mark, H. Jacobs, M. Oulad-Abdelghani, C. Dennefeld, B. Féret, N. Vernet, C.-A. Codreanu, P. Chambon, and N. B. Ghyselinck, "STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation.," *J. Cell Sci.*, vol. 121, pp. 3233–3242, 2008.

[8] M. Oulad-Abdelghani, P. Bouillet, D. Décimo, A. Gansmuller, S. Heyberger, P. Dollé, S. Bronner, Y. Lutz, and P. Chambon, "Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene," *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 2, pp. 469–477, 1996.

[9] J. Bowles, D. Knight, C. Smith, D. Wilhelm, J. Richman, S. Mamiya, K. Yashiro, K. Chawengsaksophak, M. J. Wilson, J. Rossant, H. Hamada, and P. Koopman, "Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice," *Science (80-.).*, vol. 312, no. April, pp. 596–601, 2006.

[10] E. Trautmann, M.-J. Guerquin, C. Duquenne, J.-B. Lahaye, R. Habert, and G. Livera, "Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes," *Cell Cycle*, vol. 7, no. January 2015, pp. 656–664, 2008.

[11] J. Bowles, C. Feng, K. Miles, J. Ineson, C. Spiller, and P. Koopman, "ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic acid in mouse fetal ovaries," *Nat. Commun.*, vol. 7, no. May 2015, pp. 1–8, 2016.

[12] K. Niederreither, P. Chambon, J. Vermot, and P. Dolle, "Independent Patterns of Retinoic Acid Synthesis in the Mouse Embryo," *Dev. Biol.*, vol. 99, no. 25, pp. 16111–16116, 2002.

[13] R. Saba, Q. Wu, and Y. Saga, "CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways," *Dev. Biol.*, vol. 389, no. 2, pp. 173–181, 2014.

[14] G. MacLean, H. Li, D. Metzger, P. Chambon, and M. Petkovich, "Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice," *Endocrinology*, vol. 148, no. February, pp. 4560–4567, 2007.

[15] J. Bowles, C. W. Feng, C. Spiller, T. L. Davidson, A. Jackson, and P. Koopman, "FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice," *Dev. Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 440–449, 2010.

[16] J. Pasquier, C. Cabau, T. Nguyen, E. Jouanno, D. Severac, I. Braasch, L. Journot, P. Pontarotti, C. Klopp, J. H. Postlethwait, Y. Guiguen, and J. Bobe, "Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: The PhyloFish database," *BMC Genomics*, vol. 17, no. 1, 2016.

[17] N. Frydman, M. Poulain, B. Arkoun, C. Duquenne, S. Tourpin, S. Messiaen, R. Habert, V. Rouiller-Fabre, A. Benachi, and G. Livera, "Human foetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis," *Hum. Reprod.*, vol. 32, no. 3, pp. 631–642, 2017.

[18] R. Le Bouffant, B. Souquet, N. Duval, C. Duquenne, R. Herve, N. Frydman, B. Robert, R. Habert, and G. Livera, "Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation," *J. Cell Sci.*, vol. 124, pp. e1–e1, 2011.

[19] R. Le Bouffant, M. J. Guerquin, C. Duquenne, N. Frydman, H. Coffigny, V. Rouiller-Fabre, R. Frydman, R. Habert, and G. Livera, "Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis," *Hum. Reprod.*, vol. 25, no. 10, pp. 2579–2590, 2010.

[20] A. Jørgensen, J. E. Nielsen, S. Perlman, L. Lundvall, R. T. Mitchell, A. Juul, and E. R. Meyts, "Ex vivo culture of human fetal gonads : manipulation of meiosis signalling by retinoic acid treatment disrupts testis development," vol. 30, no. 10, pp. 2351–2363, 2015.

[21] H. Li and K. H. Kim, "Retinoic Acid Inhibits Rat XY Gonad Development by Blocking Mesonephric Cell Migration and Decreasing the Number of Gonocytes," *Biol. Reprod.*, vol. 70, no. 3, pp. 687–693, 2004.

[22] G. Livera, V. Rouiller-Fabre, P. Durand, and R. Habert, "Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture.," *Biol. Reprod.*, vol. 62, pp. 1303–1314, 2000.

[23] D. Best, D. a Sahlender, N. Walther, A. a Peden, and I. R. Adams, "Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice.," *Development*, vol. 135, pp. 1415–1425, 2008.

[24] S. Kumar, C. Chatzi, T. Brade, T. J. Cunningham, X. Zhao, and G. Duester, "Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 151, 2011.

[25] N. Vernet, C. Dennefeld, C. Rochette-Egly, M. Oulad-Abdelghani, P. Chambon, N. B. Ghyselinck, and M. Mark, "Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis," *Endocrinology*, vol. 147, no. 1, pp. 96–110, 2006.

[26] K. Ohbo, S. Yoshida, M. Ohmura, O. Ohneda, T. Ogawa, H. Tsuchiya, T. Kuwana, J. Kehler, K. Abe, H. R. Schöler, and T. Suda, "Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice," *Dev. Biol.*, vol. 258, pp. 209–225, 2003.

[27] L. Wojtasz, K. Daniel, and A. Toth, "Fluorescence activated cell sorting of live female germ cells and somatic cells of the mouse fetal gonad based on forward and side scattering," *Cytom. Part A*, vol. 75, no. 6, pp. 547–553, 2009.

[28] T. Lufkin, D. Lohnes, M. Mark, A. Dierich, P. Gorry, M. P. Gaub, M. LeMeur, and P. Chambon, "High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 15, pp. 7225–7229, 2006.

[29] G. Livera, G. Delbes, C. Pairault, V. Rouiller-Fabre, and R. Habert, "Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development," *Cell Tissue Res.*, vol. 324, pp. 507–521, 2006.

[30] R. Habert and R. Picon, "Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17β levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat," *J. Steroid Biochem.*, vol. 21, no. 2, pp. 193–198, 1984.

[31] G. Livera, V. Rouiller-Fabre, and R. Habert, "Retinoid receptors involved in the effects of retinoic acid on rat testis development.," *Biol. Reprod.*, vol. 64, pp. 1307–1314, 2001.

[32] J. Bowles, C. W. Feng, J. Ineson, K. Miles, C. M. Spiller, V. R. Harley, A. H. Sinclair, and P. Koopman,

"Retinoic Acid Antagonizes Testis Development in Mice," *Cell Rep.*, vol. 24, no. 5, pp. 1330–1341, 2018.

[33] A. R. Topletz, J. E. Thatcher, A. Zelter, J. D. Lutz, S. Tay, W. L. Nelson, and N. Isoherranen, "Comparison of the Function and Expression of CYP26A1 and CYP26B1, the two Retnoic Acid Hydroxylases," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 149–163, 2013.

[34] G. MacLean, S. Abu-Abed, P. Dollé, A. Tahayato, P. Chambon, and M. Petkovich, "Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development," *Mech. Dev.*, vol. 107, no. 1–2, pp. 195–201, 2001.

[35] R. S. Foti, P. Diaz, and D. Douguet, "Comparison of the ligand binding site of CYP2C8 with CYP26A1 and CYP26B1: a structural basis for the identification of new inhibitors of the retinoic acid hydroxylases," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 31, pp. 148–161, 2016.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

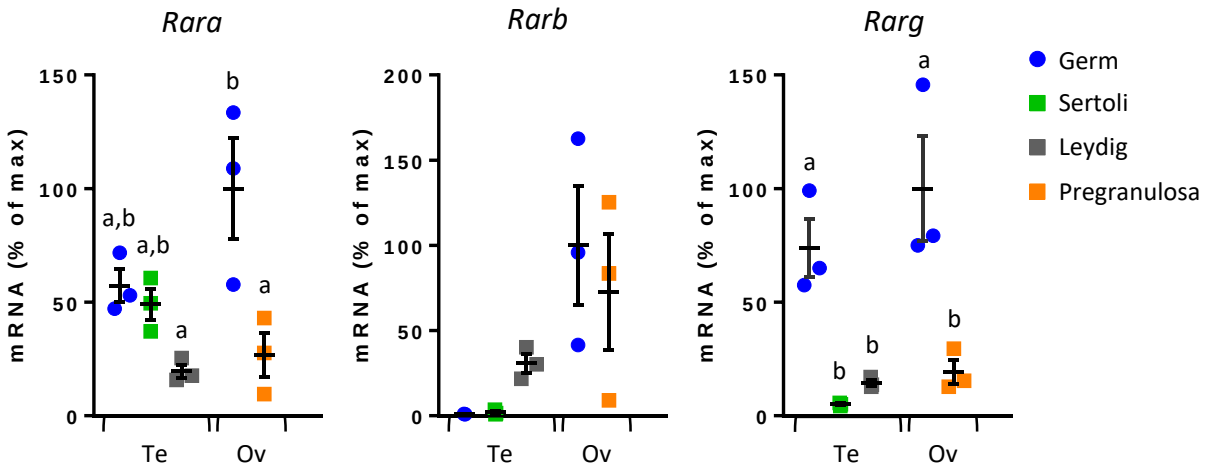


Figure 1. Rar are expressed in germ and somatic cells of fetal gonads. Analysis of mRNA expression of the three Rar (Rara, Rarb et Rarg) by RT-qPCR in purified populations of OCT4-GFP fetal gonads. Testicular (Te) cell populations: Germ, Leydig and Sertoli cells; ovarian (Ov) cell populations: Germ and pregranulosa cells. Values are normalised to the housekeeping gene β-Actin. mRNA expression levels are expressed as percentage of maximum (i.e. maximal values are defined as 100%). Different letters indicate significantly different data (multiple comparisons ANOVA). Mean ± SEM, n=3.

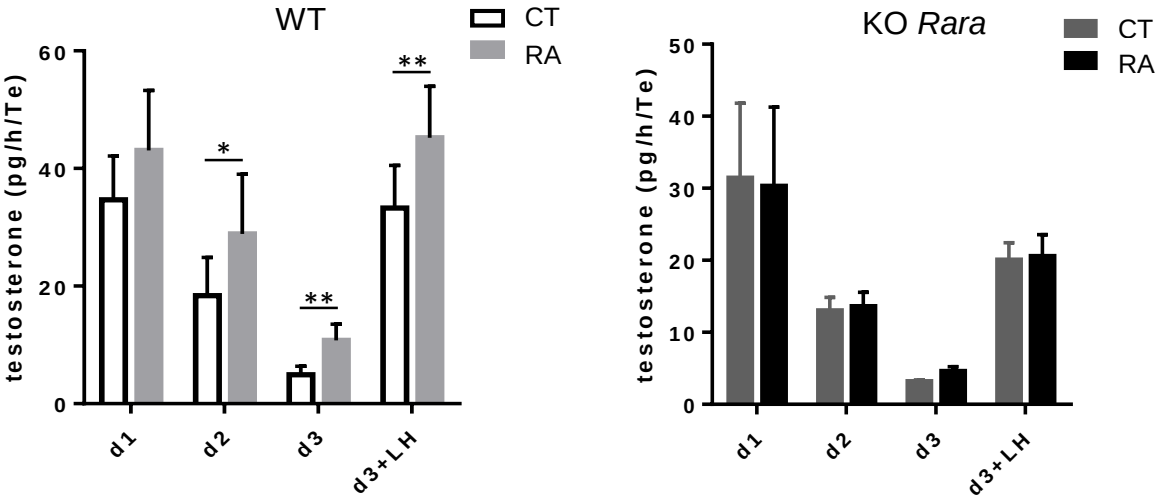


Figure 2. RA increases Leydig cell testosterone production. Testosterone secreted (pg/h/testis) by 12.5 dpc WT (n=7) and Rara -/- (KO Rara, n=5) testes cultured for 1, 2 and 3 days (d1, d2 and d3 respectively) in the presence or not of 10-6M RA (CT and RA respectivly); d3 testes are stimulated by LH during the last 3 hours of culture (d3+LH). *p<0.05; **p<0.01 (parametric t-test) Mean ± SEM

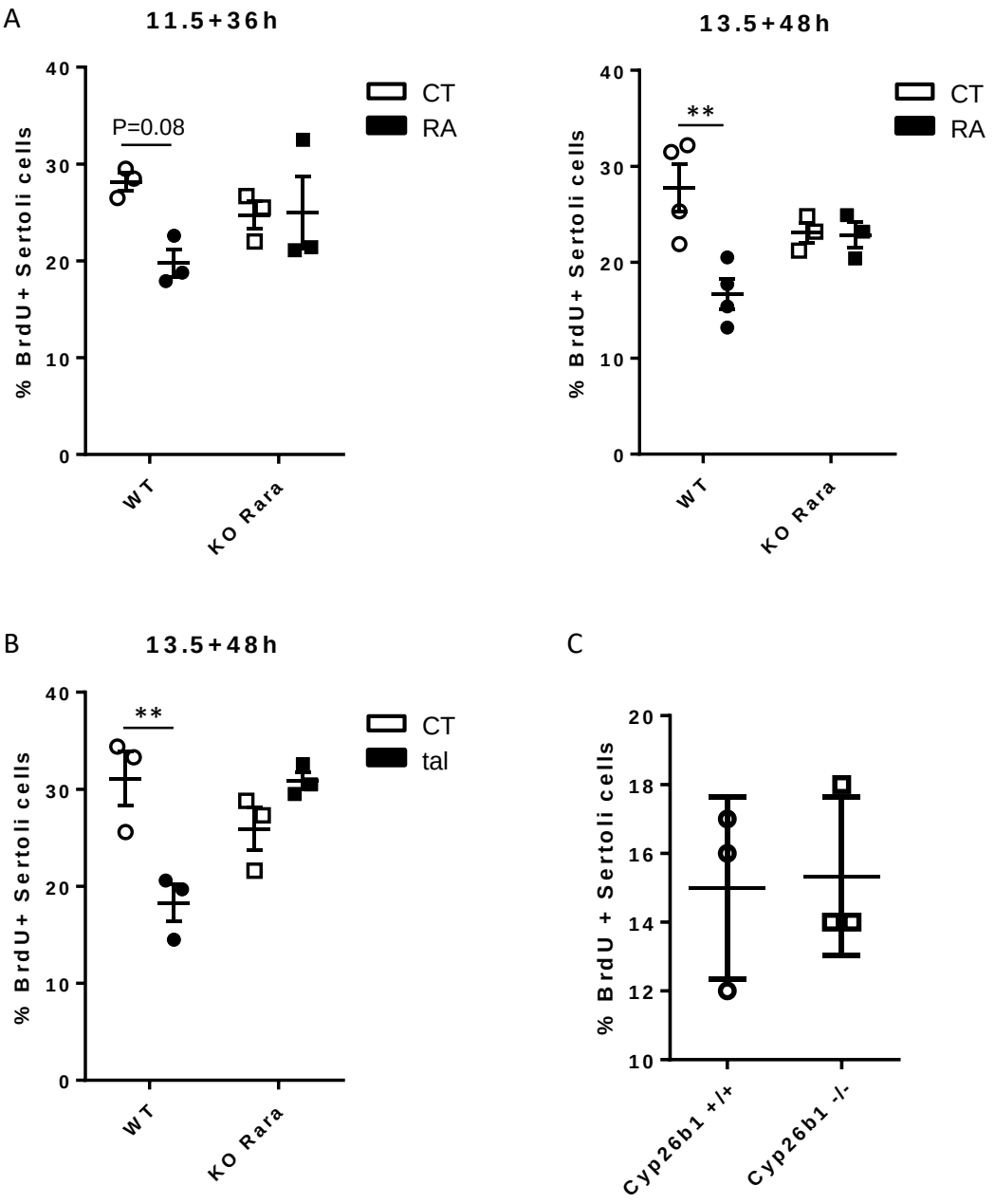


Figure 3. RA inhibits Sertoli cell proliferation. A) and B) 11.5 and 13.5 dpc WT and Rara mutant (KO Rara) testes are cultured for 36h and 48h respectively, in the presence or not of 10-6M RA (CT and RA). Percentage of BrdU-positive/AMH-positive Sertoli cells is measured. C) Percentage of BrdU-positive/AMH-positive Sertoli cells in testes of Cyp26b1 +/+ and Cyp26b1 -/- 13.5 dpc embryos. Mean ± SEM, n=3. **p<0.01 (two-way ANOVA)

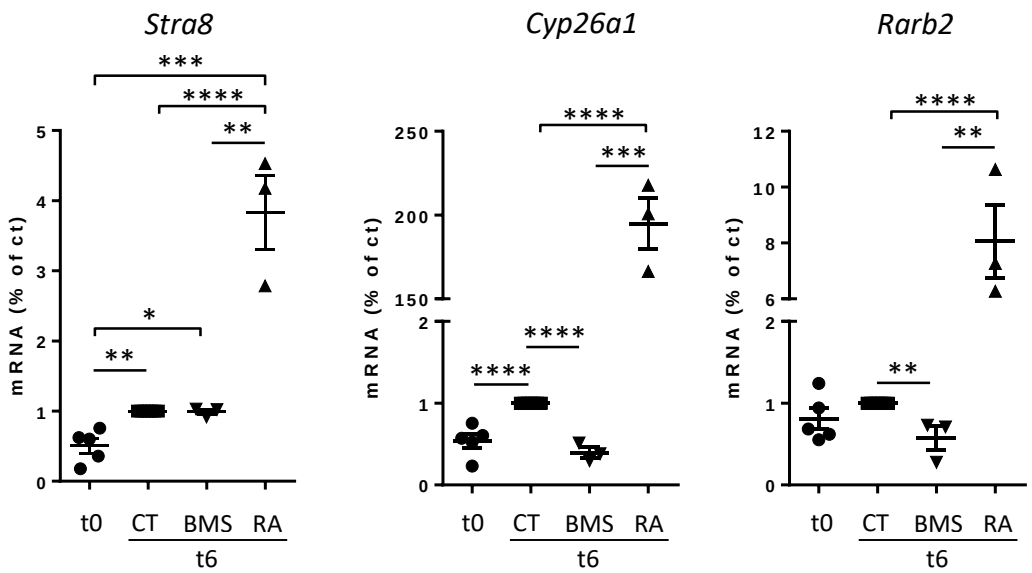


Figure 4. Short-term inhibition of RA signaling does not prevent *Stra8* expression. Fetal ovaries are collected at 12.2 dpc (t0) and cultured 6h (t6) in culture medium (CT) or in medium with 10-7M RA or 10-6M BMS-494. mRNA expression levels of RA-target genes (Stra8, Cyp26a1 and Rarb2) are analysed. Stra8 values are normalised to the GC specific marker Ddx4; Cyp26a1 and Rarβ2 values are normalised to the housekeeping gene β-Actin. RNA levels are expressed as percentage of controls (i.e. t6 CT values are defined as 100%) Mean ± SEM, n=3-5. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; ****p<0.001 unpaired t-test

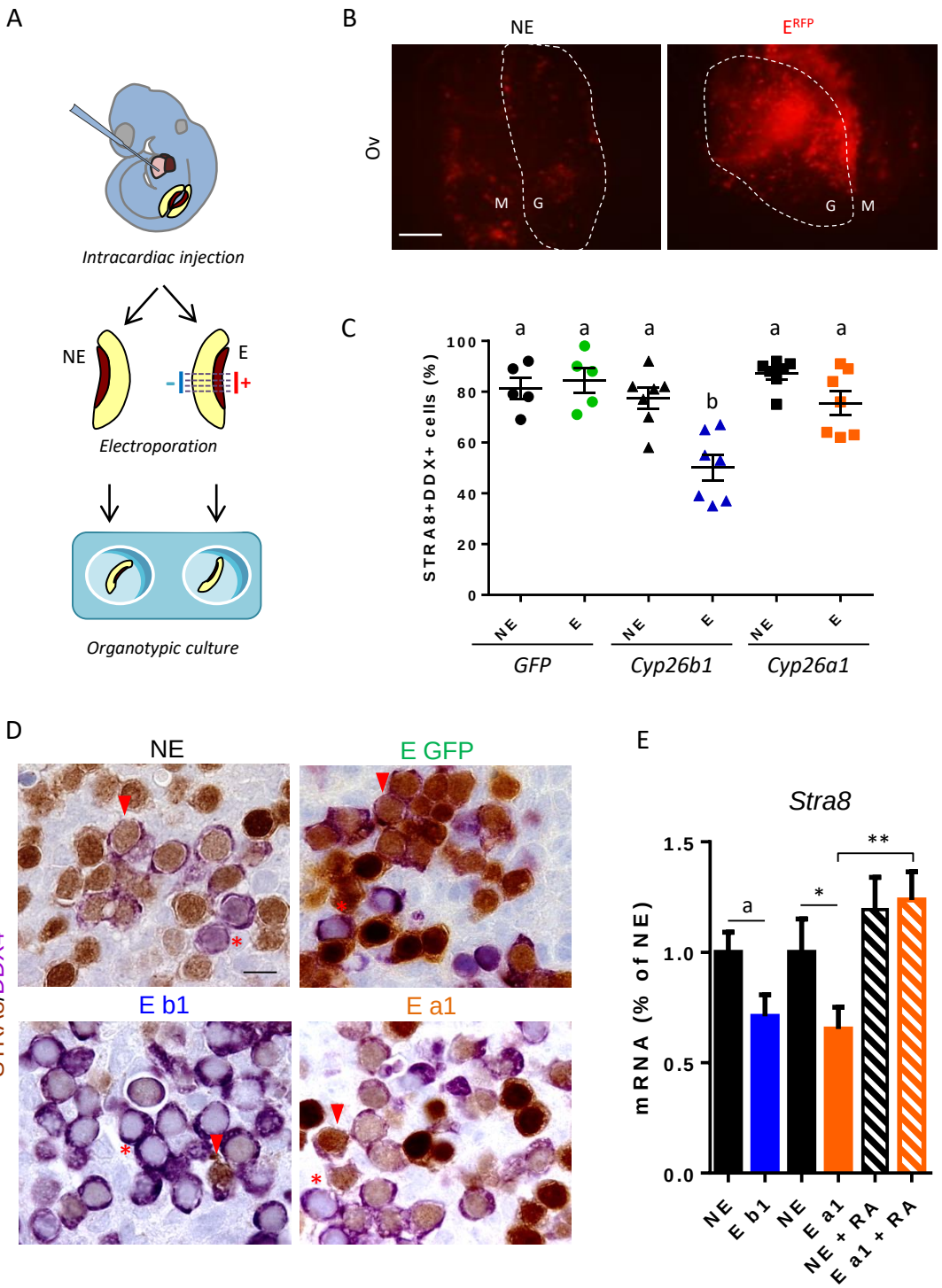

A
Intracardiac injection
NE
E
Electroporation
Organotypic culture
B
NE
E^RFP
Ov
M
G
G
M
C
STRA8+DDX+ cells (%)
100
80
60
40
20
0
a
a
a
b
a
a
NE
E
NE
E
NE
E
GFP
Cyp26b1
Cyp26a1
D
NE
E GFP
E b1
E a1
STRA8/DDX4
E
Stra8
mRNA (% of NE)
1.5
1.0
0.5
0.0
a
*
**
NE
E b1
NE
E a1
NE + RA
E a1 + RA

Figure 5. Ectopic expression of *Cyp26a1* does not reduce the number of STRA8-positive germ cells. A) Schematic representation of the experimental protocol used to electroporate plasmids into 12.3 dpc fetal gonads: intracardiac injection of plasmids diluted in PBS and trypan blue; after 30 min one gonad is electroporated (E). The controlateral gonad is used as non-electroporated control (NE). E and NE gonads are cultured for 48h on inserts (organotypic culture). B) RFP detection in ovaries (Ov) NE or E with RFP plasmid. White dotted lines encercle gonads (G). Adjacent mesonephros (M) is indicated. Scale bar: 200μm. C) 12.3 fetal ovaries are non-electroporated (NE) or electroporated with GFP (E GFP), Cyp26b1 (E b1) or Cyp26a1 (E a1). After 48h of culture, the percentage of STRA8-positive/DDX4-positive cells is represented. GFP: n=5; Cyp26b1: n=7; Cyp26a1: n=7. Different letters indicate significantly different data (multiple comparisons ANOVA). D) Immunohistochemical detection of STRA8 and DDX4 in sections of fetal E or NE ovaries. Red stars indicate STRA8-negative/DDX4-positive cells; red arrows indicate STRA8-positive/DDX4-positive cells. Scale bar: 50μm E) mRNA expression level of Stra8. Values are normalised to Ddx4 (germ cell specific marker). The RA treatment of Cyp26a1-electroporated ovaries prevents the decrease of Stra8 expression. a, p=0,053; *p=0,041; **p=0,0071 (paired t-test between E and contralateral NE ovaries; unpaired t-test between E and NE ovaries of different embryos) n=5.

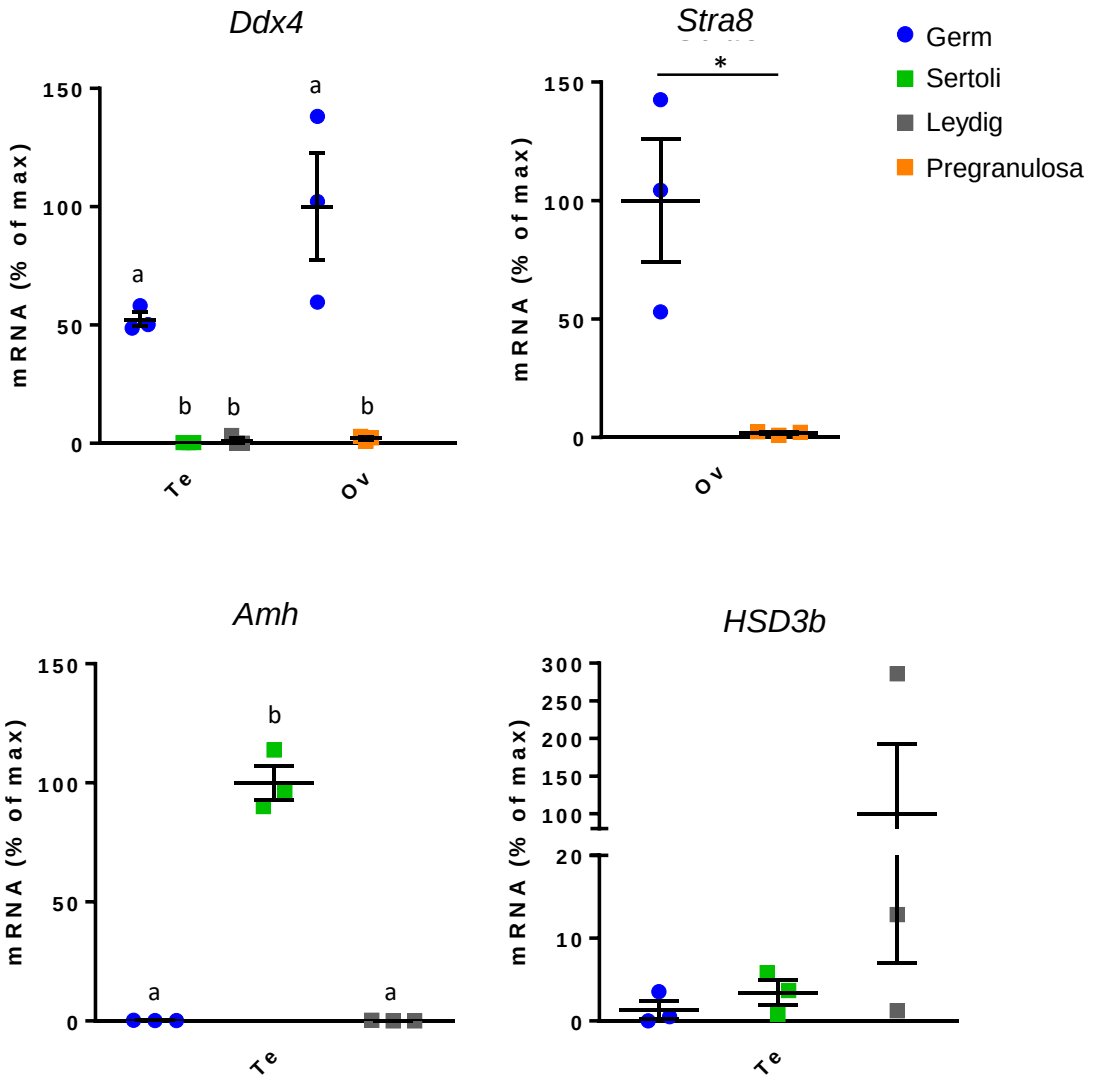


Figure S1. Purified germ and somatic cell populations of fetal gonads express specific markers. Analysis of mRNA expression of markers specific of the different purified population of gonad cells. Ddx4: germ cell marker; Stra8: pre-meiotic cell marker; Amh: Sertoli cell marker; HSD3b: Leydig cell marker. Ddx4, Amh and HSD3b values are normalised to the housekeeping gene β-Actin; Stra8 values are normalised to the GC specific marker Ddx4. RNA levels are expressed as percentage of maximum (i.e. maximal values are defined as 100%). Different letters indicate significantly different data (multiple comparisons ANOVA). *p<0,05 (non-parametric t-test) Mean ± SEM, n=3.

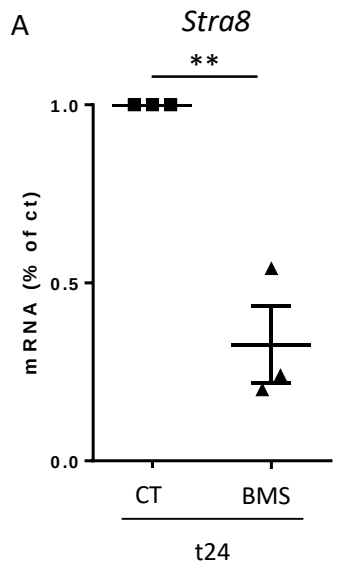


Figure S2. Long-term inhibition of RA signalling prevents *Stra8* expression. Analysis of mRNA expression of Stra8 in 12.2 fetal ovaries cultured for 24h (t24) in culture medium (CT) or in culture medium with 10-6M BMS-494. Values are normalised to the germ cell specific marker Ddx4. RNA levels are expressed as percentage of controls (i.e. t24 control values are defined as 100%). Mean ± SEM, n=3. **p<0,01 unpaired t-test.

A

	Fetus	Heart beating		Blue		E surface			
		Absent	Present	-	+	-	+	++	nd
E GFP	11	1	10	2	9	2	3	6	0
E B1	43	5	38	12	31	10	15	18	0
E A1	34	15	19	18	16	7	8	3	16
Tot	88	21	67	32	56	19	26	27	16

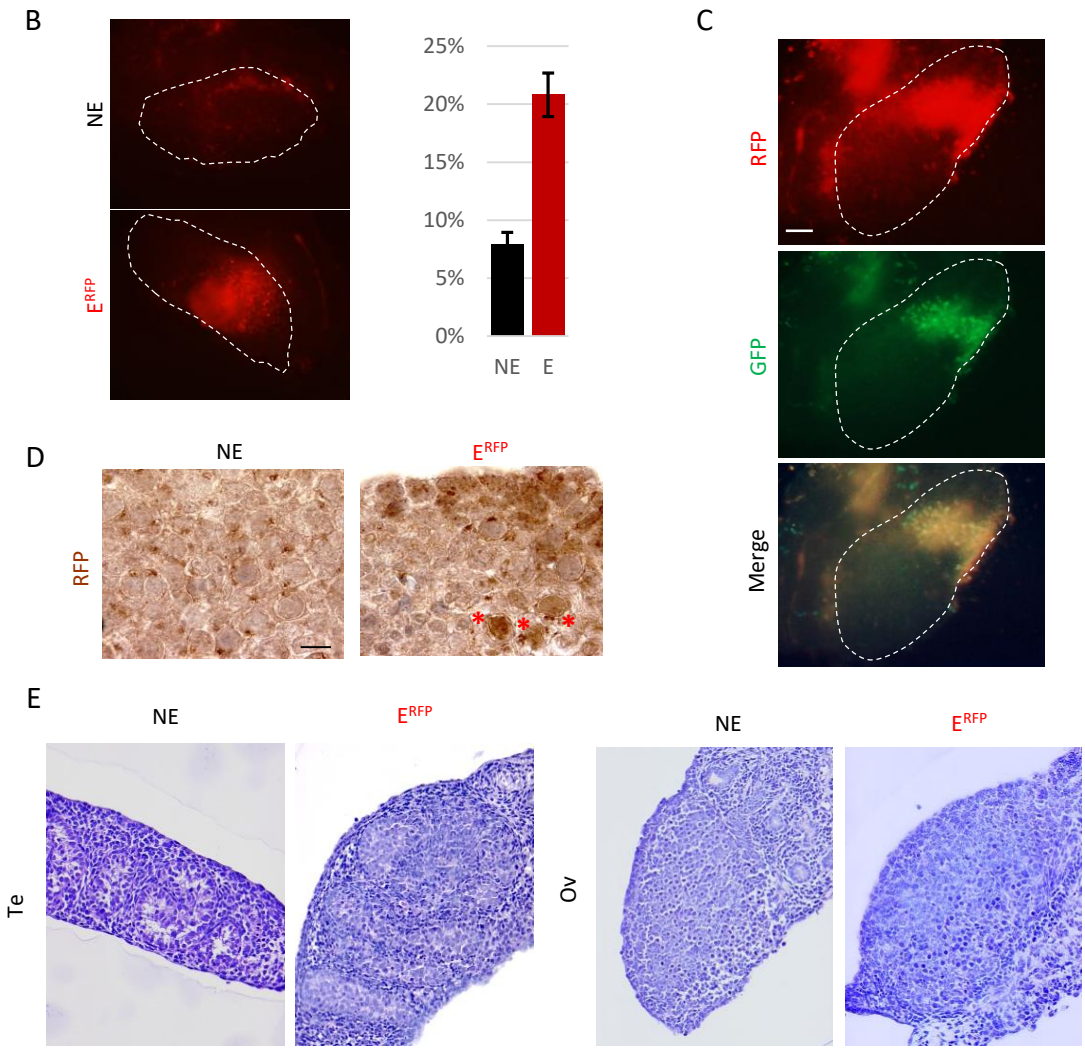


Figure S3. **Intracardiac injection and electroporation of plasmids allow the ectopic expression of proteins in fetal gonads.** A) Table summary of fetus electroporated with GFP (E GFP), Cyp26b1 (E B1) or Cyp26a1 (E A1). After intracardiac injection heart of embryos are still beating (Present) or not (Absent). After 30 min of incubation, intracardiac injected fetus are blue (+) or not (-). Electroporated (E) gonad surface is evaluated after 48h of culture by macroscopic observation of RFP. We classified gonads into three categories depending on the intensity of the RFP: absent (-), between 5% and 15% (+) or >15% (++) of red-fluorescence in the gonad. B) Percentage of red-fluorescent surface of NE (n=5) or E (n=11) with RFP electroporation. C) Macroscopic observation of an ovary co-electroporated with GFP and RFP: red and green fluorescence colocalises, indicating that plasmids are contransfected in the same cells. Scale bar: 50µm D) Immunohistochemical analysis of RFP in sections of ovaries NE or E with RFP. Red stars indicate RFP-positive cells. Scale bar: 200µm E) Testes (Te) and ovaries (Ov) NE or E with RFP stained with hematoxyline/eosine. Electroporation does not alter the morphology of fetal gonads.

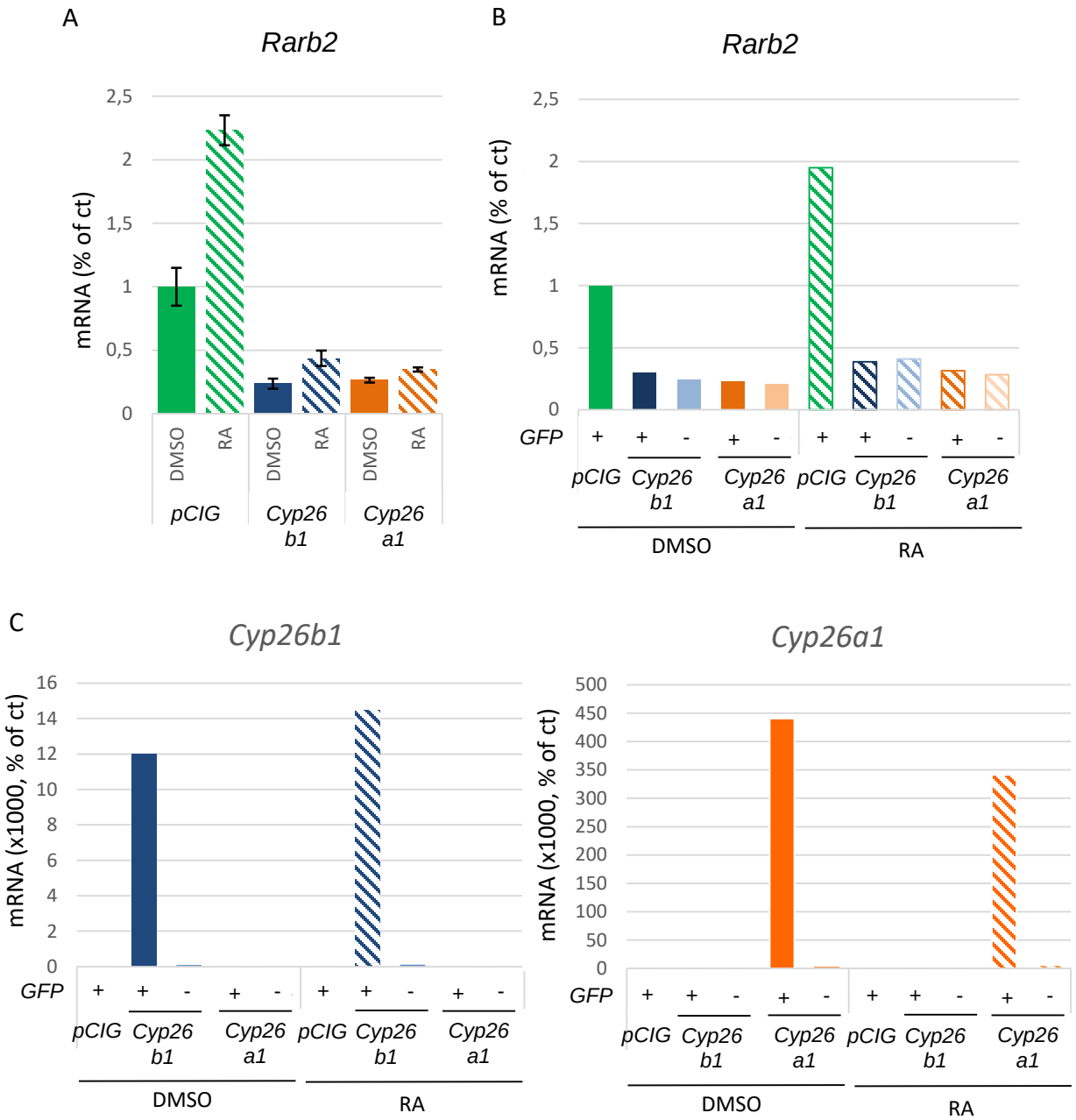


Figure S4. *Cyp26b1* or *Cyp26a1* overexpression equally inhibits *Rarb2* expression. HEK-293 are transfected with pCIG, empty (GFP) or coding for Cyp26b1 or Cyp26a1 and cultured with DMSO (control) or 10-7M RA. A) After culture, mRNA expression level of the RA-target gene Rarb2 is quantified by RT-qPCR. Values are normalised to the housekeeping gene β-Actin. mRNA levels are expressed as percentage of controls (i.e. control values are defined as 100%). Different letters indicate significantly different data (multiple comparisons ANOVA). Mean ± SEM, n=5. B) and C) Transfected (GFP +) and non-transfected (GFP -) cells of the same plate are isolated and analysed independently by RT-qPCR. B) mRNA expression level of the RA-target gene Rarb2; C) mRNA expression level of Cyp26b1 and Cyp26a1 is quantified to verify the purification level of transfected and non-transfected cells. Values are normalised to the housekeeping gene β-Actin. mRNA levels are expressed as percentage of controls (i.e. control values are defined as 100%). n=2

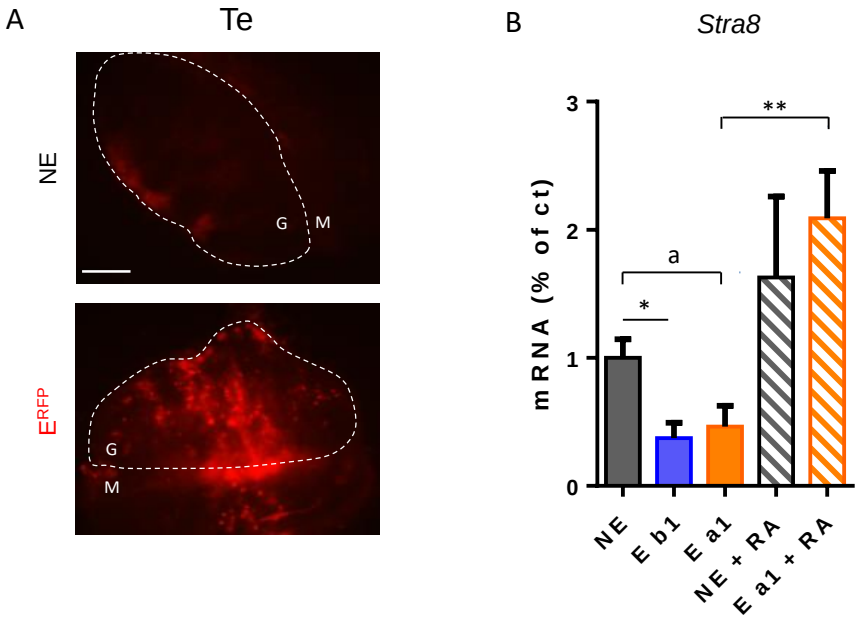


Figure S5. Ectopic expression of *Cyp26b1* or *Cyp26a1* decreases *Stra8* expression in fetal testes. A) RFP detection in testes (Te) NE or E with RFP. White dotted lines encercle gonads (G). Adjacent mesonephros (M) is indicated. Scale bar: 200µm. B) 12.3 fetal testes are non-electroporated (NE) or electroporated with GFP (E GFP), *Cyp26b1* (E b1, n=5) or *Cyp26a1* (E a1, n=4). After 48h of culture, mRNA expression level of *Stra8* is measured. Values are normalised to *Ddx4* (GC specific marker). The RA treatment of *Cyp26a1*-electroporated testes prevents the decrease of *Stra8* expression. a=0.052; *p<0.05; **p<0.01 (multiple comparisons ANOVA)

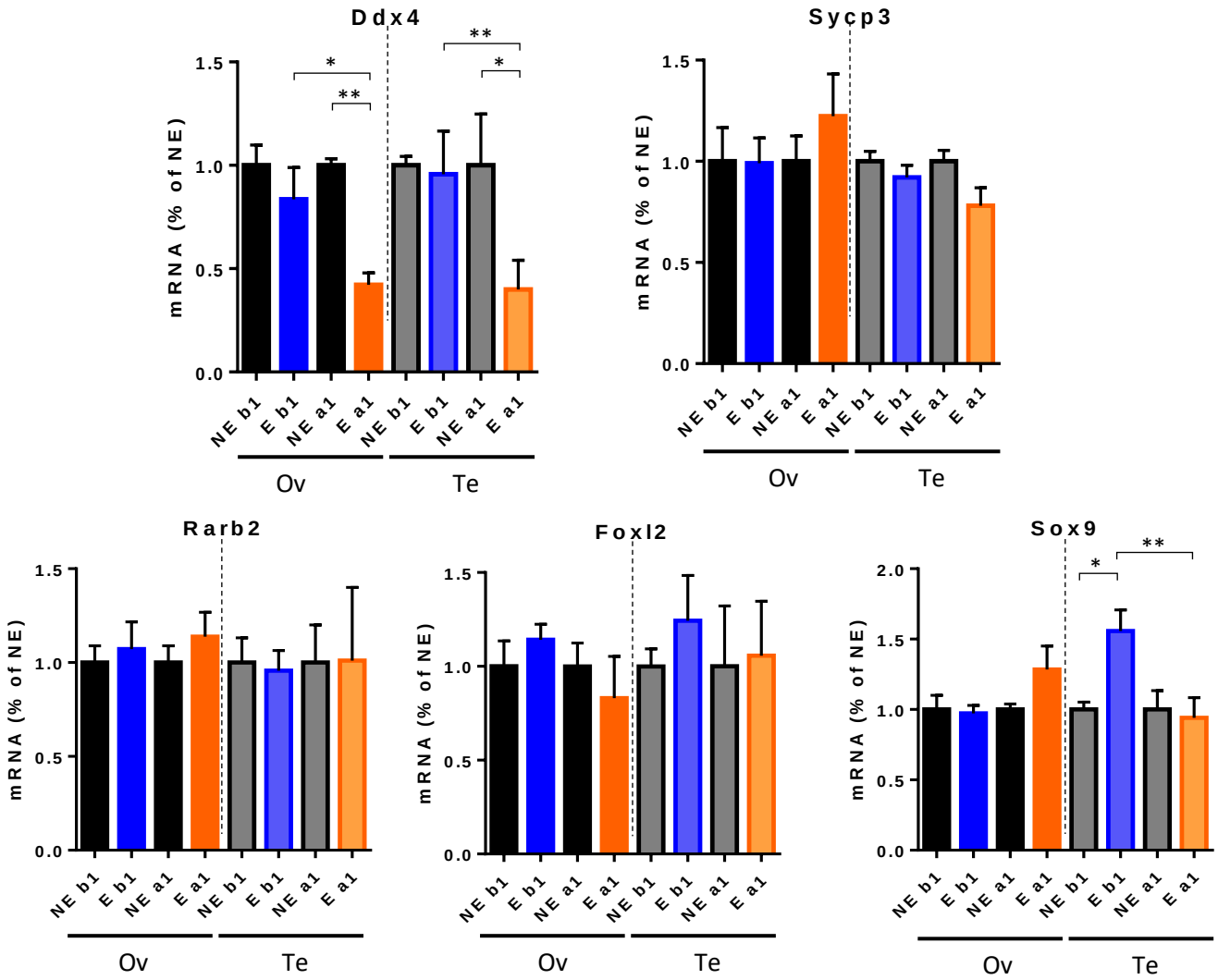


Figure 3: Analyse de l'expression de différents gènes dans les gonades électroporées. L'expression des gènes est mesurée par RT-qPCR 48 h après l'électroporation. Ovaires (Ov) et testicules (Te) non-électroporés (NE) ou électroporés (E) avec *Cyp26b1* ou *Cyp26a1.* Les valeurs de *Rarb2, Foxl2* et *Sox9* sont normalisées sur la β-actine; les valeurs de *Sycp3* sont normalisés sur *Ddx4* (CG spécifique). La moyenne des valeurs NE est normalisée à 1. Les barres représentent les moyennes ± SEM. Ov: n=5 pools de 2 à 3 ovaires. Te: n=5 (*Cyp26b1*) ou n=4 (*Cyp26a1*) pools de 2 à 3 testicules. * P<0,05; **P<0,01 (test t non apparié entre E b1 et E a1 ou apparié entre NE b1 et E b1 et entre NE a1 et E a1)

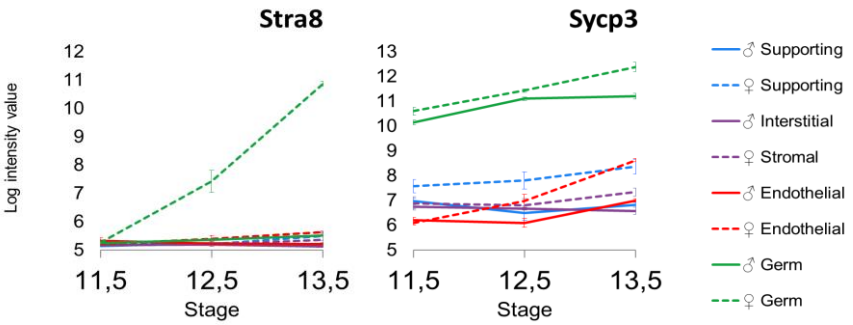


Figure 4: Profils d'expression de *Stra8* et *Sycp3* dans des populations cellulaires purifiées de gonades fœtales. Les graphiques représentent les valeurs d'expression des gènes *Stra8* et *Sycp3* obtenus par microarray à trois différents âges fœtaux: 11,5 jpc; 12,5 jpc et 13,5 jpc . Les différentes couleurs correspondent à des types cellulaires différents, ovariens (lignes continues) ou testiculaires (lignes pointillées). En vert les cellules germinales. En bleu, violet rouge différents types de cellules somatiques. Tirés de l'analyse transcriptomique de Jameson et al., 2012.

I.C. Résultats complémentaires

I.C.1. Effet de l'électroporation sur l'expression de gènes cibles de l'AR et de déterminants du sexe gonadique

Dans l'article, nous avons montré par RT-qPCR, que l'expression de *Stra8* est diminuée dans les ovaires et les testicules électroporés avec *Cyp26b1* ou *Cyp26a1*. En même temps que l'analyse de l'expression de *Stra8*, nous avons effectué l'analyse d'autres transcrits (**Figure 3**). Tout d'abord, nous avons vérifié la présence de cellules germinales exprimant *Ddx4*: nous observons que *Ddx4* est exprimé dans les gonades électroporées, bien que de manière plus faible dans les gonades électroporées avec *Cyp26a1*. Une éventuelle baisse du nombre de cellules DDX4-positives serait à évaluer par comptage sur coupe. Ensuite, nous avons analysé l'expression des transcrits *Cyp26b1* et *Cyp26a1*. À travers cela nous espérions: I) confirmer l'efficacité de l'électroporation et II) confirmer l'efficacité de nos plasmides, étant donné que *Cyp26a1* et *Cyp26b1* sont eux-mêmes des gènes cibles de l'AR. Je ne montre pas ces résultats car, malgré différents essais, nous n'avons pas réussi à discriminer correctement les transcrits endogènes et plasmidiques et les résultats ne sont pas interprétables. Nous avons donc analysé un autre gène cible de l'AR, *Rarb2*. Cependant, le niveau d'expression de ce-dernier n'est pas modifié dans les gonades électroporées par rapport aux gonades non-electroporées. Cela pourrait être dû au fait que *Rarb2* n'est pas très sensible à l'AR, ou bien au fait que les ARN sont extraits à partir de gonades cultivées avec le mésonéphros. Étant donné que *Rarb2* est un gène ubiquitaire, son expression dans les cellules du mésonéphros pourrait masquer un effet de l'électroporation sur l'expression de *Rarb2* dans les gonades.

Par la suite nous avons analysé des gènes somatiques impliqués dans la détermination du sexe gonadique. *Foxl2* et *Sox9* sont deux déterminants génétiques, respectivement ovarien et testiculaire. Nous ne détectons pas d'augmentation de *Foxl2* ni de diminution de *Sox9* dans les ovaires électroporés; de même nous ne détectons pas d'augmentation de *Foxl2* ni de diminution de *Sox9* dans les testicules électroporés. Cela nous permet d'exclure une inversion du sexe gonadique (somatique) due à la surexpression des *Cyp26*. En effet, la baisse de *Stra8* dans les ovaires fœtaux électroporés aurait pu représenter un effet secondaire dû à la transdifférenciation des ovaires en testicules. En outre, nous détectons une augmentation de l'expression de *Sox9* dans les testicules électroporés avec *Cyp26b1*. Ce résultat est complémentaire aux résultats récemment publiés par l'équipe de Peter Koopman qui montre une augmentation de *Foxl2* et une diminution de *Sox9* (formation d'un *ovotestis)* dans des embryons XY invalidés pour *Cyp26b1* (Bowles et al., 2018).

Enfin, nous avons analysé *Sycp3*, un gène méiotique-spécifique. *Sycp3* ne varie pas de manière significative, à la différence de *Stra8*. Cela est surprenant, car on s'attendrait à voir une baisse de *Sycp3* correspondante à la baisse de *Stra8*. Ceci pourrait être dû au fait que *Sycp3* est exprimé à un faible niveau dans des cellules germinales qui n'ont pas encore débuté la méiose. Ainsi, en étudiant le transcriptome de Jameson et al. (Jameson et al., 2012) on constate que *Stra8* augmente à 12,5 jpc, avec un pic d'expression à 13,5 jpc, spécifiquement dans les CG ovariennes; tandis que *Sycp3* est présent à un niveau quasi-constant dans les CG ovariennes et testiculaires entre 11,5 et 13,5 jpc (**Figure 4**). Le pic d'expression de *Sycp3*, spécifique à l'entrée en méiose et qui suit l'expression de *Stra8*, est donc plus tardif. Des travaux complémentaires seront

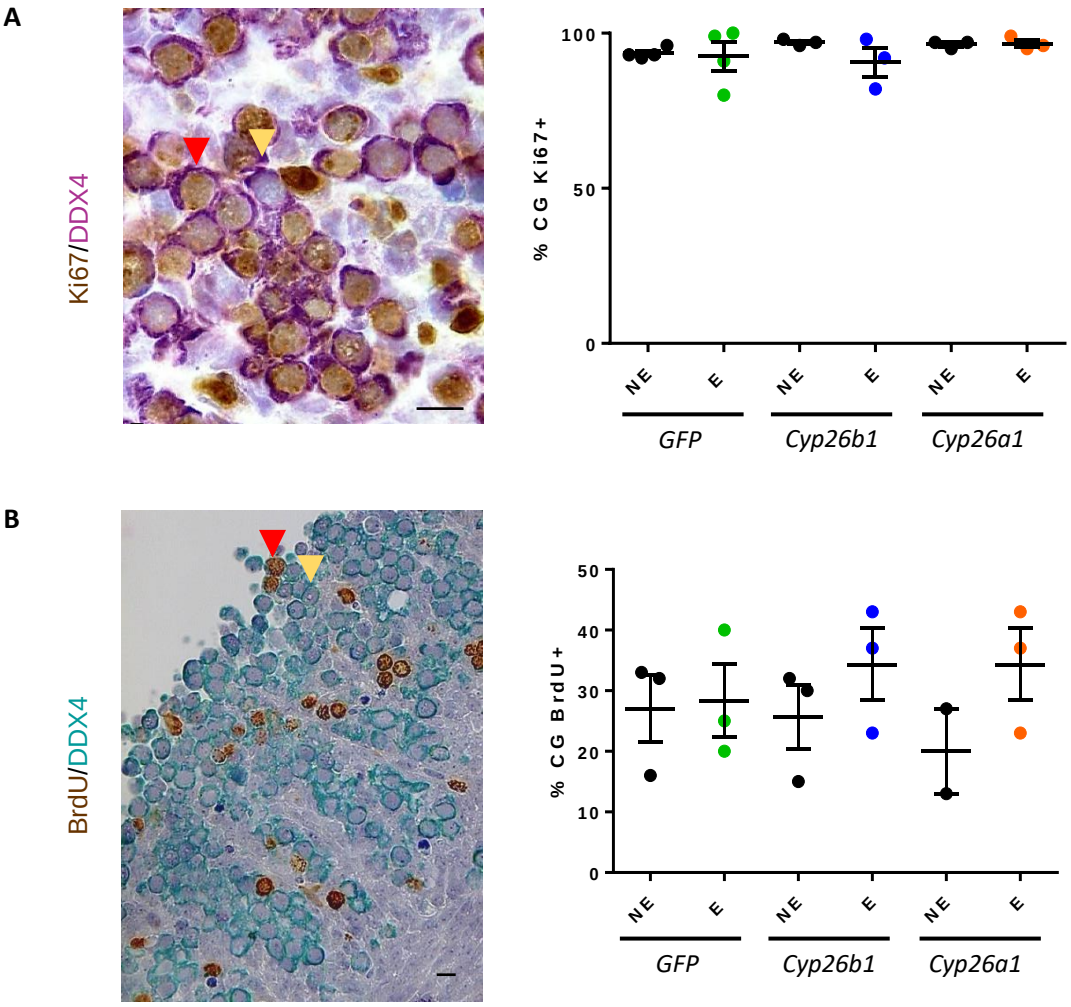


Figure 5: Effet de l'électroporation de *Cyp26b1* ou *Cyp26a1* sur la prolifération des cellules germinales femelles. A) Représentation du double-marquage DDX4 (CG spécifique, cytoplasmique, violet) et Ki67 (nucléaire, marron) sur une section d'ovaire. Cellule DDX4-positive (DDX4+) et Ki67-negative (Ki67-) indiquée par une pointe jaune; cellule DDX4+ et Ki67-positive (Ki67+) indiquée avec une pointe rouge. Barre: 10 µm. À droite, représentation du pourcentage de CG Ki67+ dans des ovaires non-électroporés (NE) ou électroporés (E) avec *GFP*, *Cyp26a1* ou *Cyp26b1*. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. **B)** Représentation du double-marquage DDX4 (CG spécifique, cytoplasmique, vert) et BrdU (nucléaire, marron) sur une sections d'ovaires. Cellule DDX4-positive (DDX4+) et BrdU-negative (BrdU-) indiquée avec une pointe jaune; cellule DDX4+ et BrdU-positive (BrdU+) indiquée avec une pointe rouge. Barre: 10 µm. À droite, représentation du pourcentage de CG BrdU+ non-électroporés (NE) ou électroporés (E) avec *GFP*, *Cyp26a1* ou *Cyp26b1*. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM.

nécessaires pour confirmer, au niveau protéique, que les cellules STRA8-négatives sont également SYCP3-négatives dans les ovaires électroporés. Cela permettra de confirmer que les CG STRA8-négatives en présence de *Cyp26b1*, sont bloquées avant l'entrée en méiose (donc STRA8- et SYCP3-négatives) et d'exclure qu'elles aient potentiellement progressé plus rapidement en méiose (STRA8-négatives/SYCP3-positives).

Ces analyses en RT-qPCR n'ont donc pas été très concluantes mais ont permis, principalement, d'exclure une transdifférenciation des ovaires en testicules suite à l'expression ectopique de *Cyp26b1* ou *Cyp26a1*. Notons cependant que nous retrouvons à nouveau des effets spécifiques à *Cyp26b1* ou *Cyp26a1* respectivement sur l'expression de *Sox9* et de *Ddx4*. Cela renforce l'idée que les deux enzymes peuvent avoir des activités différentes.

I.C.1. Analyse de la prolifération des CG

L'AR a été caractérisé pour son rôle dans la stimulation de la prolifération des CG. Nous avons donc analysé la prolifération des CG dans les ovaires électroporés avec *Cyp26b1* ou *Cyp26a1*. Nous avons utilisé deux différents marqueurs de « prolifération » : Ki67 et BrdU, pour répondre à deux questions indépendantes. En effet, Ki67 marque les cellules cyclantes, mitotiques et méiotiques, mais pas les cellules quiescentes. De manière intéressante, nous ne détectons pas de diminution du nombre de CG Ki67-positives, ce qui implique que les cellules STRA8-négatives/DDX4-positives dans les ovaires électroporés avec *Cyp26b1* sont prolifératives et pas quiescentes (**Figure 5A**). Elles n'ont donc pas entamé la voie mâle, malgré l'absence d'initiation méiotique. Le BrdU s'incorpore à l'ADN au cours de la réplication et permet ainsi de marquer les cellules en phase S. Les cellules méiotiques, ayant déjà effectué la transition mitose/méiose, n'incorporent pas le BrdU. De manière intéressante, nous détectons une tendance à l'augmentation des cellules germinales BrdU-positives/DDX4-positives dans les ovaires électroporés avec *Cyp26b1* ou avec *Cyp26a1* (**Figure 5B**). Ce résultat pourrait signer un allongement de la phase S lorsque l'expression de *Stra8* est diminuée. Cela devra être confirmé par des co-marquages STRA8-BrdU.

Nous sommes actuellement en train de quantifier les cellules germinales et les cellules de Sertoli prolifératives dans les testicules fœtaux électroporés avec *Cyp26b1* et *Cyp26a1*. Dans nos expériences préliminaires nous avons observé que le pourcentage de CG Ki67-négatives est important et équivalent entre testicules E et NE, ce qui signifie que les CG entrent normalement en quiescence. Cela est attendu si l'on pense que CYP26B1 est présent physiologiquement dans les testicules, où les CG entrent en quiescence.

Ces résultats montrent que, malgré la diminution du pourcentage de cellules germinales STRA8-positives, l'expression ectopique de CYP26B1 n'a aucun effet sur l'entrée en quiescence des cellules germinales. Cela permet de séparer la prévention de la méiose (par CYP26B1) et l'induction de la quiescence.

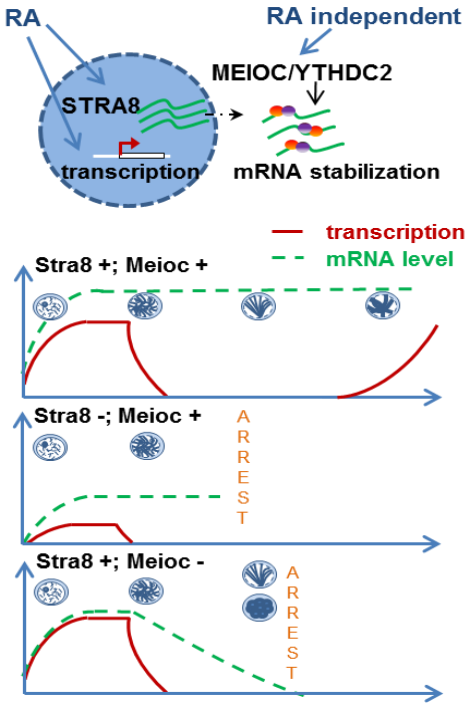


Figure 6: Modèle de départ sur les rôles potentiels de STRA8 et MEIOC dans l'initiation de la méiose. Ce modèle dérive des conclusions de Abby et al., 2016 et est tiré de la thèse d'Emilie Abby. Dans ce modèle, STRA8, activé par l'AR, régule l'expression de nombreux gènes, au moment de la transition mitose/méiose, au niveau transcriptionnel; tandis que MEIOC et sont partenaire YTHDC2 stabiliseraient post-transcriptionnellement le programme méiotique. La voie MEIOC/YTHDC2 est indépendante de la signalisation de l'AR. Dans les mutants *Stra8 -/-* le niveau d'ARNm (ligne verte en pointillés) est faible du à une baisse de l'activité transcriptionnelle (ligne rouge). Dans les mutants *Meioc -/-*, les ARN sont transcrits mais dégradés rapidement à cause d'une diminution de leur stabilisation.

II. Le rôle clé de trois régulateurs du programme méiotique : Stra8, Meioc, et Ythdc2

Avant mon arrivée en thèse, le laboratoire a identifié et caractérisé un nouvel acteur impliqué dans le *switch* programme mitotique/programme méiotique : **MEIOC** (Abby et al., 2016). L'invalidation de *Meioc* chez la souris, induit un arrêt de méiose très précoce, au stade zygotène-like, chez la femelle ainsi que chez le mâle. Les défauts observés sont multiples: défaut de formation du complexe synaptonémal, défaut de réparation des cassures double-brin, présence de métaphases anormales. De façon notable, ces défauts sont reliés à une altération d'initiation du programme méiotique. En effet, l'analyse des transcrits chez les mutants *Meioc -/-*, montre une diminution d'expression de plusieurs gènes méiotiques. Ce phénotype est comparable à celui des souris *Stra8 -/-*. En effet, l'invalidation de *Stra8* induit une diminution de l'expression des gènes méiotiques, associée avec une mise en place défectueuse du programme méiotique et un arrêt très précoce de la méiose. Abby et al. ont montré que *Meioc* est activé de manière indépendante à la voie de signalisation AR/*Stra8*. En effet, *Meioc* est détecté dans des testicules *Stra8 -/-* ainsi que dans des testicules traités au BMS493, agoniste inverse des RAR. De manière intéressante, Abby et al. proposent un rôle de MEIOC au niveau post-transcriptionnel, dans la **stabilisation des ARN méiotiques**, différent de celui de STRA8 qui est impliqué dans la régulation transcriptionnelle (modèle schématisé en **Figure 6**). **YTHDC2**, une hélicase à ARN capable de lier ces derniers via la modification m6A, a été identifié comme partenaire principal de MEIOC.

Au cours de ma thèse j'ai continué le travail sur MEIOC et, en particulier, j'ai essayé de mieux définir la complémentarité des rôles de MEIOC et de STRA8. Malgré leurs rôles clés dans la transition du programme mitotique vers un programme méiotique, une partie des CG est capable de démarrer la méiose en absence de l'un ou de l'autre facteur. *Que se passerait-il si ces deux acteurs sont invalidés en même temps? Est-ce que l'absence concomitante des deux facteurs enlève toute possibilité d'initier la méiose ? Ou est-ce que certaines cellules arrivent quand même à passer le stade pré-leptotène, ce qui suggérerait la présence d'un troisième facteur clé pour l'initiation méiotique?*

Deuxièmement, j'ai effectué une comparaison des trois mutants *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* (ces derniers gracieusement fournis par J. Devanshi et S. Keeney) pour définir leur points en commun et leur dissemblances.

Cette partie de résultats non publiés démarre par l'analyse de l'effet de l'inhibition simultanée de *Stra8* et *Meioc* chez la souris et continue avec l'analyse du mutant *Ythdc2* en parallèle aux mutants *Stra8* et *Meioc*. Pour finir, je montre une comparaison entre l'invalidation de *Stra8* ou *Meioc* en fond C57BL/6 ou mixte (C57BL/6-NMRI).

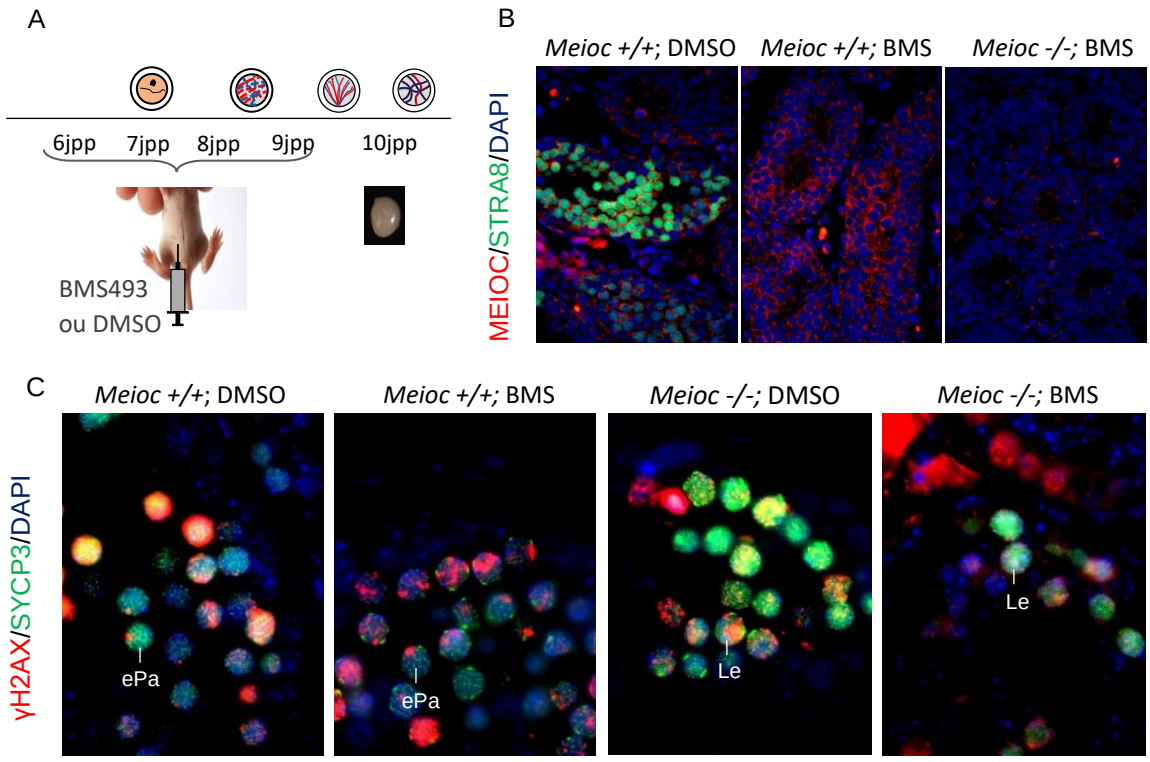


Figure 7: Inhibition de la voie de signalisation AR/*Stra8* dans des souriceaux *Meioc -/-*. A) Protocole d'inhibition de la voie de signalisation de l'AR par injection intrapéritonéale quotidienne de BMS 493 (BMS ; agoniste inverse des RAR) ou DMSO (contrôle) pendant quatre jours consécutifs (de 6 à 9 jpp). Les testicules sont prélevés à 10 jpp et analysés par immunohistologie ou RT-qPCR. **B)** Analyse par immunofluorescence de MEIOC (rouge) et STRA8 (vert). STRA8 est absent dans les testicules traités au BMS; MEIOC est absent dans les testicules *Meioc -/-* **C)** Analyse par immunofluorescence de γH2AX (rouge) et SYCP3 (vert). L'ADN est marqué en bleu (DAPI). ePa = early pachytène; Le= leptotène.

II.A. Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de l'Acide Rétinoïque dans des souriceaux *Meioc* -/-

En premier, nous avons inhibé chimiquement la voie de signalisation de l'AR dans des souriceaux *Meioc* +/+ et *Meioc* -/-, prévenant ainsi l'expression de *Stra8* dans les spermatocytes préméiotiques. Dans le testicule, ainsi que dans l'ovaire, l'AR est considéré comme étant le régulateur de l'activation de *Stra8*. Le protocole utilisé est schématisé en **Figure 7A**: nous avons traité des souriceaux, entre 6 et 9 jpp, avec du BMS 493 (BMS ; agoniste inverse des trois RAR) ou avec du DMSO (contrôle) par une injection intrapéritonéale quotidienne. Le début du traitement à 6 jpp permet d'inhiber l'expression de *Stra8* avant le stade préleptotène et donc avant l'entrée en méiose. Les testicules sont ensuite prélevés à 10 jpp.

Comme attendu, dans les testicules traités au BMS les spermatocytes n'expriment pas *Stra8* (**Figure 7B**). Comme déjà montré par Abby et al., le traitement au BMS ne prévient pas l'expression de MEIOC, ce qui confirme que MEIOC agit par une voie indépendante de l'AR et STRA8. De manière complémentaire, STRA8 est détecté dans les testicules *Meioc* -/-. En révélant SYCP3 et γH2AX on observe que, malgré l'absence de STRA8 dans les testicules *Meioc* +/+ traités au BMS, les spermatocytes atteignent le stade pachytène précoce, comme chez les contrôles traités au DMSO (**Figure 7C**). Les testicules *Meioc* -/- traités au DMSO bloquent au stade leptotène ou début du zygotène, ainsi que les mutants *Meioc* -/- traités au BMS. Nous concluons donc que la double-absence de MEIOC et STRA8 dans les spermatocytes, au moment de l'entrée en méiose, n'a pas des effets nettement plus néfastes que l'invalidation seule de *Meioc* (*Meioc* -/-) et ne prévient donc pas l'entrée en méiose de certains spermatocytes.

En connaissant le rôle de STRA8 et MEIOC dans la mise en place du programme méiotique, nous avons analysé l'expression d'ARN méiotiques (**Figure 8**). À noter que les populations cellulaires retrouvées dans nos différentes conditions sont similaires, en particulier les populations présentes dans les testicules *Meioc* -/- traités au DMSO ou au BMS. Cela permet de les comparer sans le biais commun aux analyses de testicules sauvages et de testicules mutants ayant des répartitions cellulaires très différentes. En premier, nous confirmons que *Stra8* est très faiblement exprimé en présence de BMS493. *Stra8* est augmenté dans les testicules *Meioc* -/-, ce qui peut être dû à I) une accumulation, dans les testicules *Meioc* -/-, des spermatocytes exprimant STRA8 ou à II) un effet de l'invalidation de *Meioc* sur *Stra8* qui induirait ainsi l'augmentation de son niveau d'expression par spermatocyte. En parallèle, nous observons que *Meioc* est exprimé dans les testicules *Meioc* +/+ traités au BMS à un niveau comparable aux testicules contrôles *Meioc* +/+ traités au DMSO, ce qui confirme à nouveau que l'expression de *Meioc* est indépendante des RAR et de *Stra8*. Dans les testicules *Meioc* -/- le transcrit *Meioc* est absent.

Nous avons par la suite analysé l'expression de transcrits méiotiques-spécifiques, codant pour des facteurs impliqués dans différents évènements de la prophase I: la cohésine RAD21L, l'élément latéral du complexe synaptonémal SYCP3, la topoisomérase-like SPO11 et deux acteurs de la recombinaison homologue méiotique, MEIOB et SPATA22. L'expression de tous les transcrits analysés est plus faible dans les testicules *Meioc* -/- (BMS ou DMSO) et *Meioc* +/+ traités au BMS, par rapport aux testicules contrôles (*Meioc* +/+ traités au DMSO). De manière intéressante, l'absence de *Meioc* diminue plus fortement les ARN méiotiques par rapport à l'inhibition de *Stra8* par le BMS. En outre, dans les testicules *Meioc* -/- traités au BMS le niveau

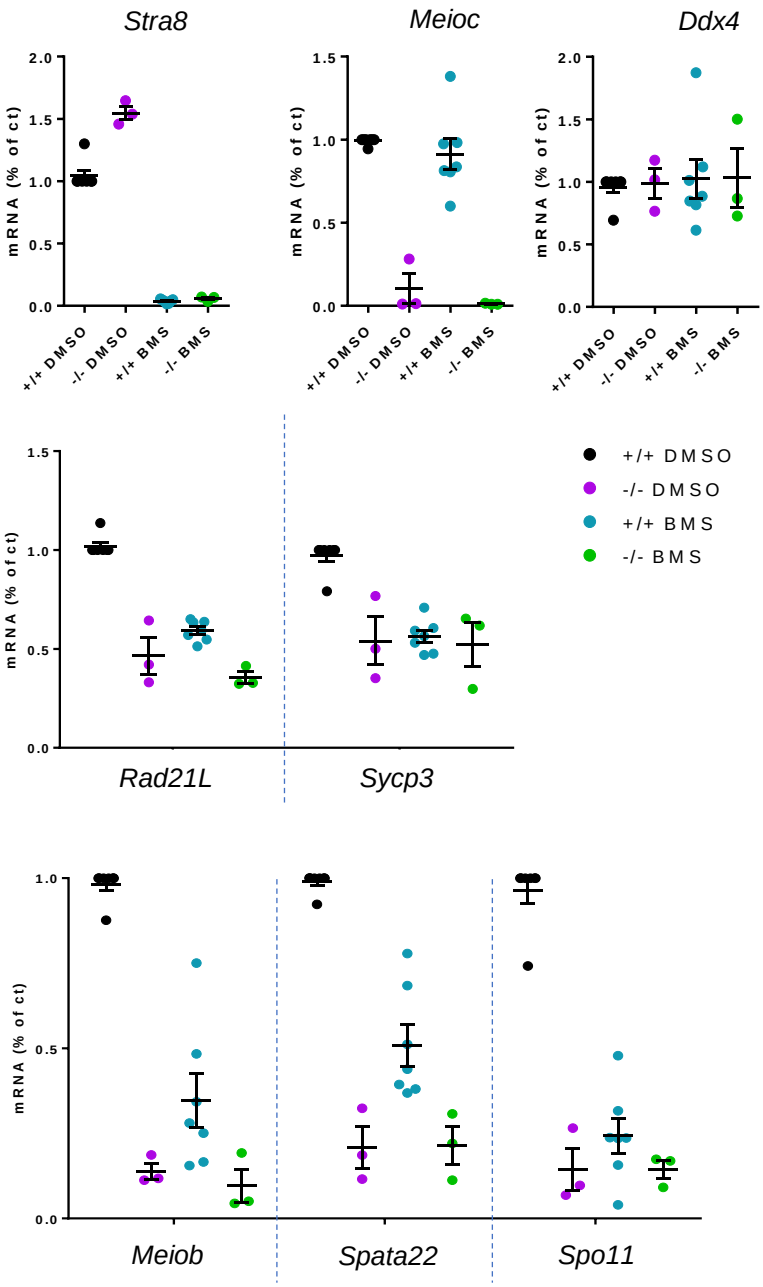


Figure 8: Analyse de l'expression d'ARN méiotiques dans les testicules *Meioc* mutants traités au BMS. L'expression des gènes est mesurée par RT-qPCR dans les testicules 10 jpp *Meioc* +/+ (+/+) ou *Meioc* -/- (-/-) traités au DMSO ou au BMS493 (BMS). Les valeurs sont normalisées sur *Ddx4* (CG spécifique). Les valeurs de *Ddx4* sont normalisées sur la *β-actine.* Les valeurs de la condition contrôle Meioc +/+; DMSO sont rapportés à 1 (% of ct). Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM. +/+ DMSO: n=6 ; -/- DMSO: n=3 ; +/+ BMS: n=7 ; -/- BMS: n=3.

d'expression des ARN est comparable aux testicules *Meioc* -/- traités au DMSO. De manière étonnante cela suggère que STRA8 et MEIOC n'ont pas de rôles additifs.

Nous avons par la suite analysé l'expression des ARN pré-messagers (pré-ARN) des ARN méiotiques précédemment analysés dans nos différentes conditions (**Figure 9**). En effet, Abby et al. proposent une diminution de l'expression des ARN dans les testicules mutants *Meioc* -/- mais une absence de diminution du niveau des pré-ARN correspondants, à 8 jpp. C'est en partie grâce à ce résultat qu'ils ont proposé le rôle de MEIOC sur la stabilisation des ARN méiotiques. Notre analyse montre que, contrairement à ce que l'on attendait, les pré-ARN diminuent dans les mutants *Meioc* -/- (**Figure 9**). Ce résultat est donc contradictoire par rapport au résultat obtenu préalablement par Abby et al.. Cette différence est peut-être due au fait que nous analysons les transcrits à 10 jpp plutôt qu'à 8 jpp : en effet, à 8jpp les spermatocytes se trouvent au stade leptotène dans les testicules *Meioc* +/+ ainsi que dans les testicules *Meioc* -/- ; tandis qu'à 10 jpp nous observons dans les testicules *Meioc* +/+ (DMSO ou BMS) des spermatocytes en début de pachytène et dans les testicules *Meioc* -/- (DMSO ou BMS) des spermatocytes bloqués au stade leptotène ou début du zygotène. Il faudrait donc répéter cette analyse à un âge plus précoce. En présence de BMS on retrouve cependant l'effet escompté de l'invalidation de *Meioc,* avec une plus forte diminution des ARN que des pré-ARN, suggérant une diminution de la stabilité.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que l'inhibition par le BMS de la voie de signalisation AR/*Stra8*, à partir de 6 jpp, donc en amont de l'entrée en méiose, ne prévient pas la transition mitose/méiose. Ceci montre l'importance de l'expression précoce de *Stra8* (spermatogonies A différenciés) dans l'entrée en méiose. Nous ne pouvons pas exclure complètement la présence d'une « fuite » d'expression de *Stra8* permettant aux CG de démarrer la méiose. Cependant, l'inhibition de la voie AR/STRA8 semble efficace, car nous montrons une absence de détection de Stra8 (protéine et ARN) dans les testicules traités au BMS, 24h après la dernière injection. En outre, nous confirmons que Meioc est indépendant de la voie AR/*Stra8*. Enfin, ces résultats nous permettent de montrer que l'inhibition de *Stra8* par le BMS, à partir de 6 jpp, et l'invalidation de *Meioc,* n'ont pas un effet additif sur l'altération de la progression méiotique et sur la dérégulation de l'expression de gènes méiotiques. Le phénotype des testicules *Meioc* -/- traités au BMS est en effet identique à celui des testicules *Meioc* -/- traités au DMSO.

II.B. Effet de la double invalidation de *Meioc* et *Stra8*

En inhibant chimiquement la voie de l'AR à partir de 6 jpp, nous prévenons l'expression de *Stra8* dans les spermatocytes pré-méiotiques mais pas dans les spermatogonies qui se sont différenciées avant 6 jpp. Cette dernière est probablement la cause de la progression des spermatocytes jusqu'au stade pachytène, malgré une dérégulation de l'expression de gènes méiotiques. Il a été en effet montré dans différentes études que l'invalidation transgénique de *Stra8* induit un blocage précoce de la prophase I avec un pourcentage réduit de spermatocytes qui initient la méiose (Anderson et al., 2008; Mark et al., 2008)

Pour analyser l'effet de l'invalidation concomitante de *Stra8* et *Meioc* sur l'entrée en méiose, nous avons créé un modèle de souris double-mutantes pour *Meioc* et *Stra8 (Meioc -/- Stra8 -/-).*

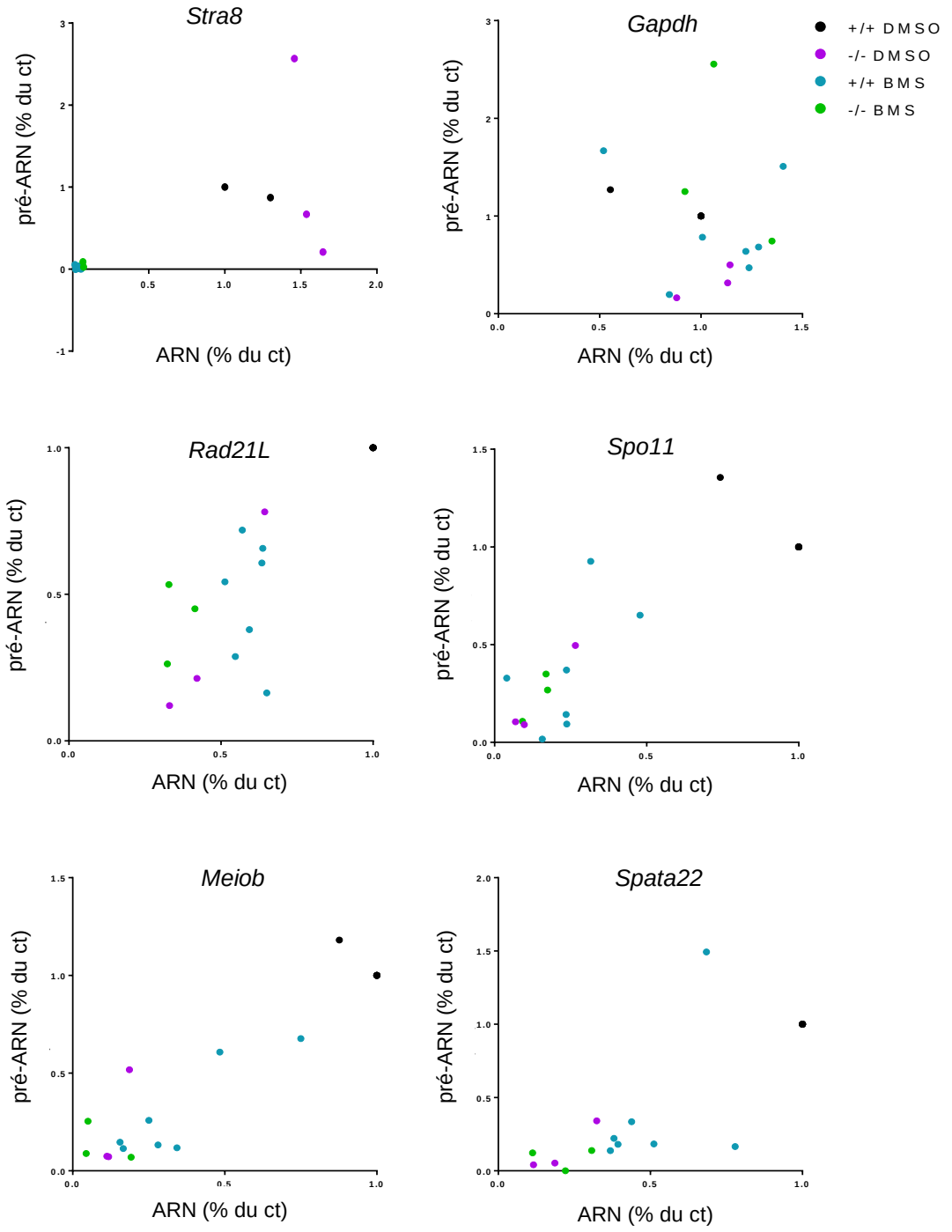


Figure 9: Analyse en plot de l'expression des pré-ARN versus les ARN matures. L'expression des ARN et des pré-ARN correspondants, est mesurée par RT-qPCR dans les testicules 10 jpp *Meioc* +/+ (+/+) ou *Meioc* -/- (-/-) traités au DMSO ou au BMS493 (BMS). Les valeurs sont normalisées sur *Ddx4* (CG spécifique). Les valeurs de la condition contrôle Meioc +/+ DMSO sont rapportés à 1 (% du ct). Pour exclure une contamination génomique, nous soustrayons les valeurs obtenues sur les échantillons rétro-transcrit sans RT (Retro transcriptase). L'expression des pré-ARN, non encore épissés, est quantifiée en utilisant des amorces ciblant les introns (Abby et al. 2016). +/+ DMSO: n=6 ; -/- DMSO: n=3 ; +/+ BMS: n=7 ; -/- BMS: n=3.

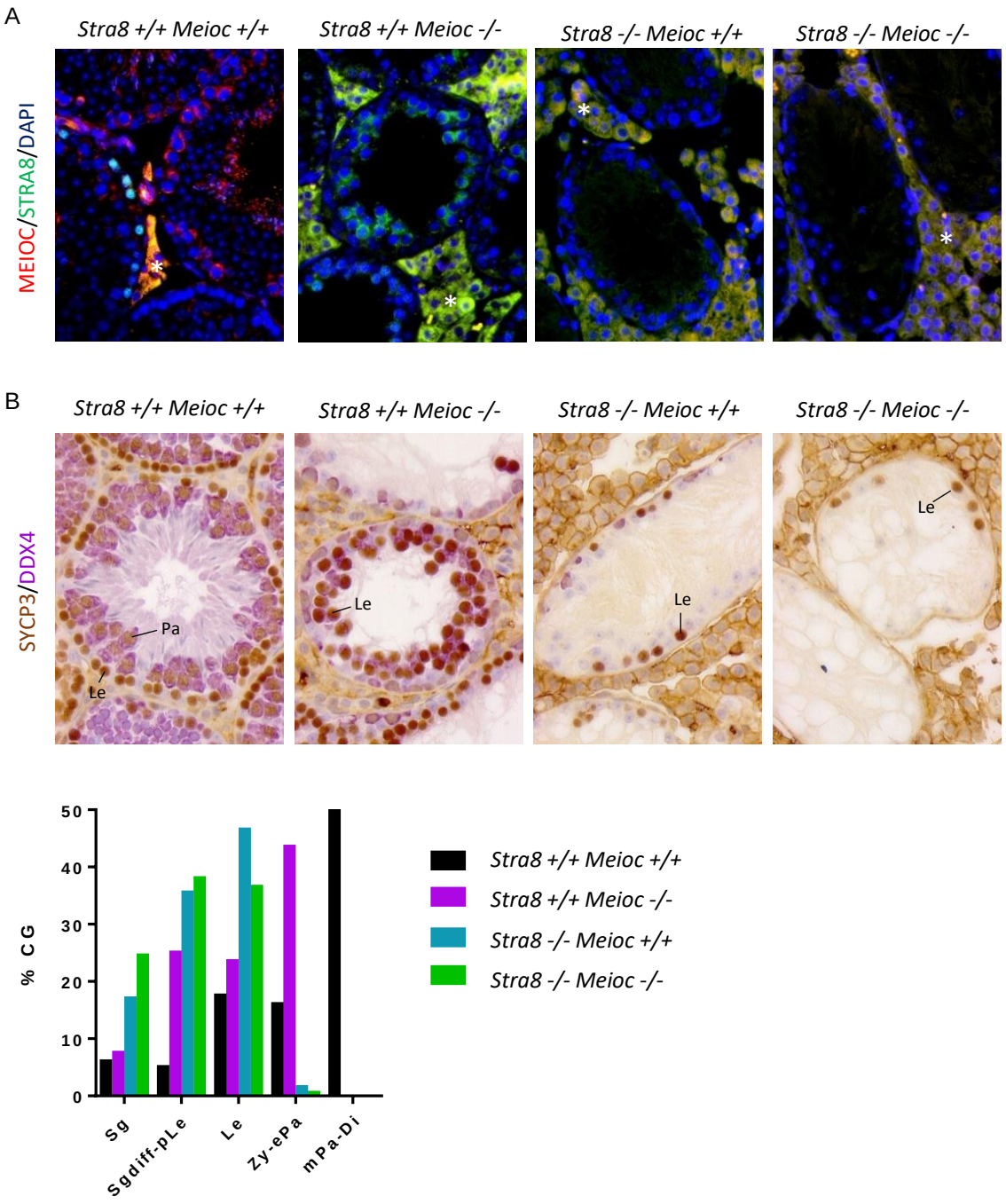


Figure 10: Effet de la double invalidation de *Meioc* et *Stra8* sur l'entrée en méiose. A) Analyse par immunofluorescence de MEIOC (rouge) et STRA8 (vert) de testicules adultes double mutants. L'ADN est marqué en bleu (DAPI). Étoiles blanches = signal aspécifique dans les cellules de Leydig. **B)** Analyse immunohistochimique de SYCP3 (marron) et DDX4 (violet). En bas, pourcentage de cellules aux différents stades pré-méiotiques et méiotiques. Le comptage a été effectué à l'aide des marquages DDX4 (marque toutes les cellules germinales) et SYCP3 (marque de manière différente les différents stades de prophase I). CG = Cellules Germinales ; Sg = Spermatogonies (SYCP3-négatives) ; Sgdiff-pLe = Spermatogonies en fin de différenciation et spermatocytes en préleptotène (SYCP3 faible) ; Le = spermatocytes en leptotène (SYCP3 fort et diffus) ; Zy-ePa = zygotène-early-pachytène (SYCP3 fort et diffus, on commence a distinguer les axes) ; mPa-Di = mid-pachytène-diplotène (SYCP3 tout le long des axes). n=2

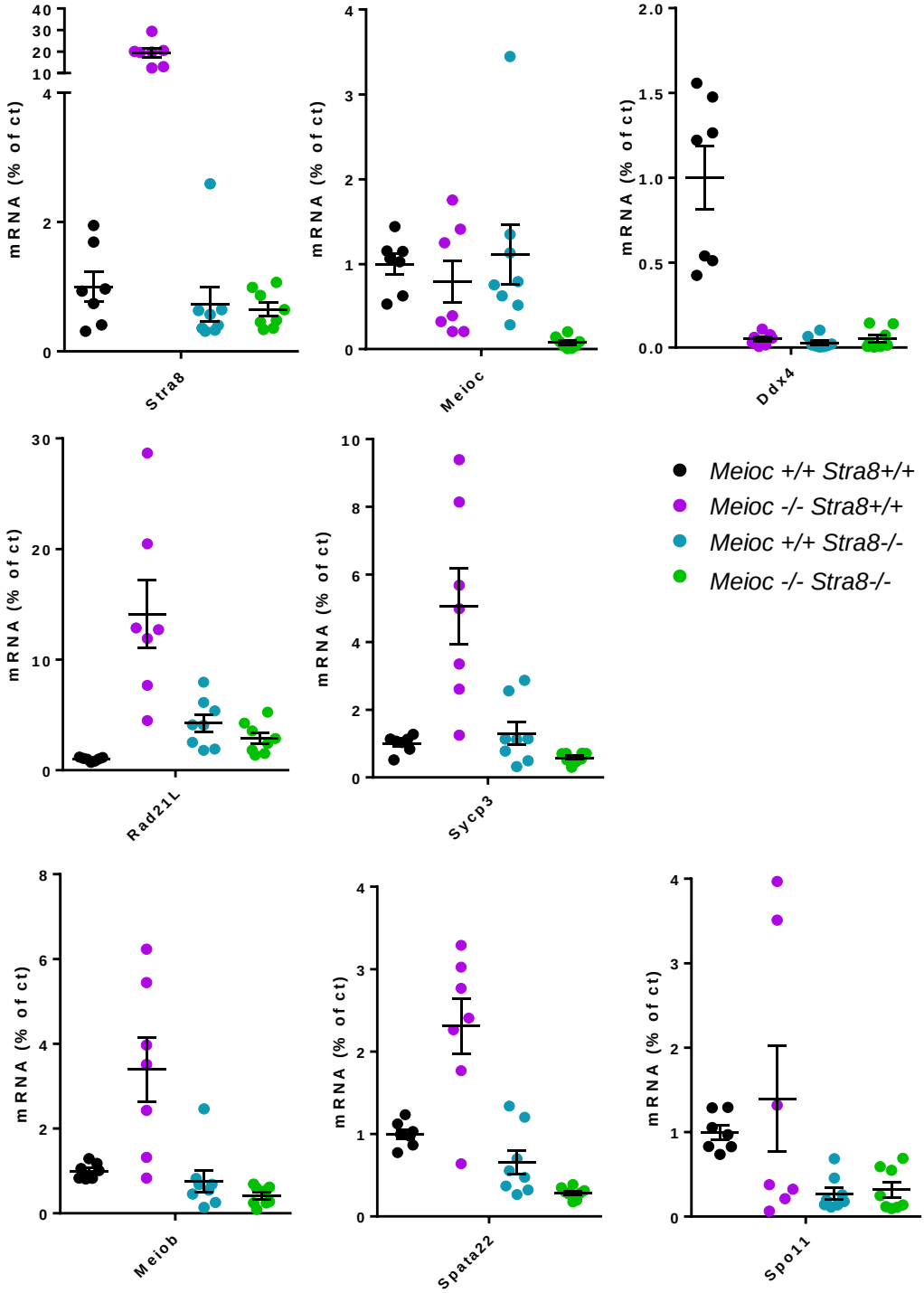


Figure 11: Analyse de l'expression d'ARN méiotiques dans des testicules adultes double mutants (*Meioc -/- Stra8 -/-*). L'expression de gènes méiotiques dans des testicules adultes double mutants est mesurée par RT-qPCR. Les valeurs sont normalisées sur *Ddx4* (CG spécifique). Les valeurs de *Ddx4* sont normalisés sur la *β-actine.* Les valeurs sont exprimées en pourcentage des contrôles (moyenne des valeurs des testicules sauvages *Meioc* +/+ *Stra8* +/+ rapporté à 1). Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM. n=7 (*Meioc* +/+ *Stra8* +/+ *; Meioc -/- Stra8* +/+) et n=8 (*Meioc* +/+ *Stra8 -/- ; Meioc -/- Stra8 -/-*)

En premier, nous confirmons, par immunomarquage, l'absence de MEIOC et STRA8 dans les testicules double-mutants *Meioc -/- Stra8 -/-* (**Figure 10A**). STRA8 est présent dans les spermatocytes *Meioc -/- Stra8 +/+*. La présence de MEIOC dans les mutants *Meioc +/ +Stra8 -/-* est difficile à confirmer à cause de l'absence, dans ces testicules, des spermatocytes exprimant MEIOC à un niveau important: stade pachytène. L'analyse en RT-qPCR permet cependant de confirmer la présence de *Meioc* dans les testicules mutants pour *Stra8* (*Meioc +/+ Stra8 -/-*) (**Figure 11**).

De manière intéressante, dans les testicules adultes double-mutants *Meioc -/- Stra8 -/-* nous observons une répartition des populations cellulaires très semblable aux mutants simples *Stra8 -/-* (**Figure 10B**). En effet, dans les deux cas, les spermatocytes en méiose sont rares et ceux-ci n'avancent pas au-delà du stade leptotène-*like*. Nous concluons donc que, même en absence simultanée de ces deux facteurs clés de l'initiation du programme méiotique, certains spermatocytes arrivent à entamer la méiose.

Nous avons ensuite analysé l'expression de gènes méiotiques, par RT-qPCR, dans des testicules adultes mutants (**Figure 11**). De manière intéressante, nous détectons une diminution majeure de ces gènes dans les testicules double-mutants (*Meioc -/- Stra8 -/-)* par rapport aux mutants simples *Meioc +/+ Stra8 -/-*. Concernant les mutants simples *Meioc -/- Stra8 +/+*, nous détectons un niveau d'expression plus fort par rapport aux testicules sauvages : ceci est dû à l'accumulation, chez ces mutants, de spermatocytes en début de méiose tandis que dans les testicules sauvages, à l'âge adulte, on retrouve une majorité de cellules post-méiotiques.

Pour finir, nous avons analysé l'expression des pré-ARN méiotiques chez les double-mutants *Meioc -/- Stra8 -/-* par rapport aux mutants simples *Meioc +/+ Stra8 -/-* (**Figure 12**). De manière intéressante, les ARN de *Spata22* et *Rad21L* diminuent plus fortement dans les doubles mutants que dans les mutants simples ; tandis que le niveau des pré-ARN *Spata22* et *Rad21L* sont comparables dans ces mutants. Ce résultat irait en faveur d'un rôle de MEIOC dans la stabilisation des ARN méiotiques. Cependant, ceci n'est pas valable pour un autre gène méiotique, *Meiob*.

Nous concluons que l'absence simultanée de *Stra8* et *Meioc* altère l'expression du programme méiotique à peine plus fortement que l'invalidation unique de *Stra8*. Des spermatocytes au stade leptotène sont présents dans les testicules double-mutants ainsi que dans les testicules *Stra8 -/-*. Ceci suggère la présence d'un autre/d'autres facteurs clés dans la transition mitose/méiose. Peu d'effets additifs sont observés chez le double mutant, ce qui confirme les travaux précédents avec le BMS et suggère un effet épistatique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le même programme est régulé par STRA8 et MEIOC.

II.C. *Stra8, Meioc* et *Ythdc2*

Abby et al. ont identifié un partenaire de MEIOC : l'ARN hélicase YTHDC2 (Abby et al., 2016). Après le début de ma thèse, plusieurs études sur le rôle de MEIOC et/ou son partenaire, YTHDC2, ont été publiés (Bailey et al., 2017; Hsu et al., 2017; M. Kojima et al., 2017; Puno et al., 2018; Wojtas et al., 2017). Le laboratoire de *S. Keeney* nous a gentiment offert deux testicules mutants pour *Ythdc2*, que nous avons eu la possibilité d'analyser et comparer aux mutants *Meioc -/-* et *Stra8 -/-.* Dans les testicules invalidés pour *Ythdc2,* la progression méiotique s'arrête plus précocement que dans les mutants *Meioc -/-* (**Figure 13A**). En effet, dans les testicules *Meioc -/-* on observe une accumulation de spermatocytes au stade zygotène-like, tandis que

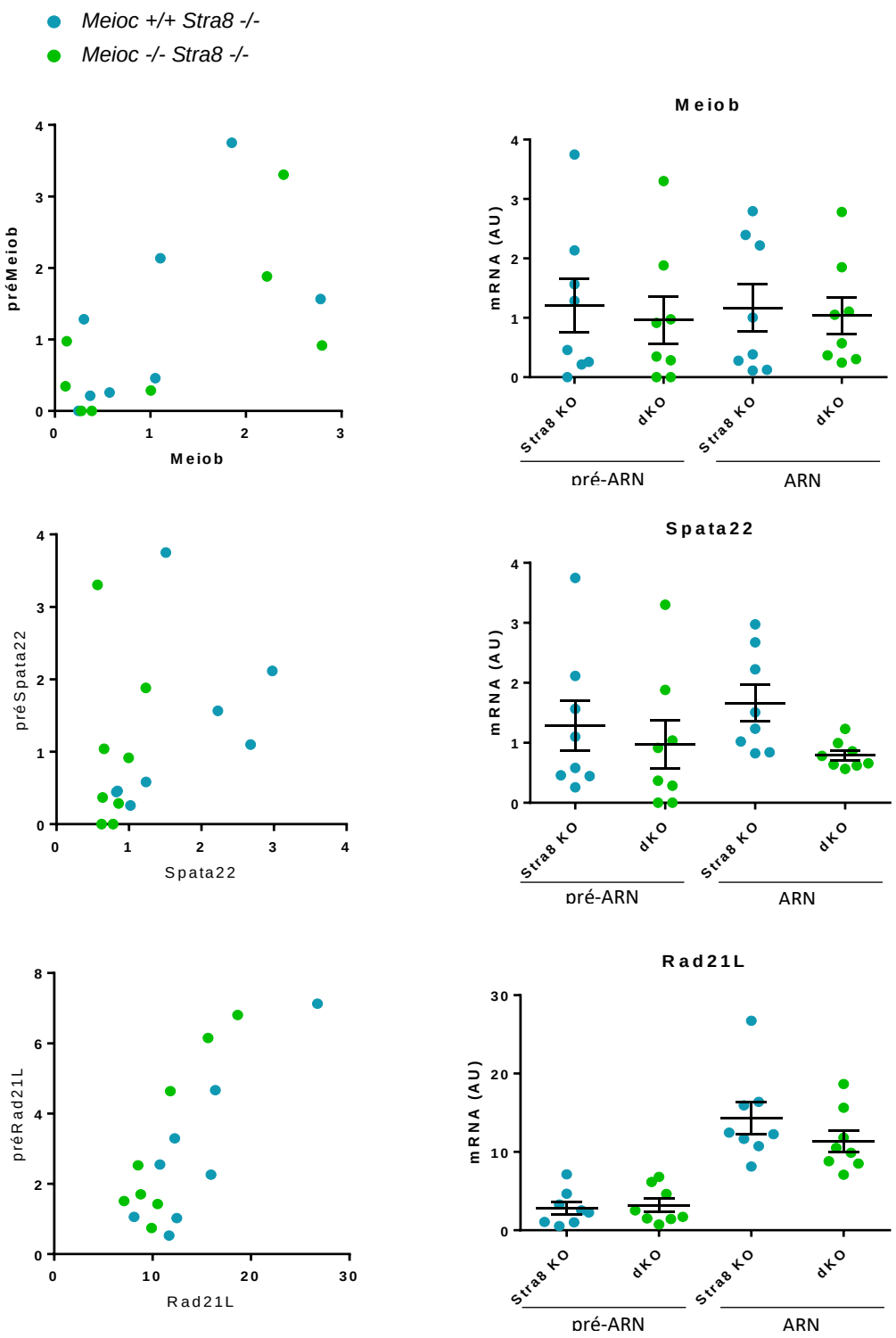


Figure 12: Comparaison de l'expression des ARN méiotiques et des pré-ARN dans des testicules adultes *Meioc +/+ Stra8 -/-* et *Meioc -/- Stra8 -/-.* L'expression des ARN et des pré-ARN correspondants est mesurée par RT-qPCR. Les valeurs sont normalisées sur *Ddx4* (CG spécifique). À gauche, graphiques représentants les valeurs des pré-ARN (ordonnée) en fonction des valeurs des ARN matures (abscisse). À droite, graphiques représentant les valeurs des pré-ARN et des ARN séparément. Stra8 KO = mutants *Meioc +/+ Stra8 -/- ;* dKO = mutants *Meioc -/- Stra8 -/-.* Nous observons, pour *Spata22* et *Rad21L*, une baisse des ARN mais pas une baisse des pré-ARN. Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM. n=7 (*Meioc +/+ Stra8 +/+ ; Meioc -/- Stra8 +/+)* et n=8 (*Meioc +/+ Stra8 -/- ; Meioc -/- Stra8 -/-)*

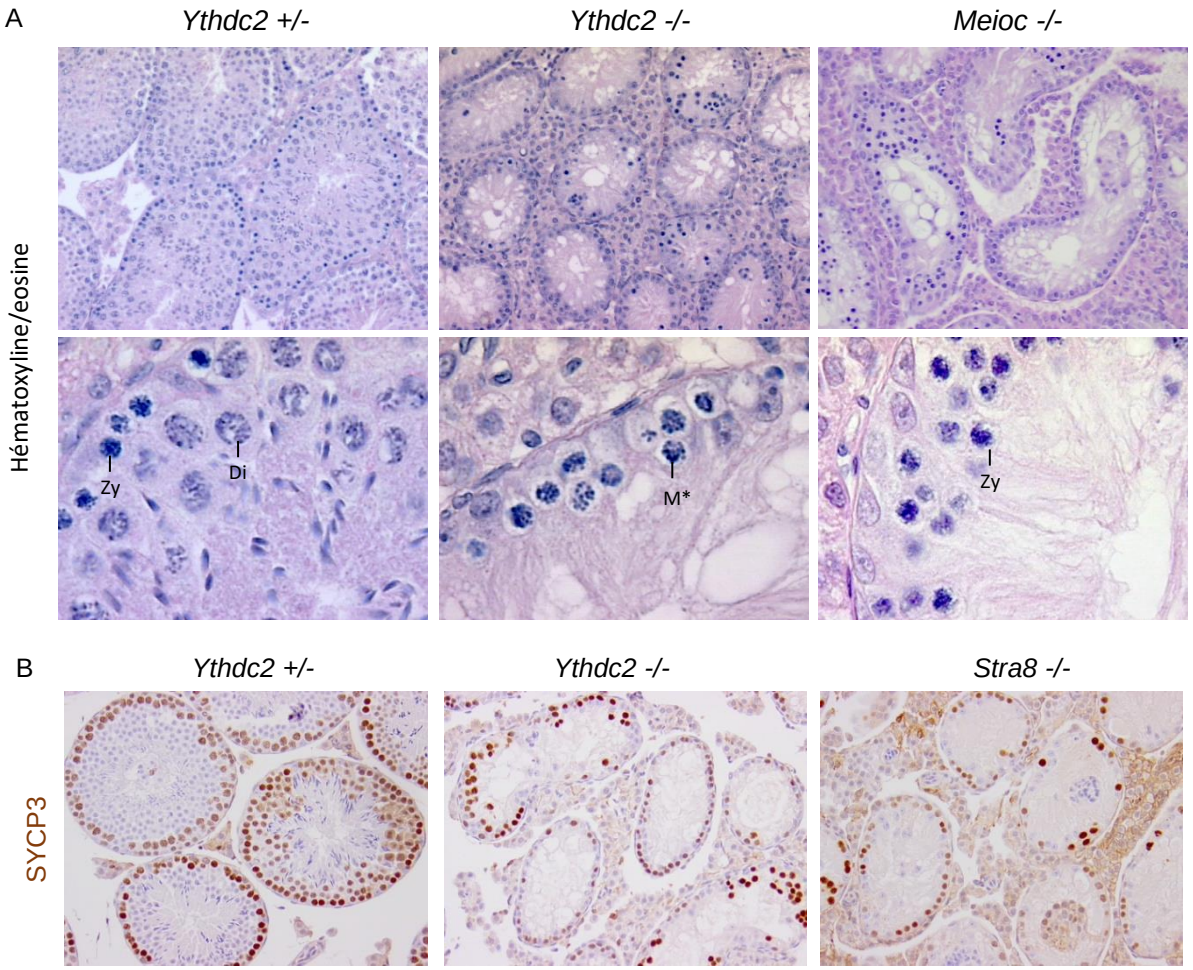


Figure 13: Comparaisons des mutants *Ythdc2 -/-, Meioc -/- et Stra8 -/-.* A) Analyse immunohistochimique par marquage hématoxyline/eosine de testicules adultes *Ythdc2 -/- et Meioc -/-.* Les mutants *Ythdc2* bloquent au stade leptotène avec accumulation de métaphases anormales; les mutants *Meioc -/-* rejoignent le stade zygotène. Zy = Zygotène ; Di = Diplotène ; M* = Métaphase anormale **B)** Marquage immunohistochimique de SYCP3 (marron) sur coupes de testicules adultes mutants pour *Ythdc2* ou *Stra8*.

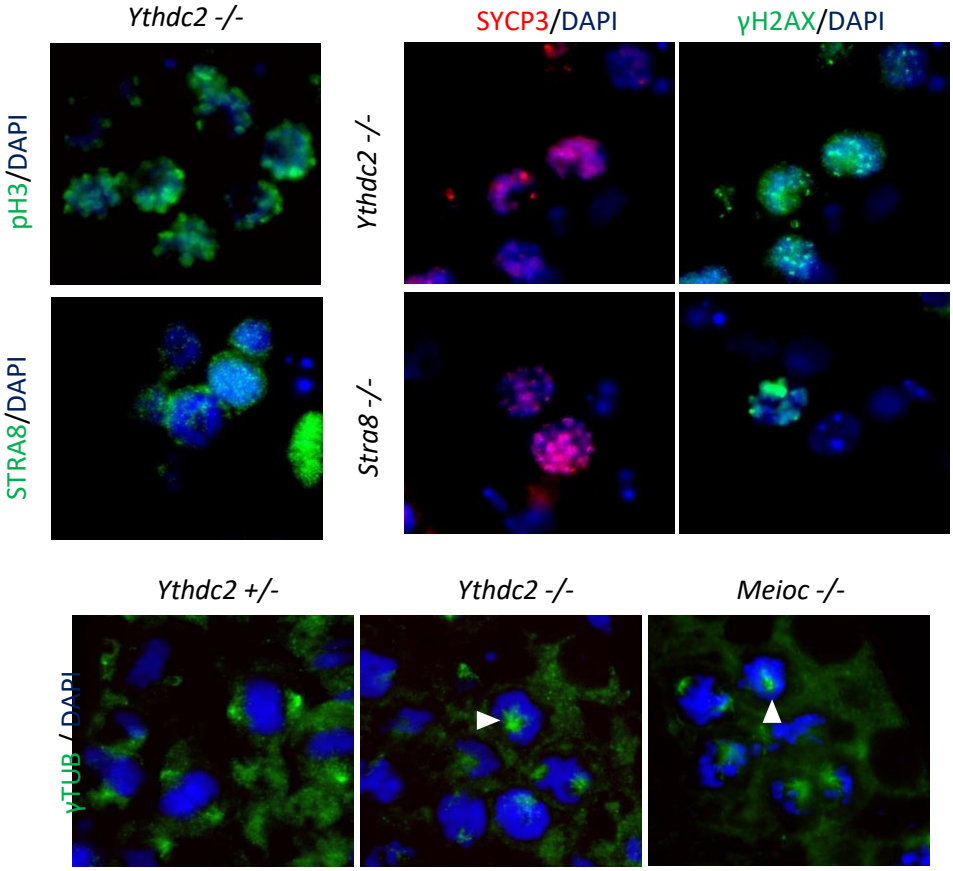


Figure 14: Présence de métaphases anormales chez les trois mutants: *Meioc -/-, Ythdc2 -/-* et *Stra8 -/-.* Analyses par immunofluorescence des métaphases anormales. ADN en bleu (DAPI). Analyse de différents marqueurs: STRA8 et SYCP3 = marqueurs préméiotique et méiotique respectivement ; pH3 = Histone 3 phosphorylé, marqueur des métaphases ; γTUB = γTUBULINE, composant des microtubules. Pointe de flèche blanche = plaque métaphasique monopolaire.

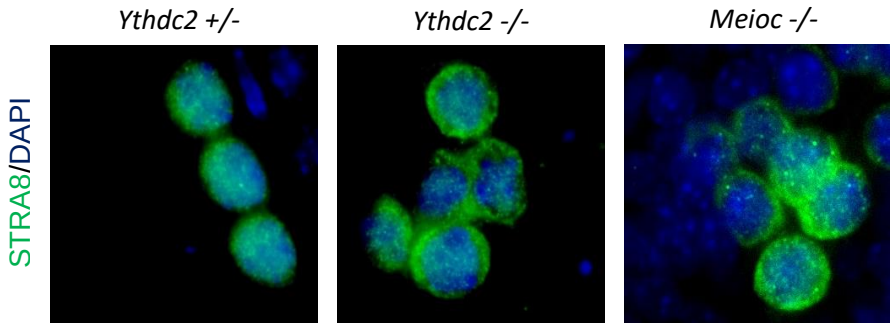


Figure 15: Localisation cytoplasmique de STRA8 chez les mutants *Ythdc2 -/-* et *Meioc -/-.* Analyse par immunofluorescence de la localisation de STRA8 (vert) dans des spermatocytes préméiotiques de testicules adultes mutants pour *Ythdc2 -/-* ou *Meioc -/-.* L'ADN est marqué avec le DAPI (bleu).

dans les testicules *Ythdc2* les spermatocytes en méiose sont rares et ne dépassent pas le stade leptotène ou métaphase anormale. Ainsi, les mutants *Ythdc2* ressemblent plus aux mutants *Stra8* (**Figure 13B**) qu'aux mutants *Meioc* en termes de populations cellulaires. Cette différence de phénotype est inattendue car YTHDC2 est un partenaire majeur de MEIOC (ou vice-versa). Ceci pourrait suggérer un rôle d'YTHDC2 en amont de MEIOC ce qui est plausible car YTHDC2 lie directement les ARN (Abby et al., 2016; Bailey et al., 2017; M. Kojima et al., 2017; Wojtas et al., 2017).

L'analyse immunohistochimique permet en outre de mettre en évidence une caractéristique commune aux trois mutants: la présence de métaphases méiotiques anormales (voir discussion). La présence de ces métaphases a déjà été décrite pour les trois différents mutants. Comme visible dans la **Figure 14**, ces métaphases sont pH3-positives et expriment différents marqueurs méiotiques : γH2AX, SYCP3, STRA8. Elles se distinguent des métaphases méiotiques « normales » par une plaque métaphasique fréquemment monopolaire, plutôt que bipolaire.

De la même façon que dans les mutants *Meioc*, dans les mutants *Ythdc2* on observe la présence de Stra8, en ARN (**Figure 16**) et en protéine **(Figure 15**). Notons cependant que la localisation de STRA8 chez les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* n'est pas la même par rapport aux testicules sauvages: en effet, STRA8 se localise de préférence au niveau cytoplasmique chez ces mutants. Cette localisation cytoplasmique n'est pas aberrante car il a été montré que STRA8 peut faire la navette entre le cytoplasme et le noyau des cellules (Tedesco, La Sala, Barbagallo, De Felici, & Farini, 2009b). Cependant, chez les sauvages, la localisation de STRA8 est quasi-uniquement nucléaire dans les spermatocytes en pré-leptotène. Ceci pose donc des questions sur la fonctionnalité de STRA8 en tant que facteur transcriptionnel chez les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-.* Si STRA8 est effectivement non fonctionnel cela pourrait expliquer la similitude des phénotypes.

L'analyse de l'expression de gènes méiotiques en RT-qPCR confirme que les mutants *Ythdc2 -/-* ressemblent plus aux mutants *Stra8 -/-* qu'aux mutants *Meioc -/-* (**Figure 16**). Cependant, ces résultats obtenus par RT-qPCR, peuvent être biaisés par le fait que les mutants *Ythdc2 -/-* et *Stra8 -/-* se ressemblent davantage en termes de populations cellulaires. Des analyses complémentaires devraient être effectuées dans des testicules mutants postnataux (8-9jpp) pour réduire la disparité des populations cellulaires. À l'âge adulte, ici, nous comparons l'expression des gènes chez les mutants *Ythdc2 -/- , Meioc -/-* et *Stra8 -/-* à l'expression chez les mutants *Meiob -/-* à la place de testicules de souris sauvages : en effet, les testicules mutants pour *Meiob* n'ont pas de défauts d'initiation méiotique mais ressemblent, en termes de populations cellulaires, aux mutants *Meioc -/- Stra8 -/-* et *Ythdc2 -/-* plus que des testicules sauvages (blocage des spermatocytes *Meiob -/-* au stade IV de la spermatogénèse). En **Figure 17,** vous pouvez observer une planche avec des coupes histologiques (marquage SYCP3) des différents mutants que nous avons utilisés au cours de cette étude.

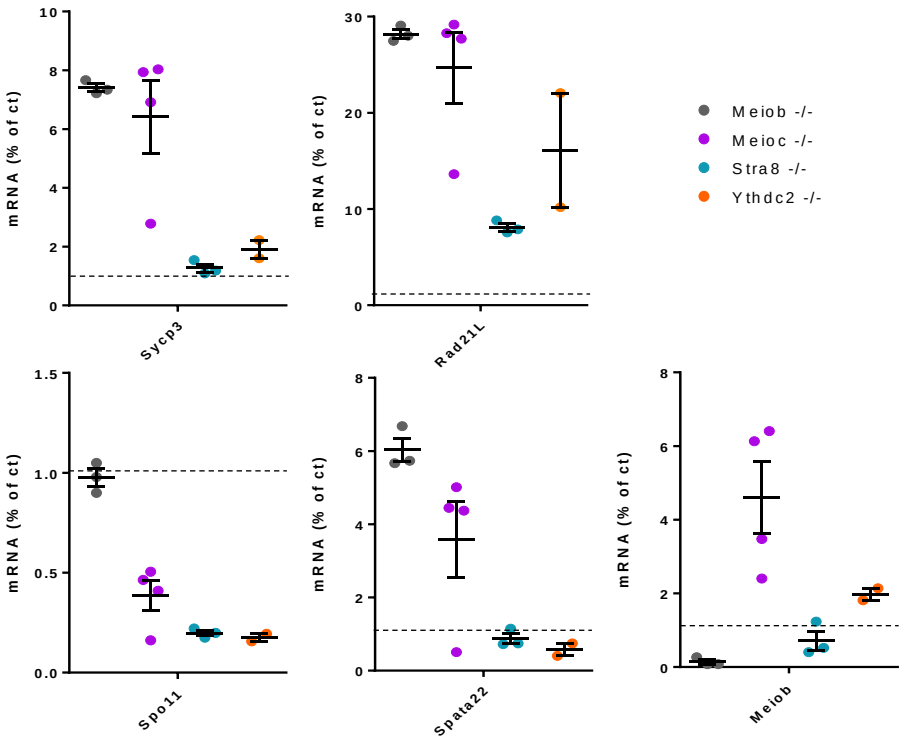


Figure 16: Comparaison de l'expression d'ARN méiotiques dans des testicules adultes mutants pour *Meiob, Meioc, Stra8* ou *Ythdc2.* L'expression de gènes méiotiques est mesurée par RT-qPCR. Les valeurs sont normalisées sur *Ddx4* (CG spécifique). Les valeurs sont normalisées sur les testicules sauvages (moyenne des testicules sauvages rapportée à 1, ligne en pointillés noire). Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM. n=3 *Meiob -/- ;* n=4 *Meioc -/- ;* n=3 *Stra8 -/- ;* n=2 *Ythdc2 -/-.*

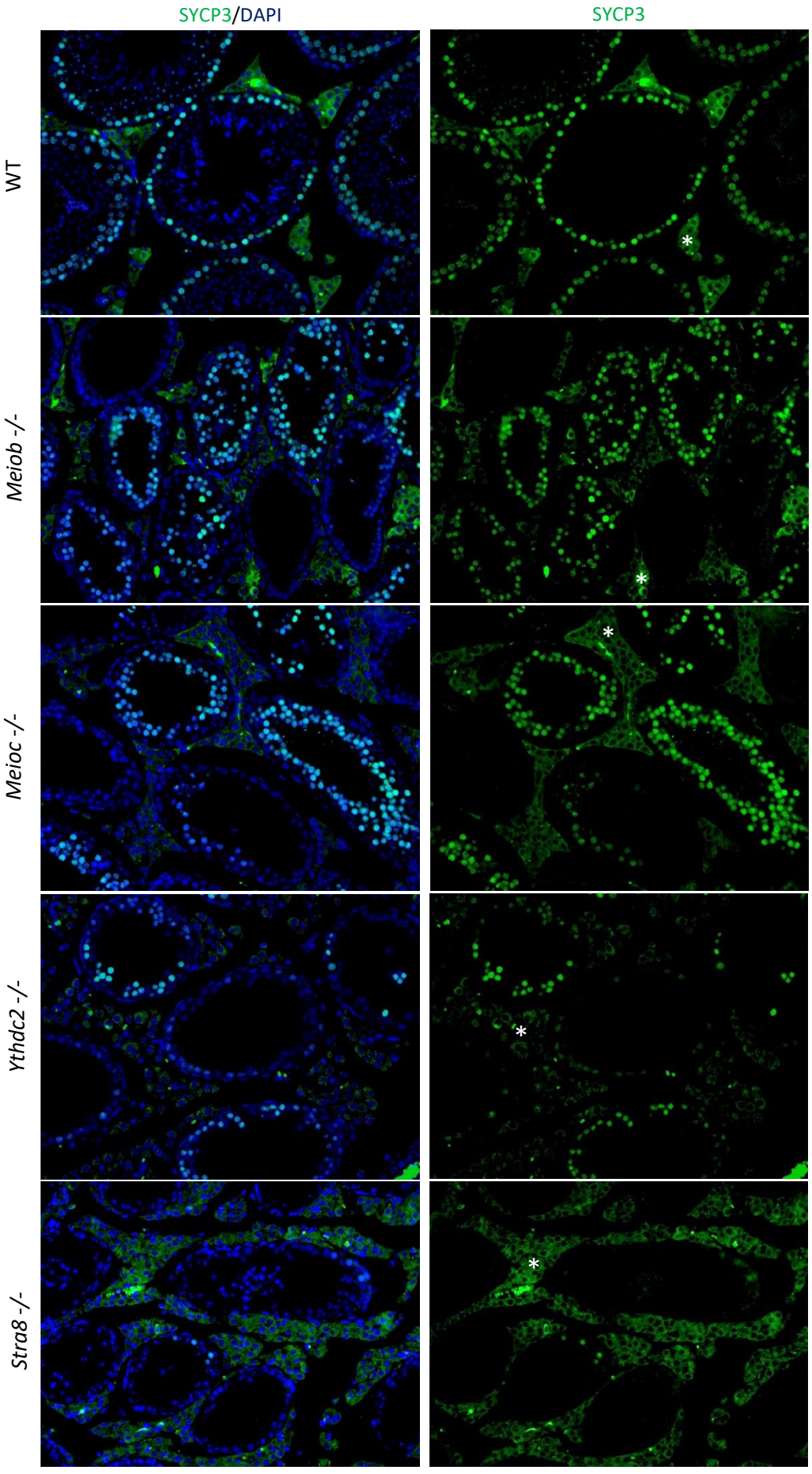


Figure 17: Images histologiques des mutants *Meiob, Meioc, Ythdc2, Stra8.* Images représentatives du marquage SYCP3 (vert) sur des coupes des différents mutants analysés au cours de cette étude (*Meiob -/-, Meioc -/-, Ythdc2 -/-, Stra8 -/-*). Étoile blanche = marquage aspécifique dans l'espace interstitiel.

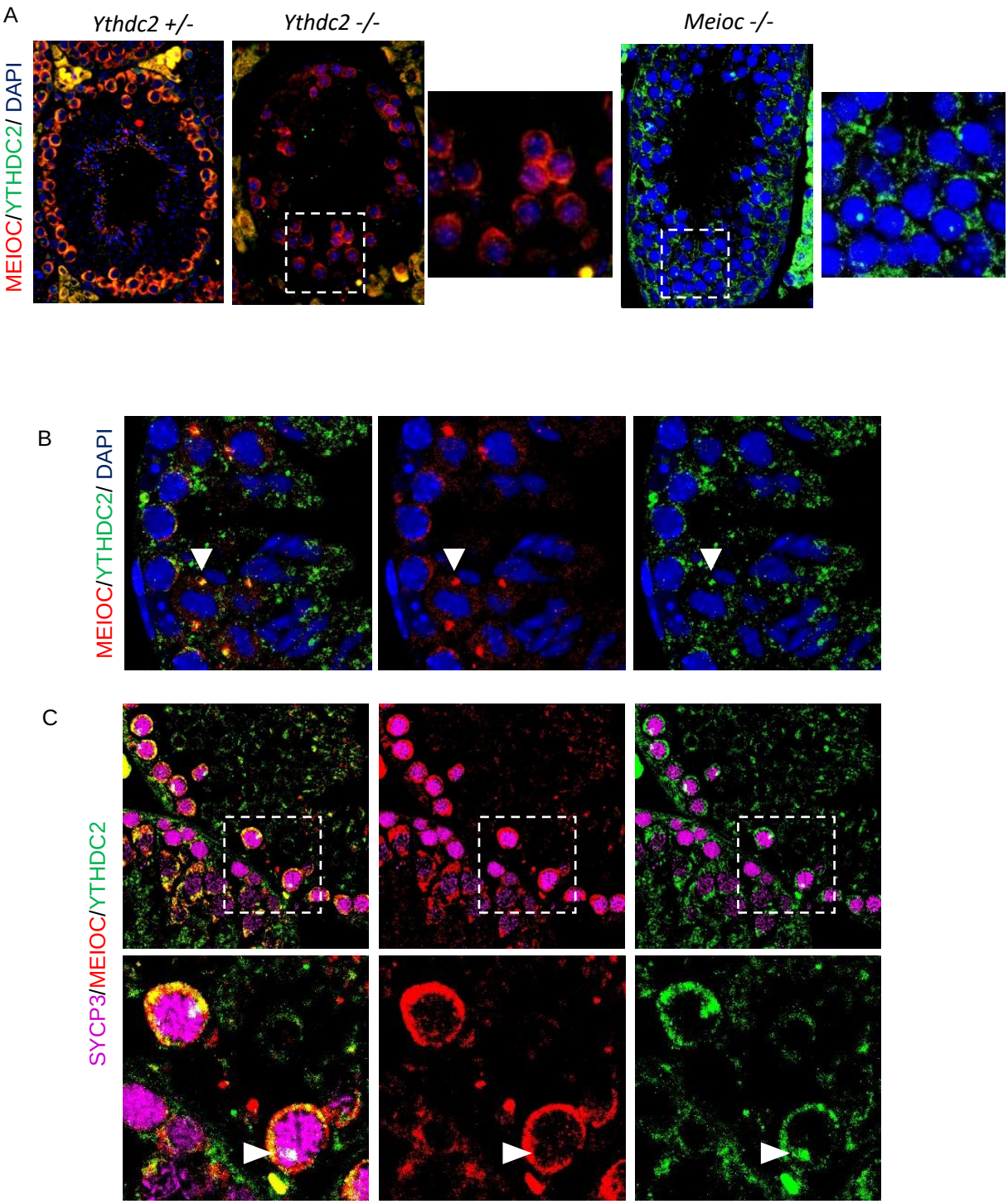


Figure 18: Différentes localisation de MEIOC et YTHDC2 dans les spermatocytes I. A) , B) et C) Analyse en immunofluorescence de MEIOC (rouge) et YTHDC2 (vert) sur coupes de testicules adultes pour *Meioc* et *Ythdc2*. L'ADN est marqué en bleu (DAPI). Les encadrés blancs en petits traits représentent la zone agrandie. **A)** Localisation cytoplasmique de MEIOC et YTHDC2. **B)** Localisation de MEIOC et YTHDC2 au niveau des centrioles en métaphase méiotique (pointe de flèche blanche). **C)** Localisation spécifique de YTHDC2 au niveau du *chromatoid body* (flèche blanche).

II.D. Localisation de MEIOC et YTHDC2

Les différences observées entre le phénotype des souris *Ythdc2 -/-* et *Meioc -/-* en terme I) de quantité de spermatocytes initiant la méiose et II) du stade de blocage de la progression méiotique, nous ont poussé à regarder plus en détail la colocalisation de ces deux protéines. Comme déjà publié, YTHDC2 et MEIOC colocalisent dans le cytoplasme (**Figure 18A**). De manière intéressante, en absence de MEIOC, YTHDC2 est détecté et, vice-versa, en absence de YTHDC2, MEIOC est présent. Ceci suggère que les protéines sont stables même en absence du partenaire.

Outre la localisation cytoplasmique, E. Abby a montré que MEIOC localise au niveau des centrioles lors des métaphases méiotiques (communication personnelle). Dans la **Figure 18B**, je montre pour la première fois que YTHDC2 colocalise avec MEIOC et la γTUBULINE au niveau des centrioles. Cette localisation centriolaire pour les deux partenaires demeure énigmatique.

De manière intéressante, nous remarquons que YTHDC2 et MEIOC se différencient en termes de localisation au niveau du *chromatoid body* (**Figure 18C**). Ce dernier consiste dans une structure cytoplasmique caractéristique des spermatocytes à partir du stade pachytène et des spermatides rondes, où sont stockés les ARN ainsi que des protéines de liaison aux ARN. YTHDC2 se localise au niveau du *chromatoid body* dans les spermatocytes en pachytène, mais pas MEIOC. Ceci suggèrerait que, au moins en partie, les rôles de MEIOC et YTHDC2 puissent être différents.

II.E. Fond NMRI *versus* fond C57BL/6

Le phénotype des testicules *Stra8 -/-* a été décrit initialement en 2008 dans deux études indépendantes (Anderson et al., 2008; Mark et al., 2008). Bizarrement, ces deux analyses montraient un phénotype différent en termes de stades de blocage de la spermatogénèse. Anderson et al. décrivent un blocage de la spermatogénèse au stade préleptotène, avec une absence complète de spermatocytes en prophase I dans des souris *Stra8 -/-* en fond pur C57BL/6 (Anderson et al., 2008). Le blocage a lieu après la réplication de l'ADN: en effet, les spermatocytes *Stra8 -/-* incorporent le BrdU au stade préleptotène. Mark et al. décrivent un phénotype plus souple suite à l'invalidation de *Stra8* dans un fond génétique mixte C57BL/6-129Sv (Mark et al., 2008). Chez ces mutants, certains spermatocytes dépassent le cap du préleptotène et initient la méiose avec un début de mise en place du complexe synaptonémal, formation de cassures double-brin et démarrage de la recombinaison homologue. Cependant, la progression en prophase I bloque entre le stade leptotène et début-pachytène. Cette différence est peut-être due aux différents fonds génétiques utilisés dans l'analyse des deux lignées mutantes *Stra8 -/-* : consanguine pure, C57BL/6 (Anderson et al.) et fond mixte C57BL/6-129/Sv (Mark et al.).

Pour analyser l'influence du fond génétique sur le phénotype des souris *Stra8 -/-* ainsi que *Meioc -/-*, nous avons créé pour les deux lignées mutantes, une lignée en fond C57BL/6 et une lignée en fond mixte NMRI-C57BL/6. La lignée NMRI est une lignée non consanguine. Je précise que la lignée C57BL/6 mutante pour *Meioc* a été produite à partir de la lignée mixte NMRI-C57BL/6, en *backcrossant* 7 fois nos animaux avec des souris C57BL/6 pures.

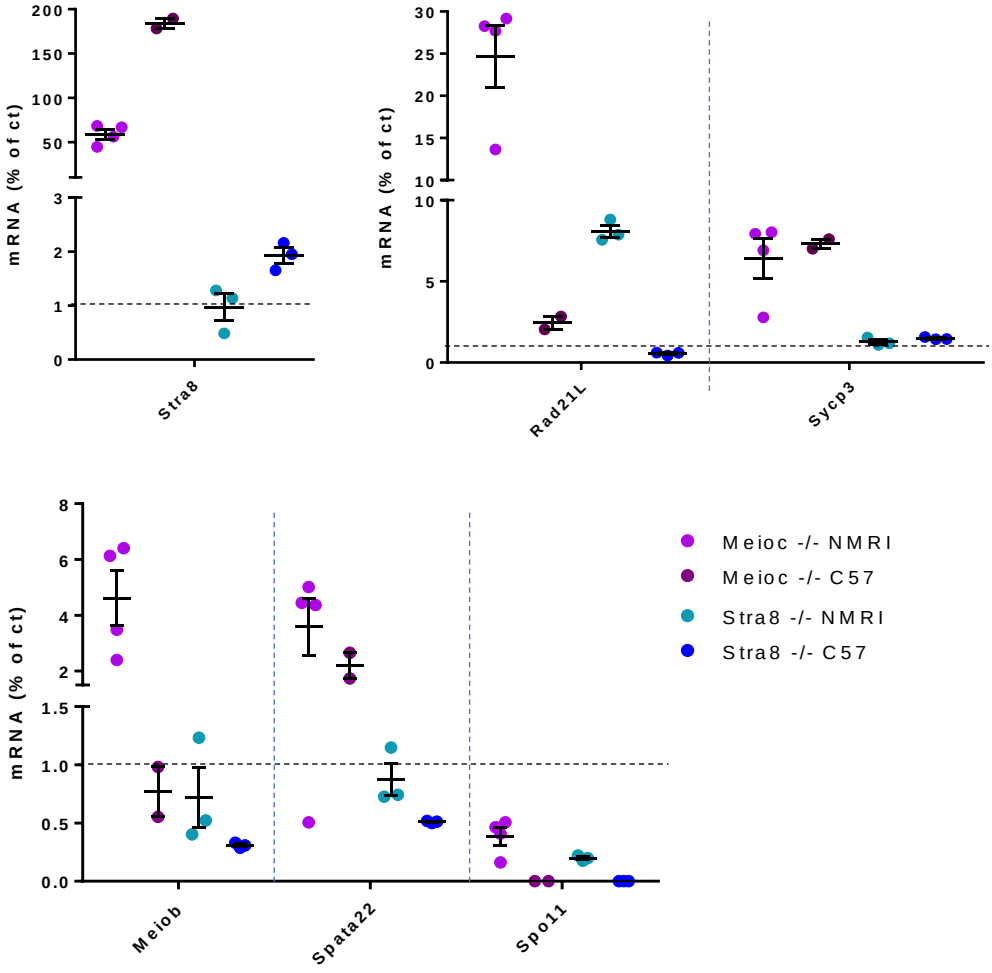


Figure 19: Comparaison de l'expression d'ARN méiotiques chez les mutants *Meioc -/-* et *Stra8 -/-* dans deux différents fonds génétiques: NMRI et C57BL/6 (C57). L'expression de différents gènes méiotiques est mesurée par RT-qPCR. Les valeurs sont normalisés sur *Ddx4* (CG spécifique). Les valeurs sont normalisées sur les contrôles (testicules sauvages rapportés à 1, ligne noire en pointillés). Les barres d'erreurs représentent les moyennes ± SEM.

Nous avons donc comparé le niveau d'expression de gènes méiotiques dans les mutants *Meioc* -/- et *Stra8* -/- dans les deux différents fonds génétiques. Cette analyse montre que le niveau d'expression des gènes méiotiques est plus faible en fond C57BL/6 qu'en fond NMRI, ce qui est concordant avec un phénotype plus marqué en fond C57BL/6. Cependant, même dans un fond génétique C57BL/6 les mutants pour *Meioc* -/- progressent jusqu'au stade zygotène et nous observons des spermatocytes en prophase I (très rares) dans les souris *Stra8* -/- en fond C57BL/6 pur (donnée discordante avec les observations de Anderson et al., résultat pas montré).

III. Le *silencing* transcriptionnel

Le projet sur le *silencing* transcriptionnel a été pour moi, à la fois, très motivant et très frustrant. Celui-ci a débuté par une question qui a émergé suite à la découverte du potentiel rôle post-transcriptionnel de MEIOC : *pourquoi stabiliser les ARN méiotiques en début de prophase I?* De manière intrigante, quelques rares publications (V. Monesi en 1996 et Page et al. en 2011) décrivent une inactivation de la transcription en début de prophase I (MONESI, 1964; Page et al., 2012). L'existence d'un **arrêt transcriptionnel** expliquerait le besoin des cellules méiotiques de stabiliser les ARN préalablement transcrits. *Mais pourquoi arrêter la transcription ?* L'arrêt de la transcription pourrait être un moyen pour les CG d'assurer la reprogrammation transcriptionnelle, avec une extinction efficace des gènes mitotiques pour allumer spécifiquement les gènes méiotiques. Alternativement, ou en parallèle, ceci pourrait être une façon de sauvegarder l'intégrité génique des cellules germinales, en évitant une transcription aberrante au niveau des sites de CDB.

La concomitance entre l'arrêt transcriptionnel global, la survenue et réparation de nombreuses CDB par RH et l'appariement des chromosomes homologues soulève de nombreuses questions : *Quel lien existe-t-il entre la formation ou réparation des CDB et la régulation de la transcription ? Est-ce que l'arrêt de la transcription est complet ou est-ce que certains gènes y échappent ? Comment est régulé ce silencing à l'échelle du génome entier ? Existe-t-il une incompatibilité entre la survenue ou la réparation de nombreuses CDB et un niveau élevé de transcription ?*

Ce projet consiste donc à I) Mieux définir le *silencing* transcriptionnel : son ***timing***, sa **conservation** et son **origine**; II) Mesurer l'**ampleur** du *silencing* : *des gènes demeurent-ils exprimés? Si oui, lesquels?*

Cette partie des résultats démarre avec l'article en cours de préparation. J'ai décidé de montrer les résultats du RNAseq à part, bien que nous prévoyons de les incorporer au manuscrit final : l'analyse n'est en effet pas encore terminée et les résultats ne sont donc pas définitifs. À la fin de cette partie, je montrerai quelques résultats complémentaires.

III.A. Article 2:

Early-prophase genome-wide transcriptional silencing does not depend upon meiotic events.

Early-prophase genome-wide transcriptional silencing does not depend upon meiotic events.

Introduction

Spermatogenesis relies on specific and complex transcriptional programs to orchestrate the production of male gametes (Griswold, 2015). It can be divided into a mitotic phase, a meiotic phase and a post-meiotic phase. The spermatogonial stem cells (SSC) multiply and enter a differentiation pathway. In the mouse, this leads to a strictly regulated differentiation of type A spermatogonia into type A1-A4, Intermediary and B spermatogonia, through several successive cell divisions (de Rooij, 2001). Type B spermatogonia are the precursors of preleptotene cells entering the premeiotic S phase. The spermatocytes will undergo two consecutive meiotic divisions allowing the production of haploid spermatids (Feng, Bowles, & Koopman, 2014). Finally the so-called "spermiogenesis" includes several morphological transformations of spermatids generating the highly differentiated spermatozoa (Hermo, Pelletier, Cyr, & Smith, 2010). Each step of spermatogenesis requires a regulated and dynamic expression of specific-transcripts, which contributes to the high diversity of testicular transcriptome (Chalmel & Rolland, 2015; Margolin, Khil, Kim, Bellani, & Camerini-Otero, 2014; Soumillon et al., 2013). Additionally, several transcriptional arrests and post-transcriptional regulations complicate the testicular transcriptome (Naro et al., 2017). Two transcriptional arrests have been exquisitely characterized. The silencing of sex chromosomes during meiosis, a process termed *Meiotic Sex Chromosome Inactivation* (MSCI) and a global silencing in post-meiotic elongated spermatids undergoing a tight packaging of the genetic material (Turner, 2015).

A critical step of spermatogenesis consists in the conversion of mitotic spermatogonia into meiotic spermatocytes. *Stimulated from Retinoic Acid 8* (*Stra8*) is a transcription factor regulating the mitosis-to-meiosis transition (Kojima, de Rooij, & Page, 2019). Meiosis begins with a long prophase I which enables drastic chromatin remodelling events. Prophase I can be subdivided in different stages: leptotene, zygotene, pachytene and diplotene. During prophase I, programmed DNA double strand breaks (DSB) are generated by the catalytic activity of the topoisomerase-like transesterase SPO11, preferentially localised at specific regions called "hotspots" (Coopera, Garcia, & Neale, 2016; Tischfield et al., 2016). DSBs are next repaired by meiotic homologous recombination (HR). In parallel, homologous chromosomes align, pair and synapse with formation of a proteinaceous structure called the synaptonemal complex (SC). At pachytene stage DSBs are completely repaired and autosomes are fully synapsed. In contrast, X and Y chromosomes remain largely unsynapsed because of their lack of homology. They are compartmentalised in a heterochromatic structure called sex body. Sex body is transcriptionally inactivated due to the MSCI process. MSCI depends on synapsis signalling, DNA damage response and on epigenetic regulations (Hirota et al., 2018; Ojarikre et al., 2017; Royo et al., 2013; Turner, 2015; Turner et al., 2005).

DSBs generation, HR and SC formation are highly regulated and interdependent process. The expression of meiotic specific genes allows a fine-regulation of these events. Indeed, mitotic-meiotic transition is characterised by a large genome reprogramming, to switch from a mitotic program to a meiotic one. This is accompanied by elaborated post-transcriptional mechanisms changing the mRNA stability and the alternative splicing events (Abby et al., 2016; Naro et al., 2017). The existence of so many specificities around transcription during meiotic initiation and prophase I is yet poorly understood and may be connected to the considerable changes occurring in the genome. Interestingly, spermatocytes at first stages of prophase I (Le, Zy, early-Pa) have been reported with a very low or near-extinct transcriptional activity (MONESI, 1964; Page et al., 2012). This genome-wide low level of transcription, together with the existence of specific meiotic transcripts and transcriptional regulations, is puzzling. Currently, very little is known about this global

reduction of transcription, contrary to MSCI which is largely characterised. Few transcriptome analyses of spermatocytes initiating meiotic prophase I have been effectuated, due to the difficulty in isolating these rare testicular cells populations. Moreover, transcriptome analyses poorly reflect transcription as these are in part blurred by post-transcriptional mechanisms.

Here, we characterise the early meiotic reduction of global-genome transcriptional activity. We demonstrate that this reduction of transcription precedes and is independent of the key events of prophase I, DSBs and chromosome synapsis. Interestingly, we find a relationship between the meiotic gatekeeper *Stra8* and the precocious reduction of global transcription prior to meiotic entry.

Results

RNA polymerase II localization is dynamic during spermatogenesis

To better characterize the variations of transcriptional levels during spermatogenesis, we used quantification of immunofluorescence staining of the active form of RNA Polymerase II, phosphorylated on serine 2 of the CTD sequence (pPOL2), as a proxy for evaluating transcription. First, we focused on male meiotic prophase I and quantified pPOL2 intensity on chromatin using spermatocyte chromosome spreads. pPOL2 is hardly detected at the beginning of prophase I, at leptotene, and zygotene stages and weakly observed in early pachytene stages (Fig 1.A and 1.B). At the beginning of pachynema pPOL2 was retrieved in few chromosomal domains and mostly on the axes. Intensity of pPOL2 increases massively during mid pachytene (mPa) stage to reach the maximal intensity level at late pachytene and diplotene stages. As expected, pPOL2 remains almost undetectable on X and Y chromosomes during pachytene and diplotene stages (Fig 1.A and Supp1). This confirms and extends previous observations (Page et al., 2012; Turner, 2015). We decided to name this process of genome-wide pPOL2 reduction, which takes place at the beginning of prophase I, “Early Meiotic Low Transcription” (EMLT), to distinguish it from the MSCI process which concerns sex chromosomes that remains silent in pachynema and diplonema.

We next exploited the well-characterized seminiferous epithelium cycle to finely determine when EMLT initiates and ends during spermatogenesis. We thus quantified pPOL2 intensity on testis sections. Interestingly, pPOL2 staining is dynamic all long spermatogenesis. Type A spermatogonia are well labelled for pPOL2 (Fig 1.C and 1.E and Supp2). In contrast, intermediate and B spermatogonia, are less stained (Fig 1.C and Supp2). Preleptotene and leptotene spermatocytes display the lowest staining for pPOL2 (Fig 1.C and Supp2). The staining increases slightly and progressively during zygonema to reach an intensity level similar to A spermatogonia at early pachytene stage (Fig 1.C and Supp2). Then pPOL2 staining reaches a maximal intensity, higher that A spermatogonia and somatic (Sertoli) cells, at the end of prophase I and in the first round spermatid (Fig 1.C and Supp2). As expected, elongated spermatids are completely silenced and devoid of pPOL2 staining (Fig 1.C and Supp2) due to their high level of DNA compaction. Total RNA Polymerase II (POL2), including non-phosphorylated and phosphorylated forms, has an expression profile similar to pPOL2 all long spermatogenesis (Fig 1.C and Supp2 and Supp1). Using chromosome spreads we evidenced that POL2 is also hardly detected on the chromatin during EMLT (Supp1A). This indicates that the variations of pPOL2 intensity are due to a reduction in RNA Polymerase II availability and/or loading on chromatin. Interestingly, early pachytene spermatocytes have already reached their maximal intensity for POL2, whereas pPOL2 maximal staining is later, during mid pachynema (Fig 1.C and Supp1, Supp2 and Supp3). This indicates a two-step process with first loading POL2 on chromatin and second activation of POL2 (pPOL2) to produce the hyper-transcriptional state observed in late prophase I.

To determine accurately when during spermatogonial differentiation EMLT is set up, we monitored two spermatogonia markers: STRA8 and ZBTB16. Both undifferentiated spermatogonia, that do not express STRA8, and differentiating A spermatogonia, that express STRA8 at low level, are stained for POL2 (Fig 1.D).

ZBTB16 is highly expressed in A spermatogonia, differentiated and undifferentiated, that are stained for POL2. In intermediary and B spermatogonia ZBTB16 is weakly detected ((Teletin, Vernet, Ghyselinck, & Mark, 2017) and personal observations), and these are faintly stained for POL2 (Fig 1.E). Thus, EMLT is initiated during spermatogonia mitotic divisions, more precisely at the transition from A spermatogonia to intermediary spermatogonia.

As this meiotic genome-wide arrest of transcription has yet only been described in male mice, we sought to determine whether EMLT was conserved among mammalian species. Interestingly, pPOL2 is almost undetectable at the beginning of prophase I in three different mammals: goat, rabbit and dog (Supp3C).

Altogether this evidences significant variations of pPOL2/POL2 in germ cell chromatin during spermatogenesis. This reflects a high dynamism of germ cells transcriptional state. EMLT is most pronounced at the mitosis/meiosis transition and at the beginning of prophase I and followed by a hyperactive transcriptional state in various mammals.

EMLT process is less marked in female

Meiosis is shared by male and female gametogenesis. However transcriptional levels during prophase I have hardly been described in females. Thus, we analysed pPOL2 intensity in oocytes during prophase I (Supp4A-4B). In female, meiosis is initiated during foetal life, to arrest at diplotene stage before birth. We collected embryos at different foetal ages 14.5 and 18.5 days post-conception (dpc) and at birth and performed chromosome spreads. In leptotene and zygotene stage oocytes pPOL2 is least abundant and lower than in somatic cells. pPOL2 staining increases during late prophase I stages. However, there is a large heterogeneity in pPOL2 intensity between female meiocytes, both at beginning and at the end of prophase I. Thus, EMLT appears conserved among sexes albeit many oocytes appear to escape transcriptional repression.

EMLT mechanism differs from MSCI

At pachytene stage, sex chromosomes synapse only in the short pseudoautosomal region (PAR) and form a chromatin structure called sex body. Sex body is characterised by the silencing of the X and Y chromosomes, the MSCI process. γH2AX signalling, mediated by ATR, persists in the sex body during MSCI and the silencing of transcription is mediated by the histone mark H3K9me3, catalysed by the methyltransferase, SETDB1. MSCI has been proposed as the continuity of EMLT, thus we hypothesize that the actors regulating MSCI might also orchestrate EMLT. Therefore, we analysed pPOL2 intensity in double knock out (dKO) mutants for *Atm* and *Atr* (*Atr fl/- Atm -/-*) and in *Setdb1* conditional mutants (*Setdb1cKO*) (Hirota et al., 2018; Widger et al., 2018). In both mutants, sex body formation is disrupted and MSCI is defective. Interestingly, during the first stages of prophase I, EMLT is not perturbed in these mutants, with leptotene and early pachytene-like spermatocytes exhibiting a very low pPOL2 staining (Fig 2). We conclude that EMLT regulation differs from that of MSCI.

EMLT is independent of chromatin structure and homologous chromosome synapsis

At the beginning of prophase I, spermatocytes are characterised by specific rearrangements of the chromatin structure. Chromosomes form an axe/loop-structure. Sister chromatids are held together by cohesins allowing the formation of axial elements (AE). The establishment of AE begins at early-leptotene stage. We thus investigate the relationship between EMLT and chromosome structure using *Rad21L -/-* and *Stag3 -/-* mice. RAD21L and STAG3 are two important meiotic-specific cohesins. Mutation of one of these cohesins causes an arrest of prophase I progression at or prior to early pachynema. In both *Rad21L -/-* and *Stag3 -/-,*

leptotene-like and zygotene-like spermatocytes display a low level of pPOL2 (Fig 3.A and 3.C). In *Rad21L* mutants, some spermatocytes resembling early pachytene stages present a more intense staining for pPOL2 (Fig 3.B and 3.C), albeit Rad21L mutation renders the staging of these cells uncertain.

Proper formation of AEs is mandatory to allow the synapsis of homologous chromosomes through completion of the synaptonemal complex (SC). The HORMA domains protein HORMAD1 localises to unsynasped chromosome axes and is removed soon after synapsis. The invalidation of *Hormad1* (*Hormad1 -/-*) causes pairing defects and pachytene arrest. Interestingly, leptotene and zygotene-like *Hormad1 -/-* spermatocytes are faintly stained for pPOL2, with a quantified intensity similar to WT (Fig 3.A and 3.C). Zygotene-like and early pachytene-like mutant spermatocytes appear more robustly stained for pPOL2 that WT cells (Fig 3.B and 3.C). However, the precise identification of these stages is uncertain in *Hormad1* mutants in which asynapsis signalling is defective. Of note the reappearance of pPOL2 in *Hormad1 -/-* spermatocytes initiates as well on synapsed and unsynapsed axes (Supp5). This indicates that local synapsis is not mandatory to reinitiate transcription.

These results indicate that establishment of the meiotic-specific chromatin structure is not at the origin of EMLT. In addition, completion of chromosome synapsis is not indispensable for ending EMLT and transcriptional reactivation.

EMLT is independent of DSBs

As DSBs can be associated to transcriptional modifications in somatic cells, we speculate that in meiotic cells the formation of hundreds of DSBs might affect transcriptional activity. At the beginning of prophase I, DSBs are generated by the topoisomerase-like transesterase SPO11 at specific sites defined by the methyltransferase PRDM9 (PR/SET domain 9). DSBs are rapidly signalled by phosphorylation of H2AX (γH2AX) by the kinase ATM at leptotene stage. Interestingly, cells stained for γH2AX harbour low pPOL2; this was obvious in spermatocyte I and in spermatogonia, albeit γH2AX is less pronounced in these later cells (Supp6). To investigate if DSBs formation induces or maintains EMLT, we quantified pPOL2 in *Prdm9* and *Spo11* null spermatocytes (Fig 4.A; 4.B; 4.C and 4.D). In *Prdm9 -/-*, DSBs are catalysed but do not localised correctly. In *Spo11 -/-*, programmed DSBs are not generated. In both cases, mutant spermatocytes arrest at pachytene stage. Quantification of pPOL2 in section of *Prdm9 -/-* testes reveals that EMLT is poorly affected as hardly any staining is detected in leptotene and zygotene spermatocytes as in WT cells (Fig 4B and 4C). This result is in accordance with EMLT being present in dog that lacks *Prdm9* (Supp4). EMLT was also retrieved similarly in chromosome spreads from *Spo11 -/-* spermatocytes. Of note, in leptotene-like spermatocytes from *Spo11 -/-* mice, pPOL2 intensity is slightly reduced compared to WT (Supp7). This might indicate that in absence of DSB, transcription is even more repressed. Altogether we conclude that EMLT is not induced by programmed DSB.

Though *Prdm9 -/-* and *Spo11 -/-* are defectives for DSBs localisation and formation respectively, in both mutants, γH2AX is still present, albeit at low level in *Spo11 -/-* spermatocytes. We thus decided to analyse the transcriptional activity in *Atm* null mutants. We used *Atm -/-;Spo11 +/-* mice as these progress up to the diplotene stage and thus allow the study of transcriptional arrest (EMLT) and reactivation. In these mutants, γH2AX signalling of DSBs occurring at leptotene stage is absent. At leptotene and zygotene stages pPOL2 intensity is equivalent in WT and *Atm -/-; Spo11 +/-* spermatocytes. Similarly, reactivation of transcription occurs during Pa stage in these mutants. Therefore, we conclude that signalling of DSBs does not influence EMLT.

In meiocytes DSBs are rapidly repaired by homologous recombination (HR) and when global transcription is hyperactivated, no more DSBs are detected on autosomes. Meiosis specific with OB domains (MEIOB) protein is necessary to complete meiotic recombination. We thus analysed *Meiob* null mutants, characterised by the

persistence of DSBs, to assess EMLT dependency to HR. *Meiob -/-* spermatocytes shows an induction of EMLT with hardly any pPOL2 similarly to WT leptonema and zygonema. In absence of *Meiob* prophase I arrests at early pachytene-like stage. At this stage few mutant spermatocytes have a mild elevation of pPOL2 signal meaning that in the absence of DSBs repair, transcription can be reactivated. Interestingly, pPOL2 reappears as small patches in *Meiob -/-* spermatocytes and these localised both in synapsed and asynapsed chromosomal domains (Supp4). This confirms the observation from *Hormad1* mutant revealing that synapsis is not required to terminate EMLT and to restart transcription.

Altogether these results indicate that EMLT, during first stages of prophase I, and its arrest at mid-pachytene are independent of the induction, signalling and repair of DSBs.

Stra8 **regulates EMLT induction**

Stra8 is the key factor involved in mitotic to meiotic transition. It is first expressed in A spermatogonia after their differentiation and it is strongly expressed during pre-leptotene stage. STRA8 is a transcriptional factor implicated in the regulation of numerous genes. Analysis of *Stra8* null mutant mice reveals the absence of the primary induction of EMLT. In fact, quantification of pPOL2 intensity in testes sections of *Stra8 -/-* mice shows a high level of pPOL2 in intermediate and B spermatogonia and in pre-leptotene spermatocytes when compared to WT corresponding stages (Fig 5 and Supp8 and Supp9). In contrast, invalidation of another key actor of meiotic initiation, *Meioc*, des not modify EMLT (Fig 5). Thus, establishment of meiotic program through STRA8 is important for the correct temporal regulation of EMLT.

Discussion

During the reproductive cycle, several transcriptional silencing events occur in germ cells and in the zygote (Schulz & Harrison, 2019; Yamaji et al., 2007). In this study we characterize in details EMLT, a genome-wide silencing during early meiotic prophase I, that surprisingly triggered little attention up to now. EMLT is dependent of the meiotic gatekeeper STRA8 but does not rely on other key events of meiotic prophase I for its establishment.

Examples of genome-wide transcriptional silencing are rare and strikingly associated with gametogenesis. These have been well-described post fertilization during the early embryonic development and in primordial germ cells. The tight packaging of chromatin in the spermatozoa also induces a transcriptional silencing, though the cause is obvious here (Sassone-Corsi, 2002). In this study we finely describe a fourth major silencing at the time of meiotic entry. The reason why germ cells are that frequently stroke by transcriptional arrests is unclear. One may consider that among all cells, germ cells have to switch between highly different states and that such may justify an extreme transcriptional dynamic. Indeed germ cells have to be specified to many fates, first PGC are committed to the germ lineage, then they should shift from mitotic to meiotic program, and later post-meiotic male germ cells should undergo a massive cellular reorganisation, finally after mixing the gamete genomes, the zygote has to reacquire totipotency. Interestingly these changes are all accompanied by major chromatin remodelling events: methylation erasure (Sanz, Kota, & Feil, 2010), meiotic recombination (Baudat, Imai, & De Massy, 2013), histone to protamine transition (Klaus et al., 2016), diploidization. A simple view may accept then that a quiet chromatin is a likely proper ground for such events and that transcription could possibly interfere then.

In this line, EMLT occurring around the mitotic-meiotic switch is intriguing. Here we report, through the analysis of several meiotic mutants, that this transcriptional arrest occurs similarly when the specific meiotic chromosomal architecture or DSB program is impaired. Cohesins shape the chromosomal architecture and have been proposed as key regulators of transcription (Braccioli & de Wit, 2019; Yuen & Gerton, 2018). The

involvement of the specific cohesins during meiosis would be a tentative hypothesis to explain a change in transcriptional activity. However neither *Stag3* nor *Rad21L* invalidation impacted EMLT, despite the structure of meiotic chromosomes being deeply altered in such mutants. On the other hand transcription has been proven to move cohesins. One may thus speculate that a reverse relationship exists between EMLT and cohesins. During early meiosis the lack of transcription may provide some stability to cohesins to promote the formation of axe-loop structure and thus axial elements. Another main event occurring during early meiosis is the formation and repair of hundreds of programmed DSB. In somatic cells, DNA damage repair has been reported to interfere with transcription in many ways likely due to both phenomena requiring an accessible chromatin (Khobta & Epe, 2012). Then again a rather straight hypothesis would have been that DSB patterning, formation, signalling or repair might trigger a transcriptional arrest. The analysis of *Prdm9*, *Spo11* and *Meiob* mutants invalidates such hypothesis. Once again a reverse relationship may then be considered, that active transcription might interfere with the proper generation or repair of programmed DSB. In this line, it is worth quoting that DSB sites are marked by H3K4me3, this histone modification is also the one retrieved in the promoters of transcriptionally active genes. A wild guess here would be that sharing such a mark is risky and may confuse the recruitment of DSB forming machinery. Then a near extinct transcription would merely favour the proper localisation of DSB in hotspots outside gene promoters.

To test such hypotheses, it would be necessary to manipulate EMLT and this implies understanding its mechanisms or trigger. Here we report that EMLT is substantially delayed in absence of Stra8. STRA8 controls the expression of the near complete meiotic gene network. More precisely it has been recently proven to amplify a pre-existing meiotic program (Kojima et al., 2019). This would fit with the concept that STRA8 might regulate a meiotic factor that causes EMLT. In the absence of Stra8 such a factor would be expressed at low levels delaying thus EMLT. Unfortunately such a factor remains to be identified within the thousands of genes that compose the STRA8-dependent meiotic program. The mechanism causing EMLT also remains evasive. We here report that such a mechanism differs from MSCI that is regulated by DSB signalling, asynapsis and the SETDB1 histone methylase. However the absence of recruitment of POL2 and pPOL2 on sex chromosomes at pachynema and through the genome earlier is a point shared by MSCI and EMLT. This reinforces the idea that MSCI might be a gonosome-specific prolongation of a wider phenomenom, EMLT. In this line, it could be conceived that the histone mark repressing transcription during MSCI would also be shared with EMLT. H3K9me3 is the mark deposited by SETDB1 involved in instructing MSCI (Hirota et al., 2018). Interestingly H3K9me3 is also retrieved on silent chromosomes during early prophase I. It figures thus a likely candidate to induce EMLT though it would require another methylase to deposit this mark.

In conclusion, our study provides an in depth description of the genome wide silencing event reported to occur during leptotene and zygotene stages. We quantify this event and prove it initiates prior meiotic entry. We also bring evidence that it is regulated by the meiotic gatekeeper, STRA8. Future research will have to identify the specific mechanisms responsible for EMLT and through their manipulation it is expected that the reasons for such a major genome silencing will be unveiled.

Material and methods

Mice and animals

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the French Ministry of Agriculture (France). Mice were housed in controlled photoperiod conditions (lights on from 08:00 to 20:00) and were supplied with commercial food and tap water ad libitum. Embryos were collected from dated matings. Males were caged with females overnight, and the presence of vaginal plug was examined the following morning. The following midday was defined as 0.5 dpc. Mice were sacrificed by cervical dislocation and fetuses were removed from uterine horns before gonad isolation under a binocular microscope.
All transgenic mice used have been previously described.

Gonads from dogs, cats and goats from obtained following castrations performed in veterinary clinics.

Preparation of spermatocytes chromosome spreads

Testes used for spermatocytes spread preparation were collected from adult mice (2 to 6 months). For WT, Spo11 -/-, Meiob -/-, Setdb1 -/- and *Atr fl/- Atm-/-* mice, spermatocyte spreads were prepared as follows. Spermatocytes were manually liberated from tubules (flat razor blades) and resuspended in 0,1M sucrose. Spermatocytes/sucrose suspension was distributed on slides in humid chambers and fixed with 1%PFA (in H2O, pH 9.2) 0,001%Triton for 1h30. After fixation, slides were rinsed with H2O 0.4% Photo-Flo 200 (Kodak).

Ovaries used for the preparation of chromosome spreads were collected at 14.5 days post-conception (dpc), 18.5 dpc embryos and 0 dpp pups. Ovaries were dilacerated in 0,1M sucrose on slides using needles, and oocytes were fixed with 1%PFA (in H2O, pH 9.2) 0,001% Triton for 1h30 in humid chambers. After fixation, slides were rinsed with H2O 0.4% Photo-Flo 200 (Kodak).

Immunofluorescenece on preparations of meiocytes chromosome spreads

After washing spermatocytes and oocytes chromosome spreads with H2O 0.4% Photo-Flo 200, slides were air-dried before blocking. Slides were incubated 1h at room temperature with blocking solution (0,2%BSA, 0,2% Gelatin, 0,05% Tween in PBS1X) and overnight with primary antibodies in blocking solution at room temperature (see Table S1 for antibodies). Secondary antibodies were incubated 1h30 at 37°C. Slides were stained with DAPI and mounted with Prolongold medium. Imaging was performed using a Leica DM5500 B epifluorescence microscope (Leica Microsystems) equipped with a CoolSNAP HQ2camera (Photometrics) and Leica MMAF software (Metamorph). Images were processed with the Image J software.

Immunohistofluorescenece

Gonads were fixed in 4% PFA. The fixed gonads were dehydrated, embedded in paraffin and cut into 5-µm-thick sections. Sections were mounted on slides, dewaxed, rehydrated and boiled for 20 min in citrate buffer before performing immunostaining. Immunofluorescence staining was performed as follows. Sections were blocked 1h in Gelatin blocking solution (0,2%BSA, 0,2% Gelatin, 0,05% Tween in PBS1X) and incubated 1h30 at 37°C with primary antibody in blocking solution (see Table S1 for antibodies). After 3 washes in PBS 0,05% Tween, slides were incubated with secondary antibodies 1h at 37°C. Slides were incubated with DAPI and mounted in Prolongold. Imaging was performed using a confocal microscope (Spinning disc). Images were processed with the Image J software.

Quantification of intensity

Quantification of pPOL2 on chromosome spreads was performed with ImageJ software. DAPI staining was used to delimit nucleus of cells and the mean intensity of pPOL2 was quantified. Background intensity was substracted to nuclear intensity.

Quantification of POL2 and pPOL2 on testes sections was performed with ImageJ software. DAPI staining was used to trace randomly a line crossing the nucleus of cells. For each section, intensity level was normalised on background intensity. For POL2 and pPOL2 comparisons, quantification was performed on same cells.

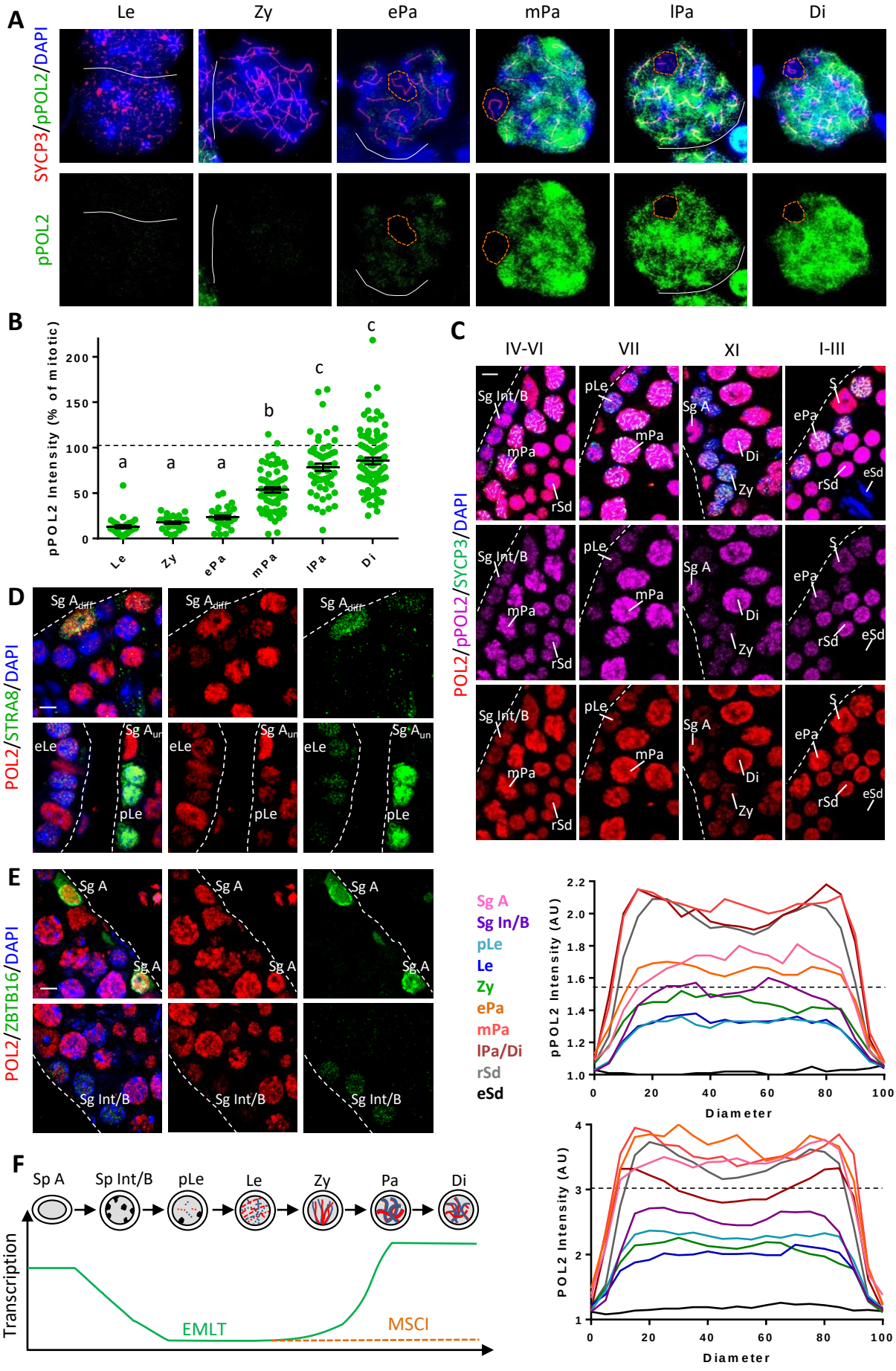

A
Le
Zy
ePa
mPa
lPa
Di
SYCP3/pPOL2/DAPI
pPOL2
B
pPOL2 Intensity (% of mitotic)
200
150
100
50
0
a
a
a
b
c
c
Le
Zy
ePa
mPa
lPa
Di
C
IV-VI
VII
XI
I-III
POL2/pPOL2/SYCP3/DAPI
Sg Int/B
mPa
rSd
pLe
Sg A
Di
Zy
S
ePa
eSd
D
POL2/STRA8/DAPI
Sg A diff
eLe
Sg A un
pLe
E
POL2/ZBTB16/DAPI
Sg A
Sg Int/B
Sg A
Sg In/B
pLe
Le
Zy
ePa
mPa
lPa/Di
rSd
eSd
pPOL2 Intensity (AU)
Diameter
F
Sp A
Sp Int/B
pLe
Le
Zy
Pa
Di
Transcription
EMLT
MSCI

Fig 1. Dynamic of transcription during spermatogenesis.

A) Characterisation of RNA polymerase 2 phosphorylated on Serine 2 (pPOL2) expression profile during prophase I by co-immunolabelling of pPOL2 (green) and SYCP3 (red) on spermatocytes chromosome spreads. DNA is stained with DAPI (blue). pPOL2 staining is very low at leptotene (Le), zygotene (Zy) and early-pachytene stages (ePa) and is obvious at mid-pachytene (mPa), late-pachytene (lPa) and diplotene (Di) stages. Sex body (orange dashed circle) is not stained for pPOL2.

B) Quantification of pPOL2 staining. pPOL2 intensity is normalised to mitotic cells (100%, black dashed line). Each green dot represents one spermatocyte. Spermatocytes were harvested from seven mice; black bars represent means ± sem. For each column, different letters indicate significantly different values (Ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons).

C) Immunofluorescence analysis of pPOL2 (magenta) and total RNA polymerase 2 (POL2, red) in testis sections. Roman numbers indicate the stage of seminiferous epithelium cycle. Prophase I cells are identified thanks to SYCP3 (green) and DNA is stained with DAPI (blue). White curved dotted lines delimit seminiferous tubules. Below, line plot represents the quantification of pPOL2 (upper) or POL2 (lower) intensity at each stage of spermatogenesis (AU=Arbitrary Units, normalization to background). For quantification, a line was traced randomly through nucleus and for each point along the line, intensity was quantified using ImageJ software (Plot profile). Each line represents the average of several cells at a specific spermatogenic stage. Sg A= Type A spermatogonia, n=19; Sg Int/B= intermediary type and B spermatogonia, n=26; pLe= preleptotene, n=27; Le=leptotene, n=27; Zy=zygotene, n=22; ePa=early pachytene, n=27; mPa=mid pachytene, n=50; lPa/Di=late pachytene/diplotene, n=32; rSd=round spermatids, n=50; eSd=elongated spermatids, n=4. Black dashed line represents pPOL2 intensity in Sertoli cells (S, n=28). Scale bar = 5µm

D) Immunofluorescence analysis of POL2 (red) and STRA8 (green) in testis sections. DNA is stained with DAPI (blue). Differentiated A spermatogonia (Sg A_{diff}), pLe and early-leptotene (eLe) cells are stained for STRA8 and show different levels of POL2 intensity. Dotted white curves delimit seminiferous tubules. Scale bars= 5µm

E) Immunofluorescence analysis of POL2 (red) and ZBTB16 (green) in testis sections. DNA is stained with DAPI (blue). Sg A and Sp Int/B are stained for ZBTB16 and show different levels of POL2 intensity. Dotted white curves delimit seminiferous tubules Scale bars= 5µm

F) Schematic representation of Early Meiotic Low Transcription (EMLT) during spermatogenesis, with a focus on meiotic prophase I. Transcription level decreases during spermatogonia differentiation to reach minimum at preleptotene and leptotene stages. Transcription is hyperactivated at mid-pachytene and diplotene stages albeit sex chromosomes remain silent (MSCI).

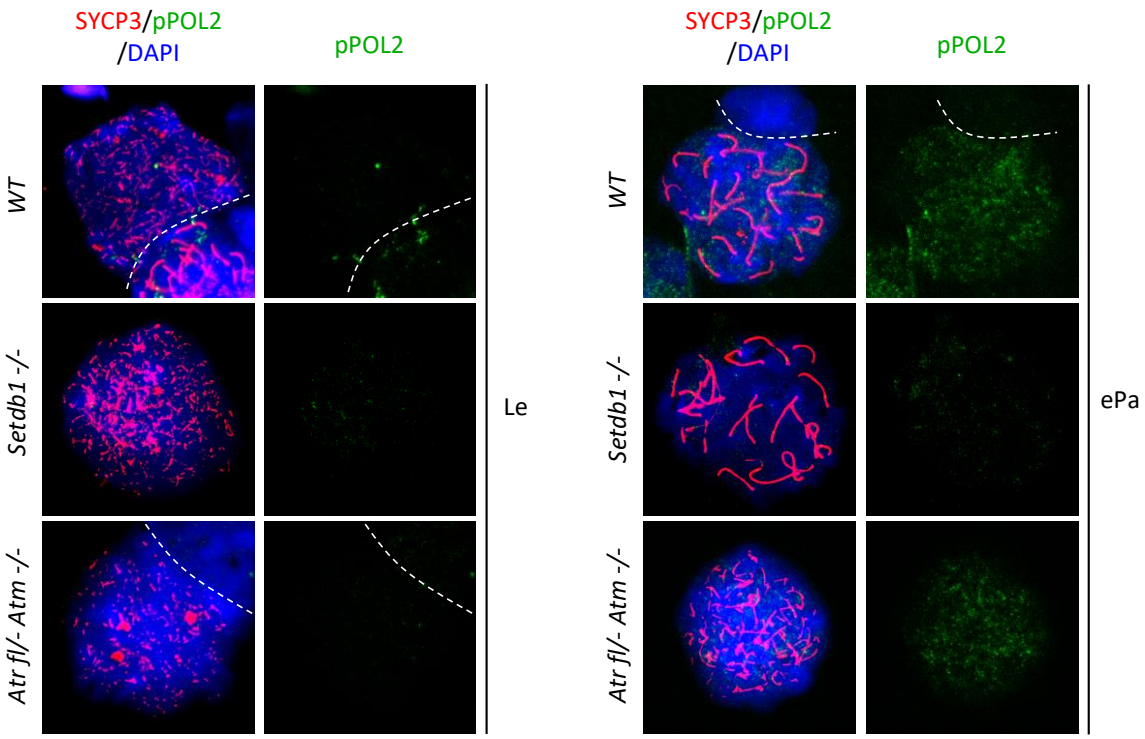


Fig 2. EMLT mechanism differs from MSCI

A) and B) Co-labelling with SYCP3 (red) and pPOL2 (green) of spermatocyte chromosome spreads of *WT*, conditional KO (cKO) mice *Setdb1* -/- and double KO (dKO) *Atr fl/- Atm -/-*. DNA is stained with DAPI (blue). All mice show weak pPOL2 staining at leptotene (Le) stage and at early pachytene (ePa) stages.

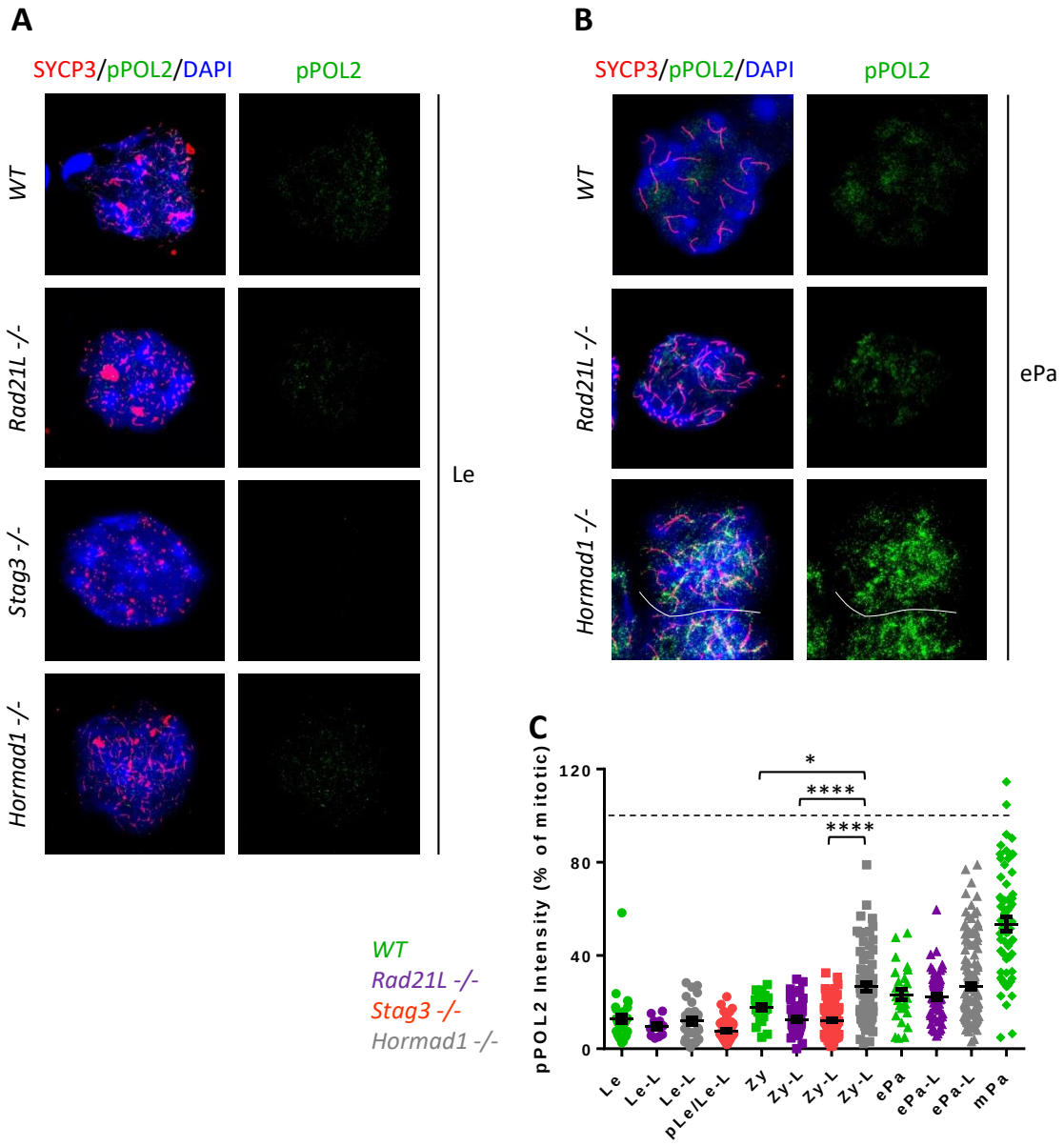


Fig 3. EMLT is independent on chromatin structure and synaptonemal complex.
A) and B) Co-labelling with SYCP3 (red) and pPOL2 (green) on spermatocyte chromosome spreads of WT and KO mice *Rad21L -/-, Stag3 -/-* and *Hormad1 -/-*. All mice show weak pPOL2 staining at leptotene (Le) stage (A). *Hormad1 -/-* early pachytene (ePa) spermatocytes are strongly stained for pPOL2 in comparison to *WT* and *Rad21L -/-* (B). C) Quantification of pPOL2 staining on chromosome spreads. pPOL2 intensity is normalised to mitotic cells (100%, black dashed line). Black bars represent mean ± sem. *WT*: n=5 ; *Hormad1 -/-*: n=3 ; *Stag3 -/-* : n=3 ; *Rad21L -/-*: n=3. *<0,05 **** P<0.0001 (Unpaired T-test).

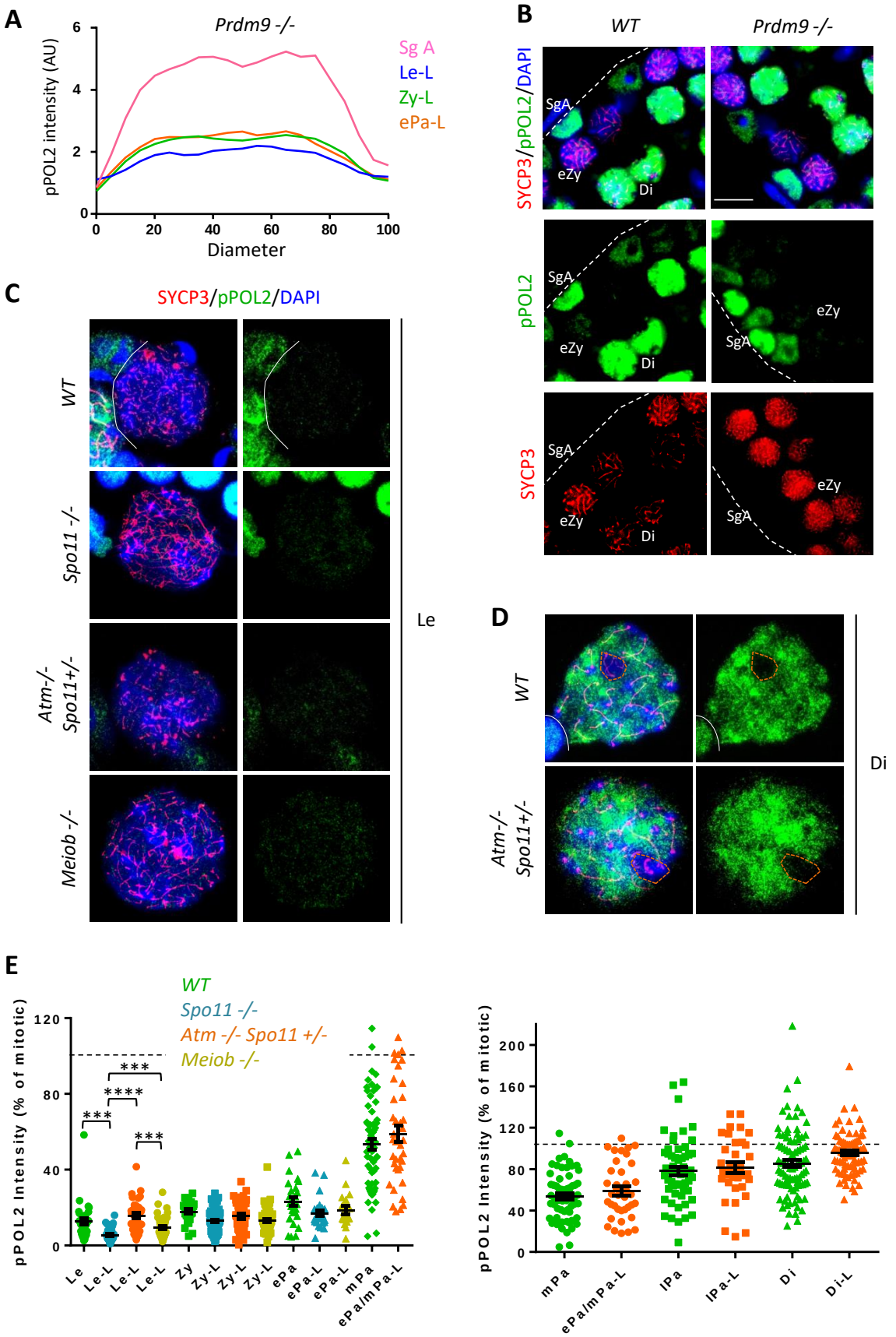

A
Prdm9 -/-
pPOL2 intensity (AU)
Diameter
Sg A
Le-L
Zy-L
ePa-L
B
WT
Prdm9 -/-
SYCP3/pPOL2/DAPI
pPOL2
SYCP3
SgA
eZy
Di
C
SYCP3/pPOL2/DAPI
WT
Spo11 -/-
Atm-/- Spo11+/-
Meiob -/-
Le
D
WT
Atm-/- Spo11+/-
Di
E
WT
Spo11 -/-
Atm -/- Spo11 +/-
Meiob -/-
pPOL2 Intensity (% of mitotic)
Le
Le-L
Zy
Zy-L
ePa
ePa-L
mPa
ePa/mPa-L
IPa
IPa-L
Di
Di-L

Fig 4. EMLT is independent on Double Strand Breaks (DSBs).

A) Line plot quantification of pPOL2 intensity in *Prdm9* null mutants (*Prdm9 -/-,* n=2). For quantification, a line was traced randomly through nucleus and for each point along the line, intensity was quantified using ImageJ software (Plot profile). The horizontal axis rapresents the diameter of the cells. Each line represents the average of pPOL2 intensity of several cells. Leptotene-like (Le-L, n=16), zygotene-like (Zy-L, n=38) and early-pachytene like (ePa-L, n=14) cells are less stained for pPOL2 than A spermatogonia (Sg A, n=9). AU=Arbitrary Units

B) Immunofluorescence staining of pPOL2 (green) on wilde type (WT) and *Prdm9 -/-* testis sections. Prophase I cells are identified thanks to SYCP3 (red) and DNA is stained with DAPI (blue). SgA = spermatogonia A; eZy = early zygotene; Di= diplotene. Dotted white curbs delimit seminiferous tubules. Scale bars= 10µm

C) and D) Co-labelling with SYCP3 (red) and pPOL2 (green) of spermatocyte chromosome spreads of WT and KO mice *Meiob-/-, Spo11-/-* and double transgenic KO mice *Atm-/- Spo11+/-*. All mice show weak pPOL2 staining at leptotene (Le) stage (C). Both WT and Atm -/- Spo11 +/- mice show high pPOL2 staining at Di stage (Di), except for sex body (orange dotted line).

E) Quantification of pPOL2 intensity on chromosome spreads. pPOL2 intensity is normalised to mitotic cells (100%, black dashed line). Black bars represent mean with sem. *WT*: n= 5; *Meiob -/-*: n=3; *Spo11 -/-*: n=3; *Atm-/-Spo11+/-*: n=3. ***<0,001 **** P<0.0001 (Unpaired T-test).

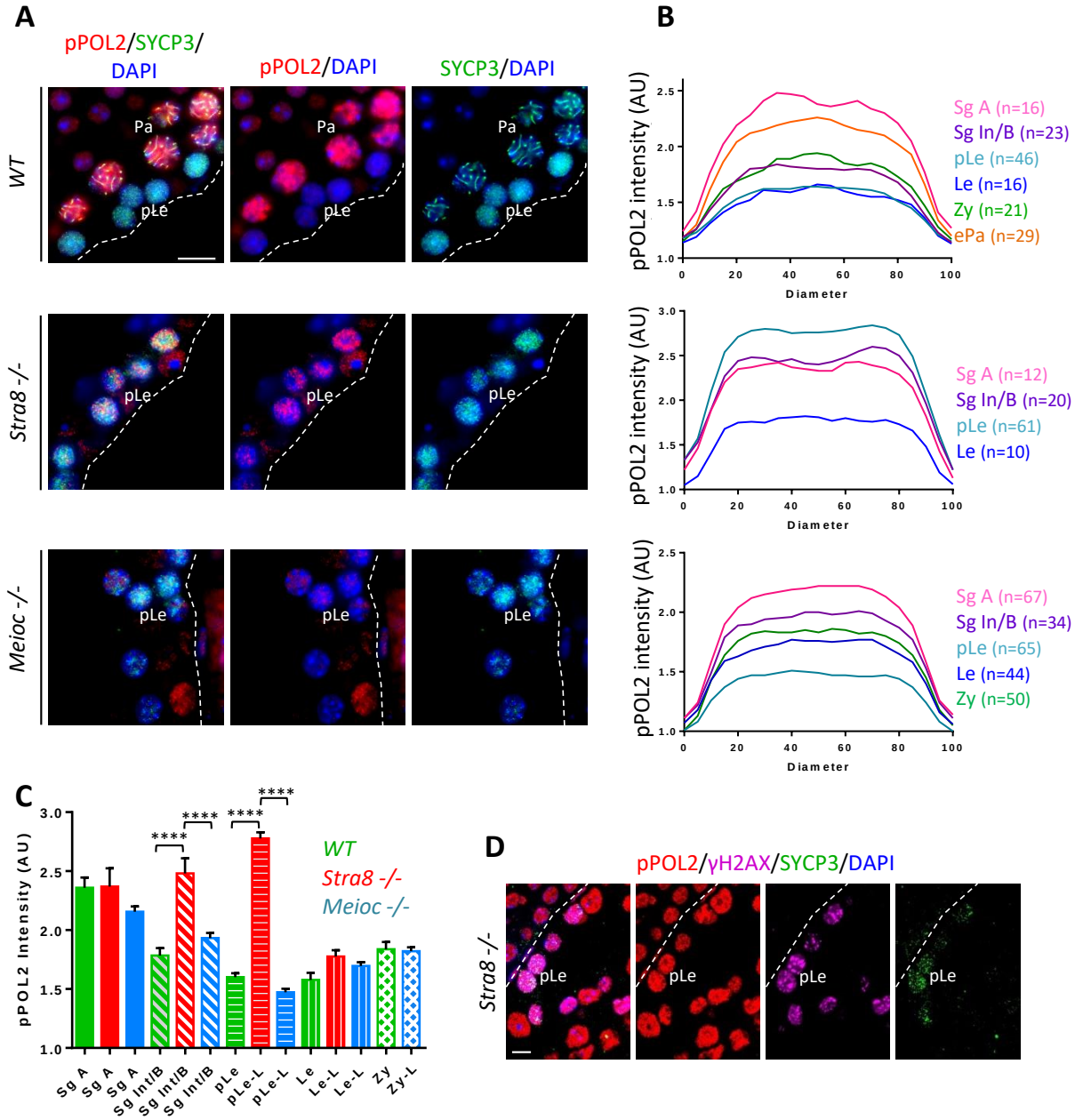


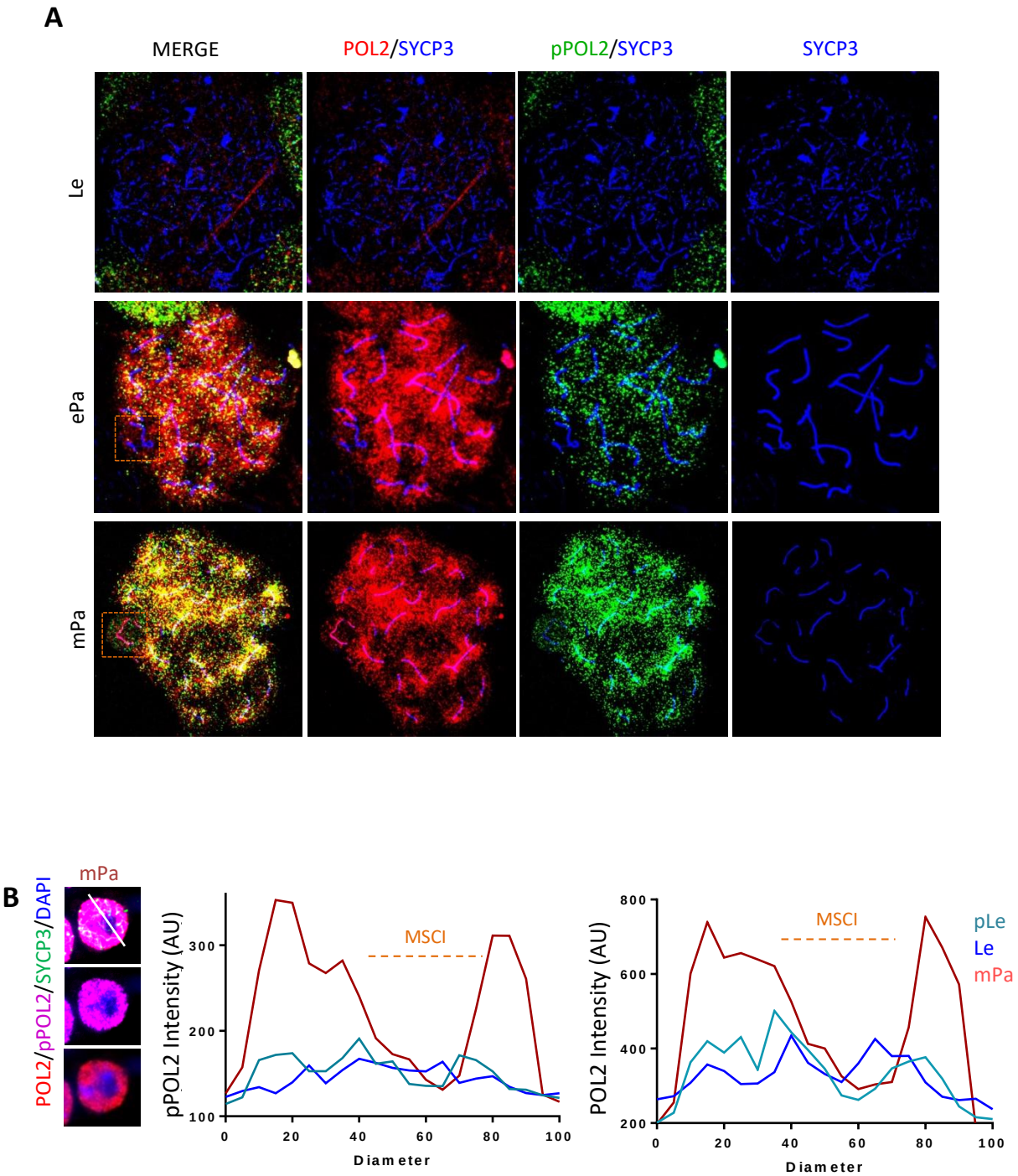
Fig 5. EMLT is dependent on the key regulator of mitosis-meiosis transition, STRA8.

A) Immunofluorescence staining of pPOL2 (green) on WT and KO testis sections from *Stra8 -/- and Meioc -/-*. Preleptotene (pLe) cells are identified thanks to SYCP3 (red) and DNA is stained with DAPI (blue). Scale bars= 10 µm

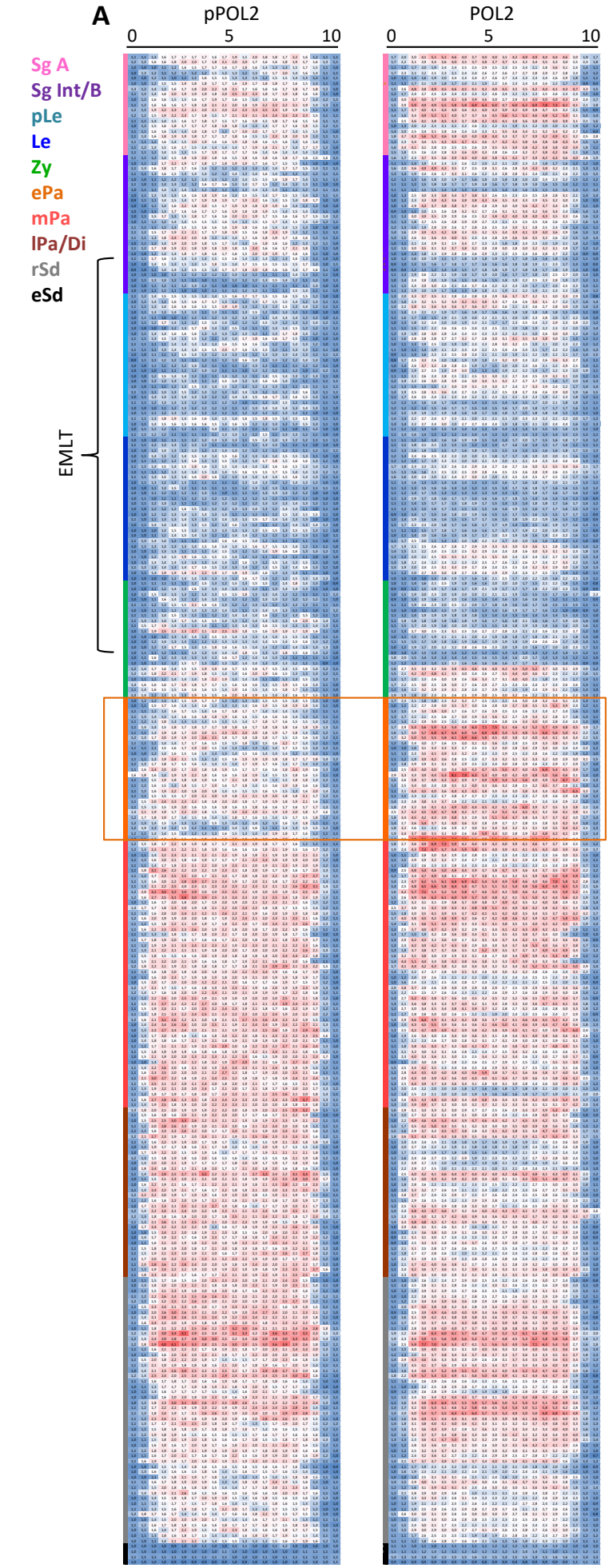
B) Line plot quantification of pPOL2 intensity in *WT (upper), Stra8 -/- (center) and Meioc -/- (lower)*. The horizontal axis represents the diameter of the cells. For each point of the diameter, the intensity of pPOL2 is measured (AU=Arbitrary Units, normalization was based on background level). SgA= Type A spermatogonia ; Sg Int/B = Type intermediary and B spermatogonia; pLe= preleptotene; Le= leptotene, Zy=zygotene; ePa= early pachytene. Each curve represents the average of several cells. The number of cells analysed is indicated in brackets.

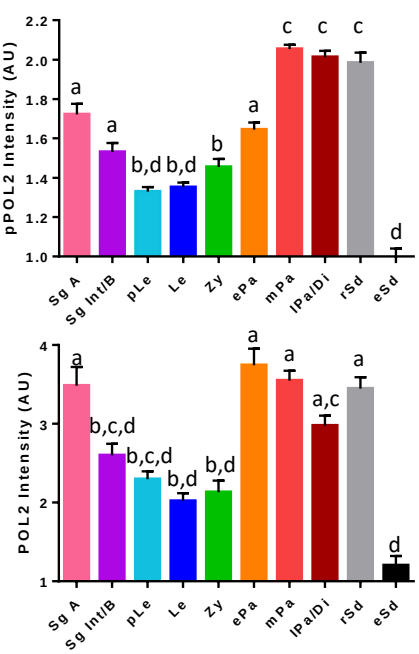
C) Mean pPOL2 intensity within nuclei. Columns represent mean ± sem. In *Stra8 -/-*, Sg Int/B and pLe cells are more stained for pPOL2 than in *WT* and *Meioc -/-*. AU=Arbitrary Units. **** P<0.0001 (Ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons).

D) Co-labelling of pPOL2 (red), γH2AX (magenta) and SYCP3 (green) on *Stra8 -/-* testes sections. DNA is stained with DAPI (blue). pLe cells in *Stra8 -/-* testes, stained for γH2AX and SYCP3, are not subjected to EMLT and show pPOL2 staining. Scale bars= 5µm

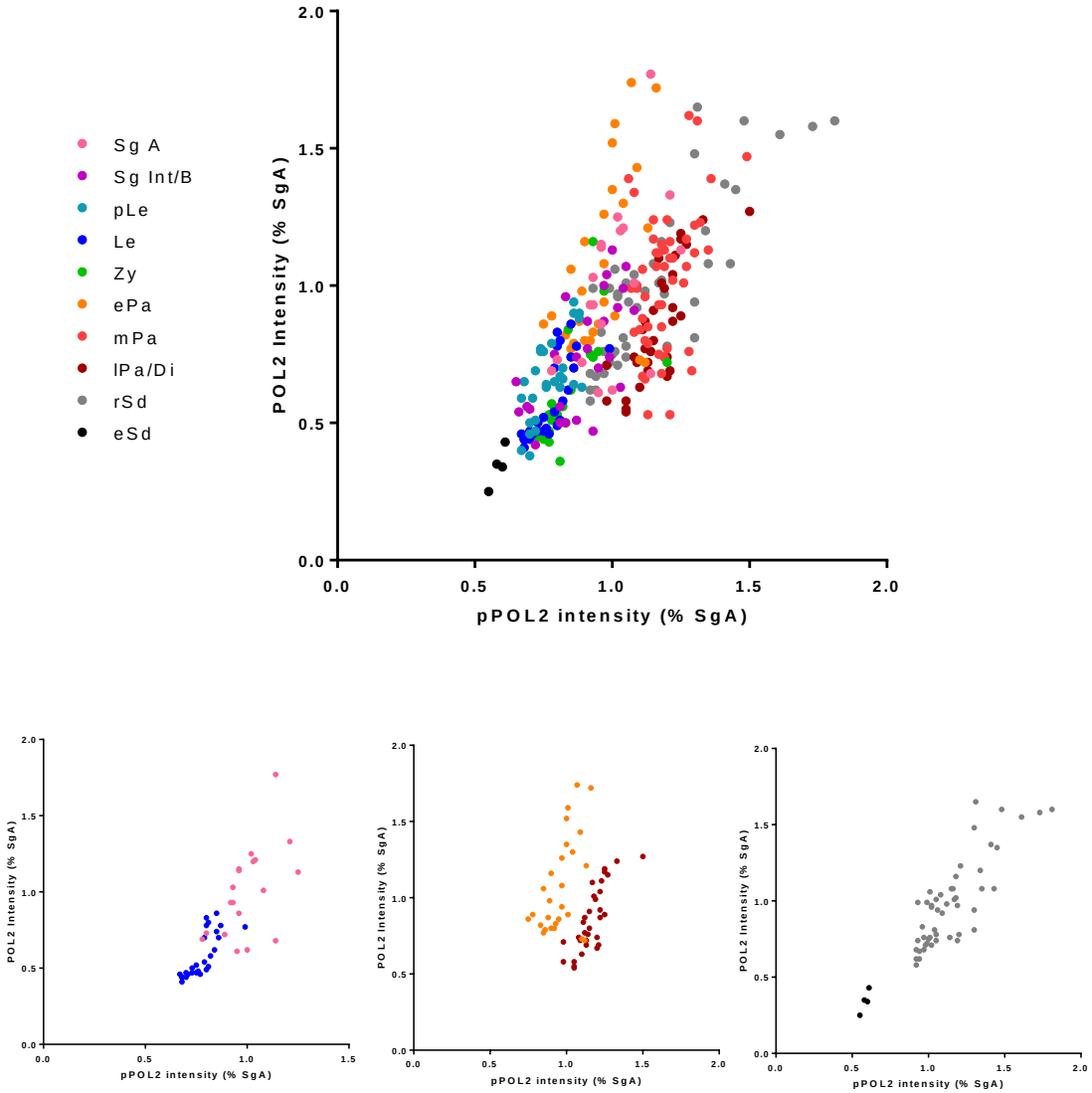


Supp 1. At Pa stage sex body is subjected to Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI).
A) Co-labelling of POL2 (red), pPOL2 (green) and SYCP3 (blue) on chromosome spreads in leptotene (Le), early- and mid-pachytene (ePa, mPa) spermatocytes. Orange dashed squares represent sex body.
B) Plot profile quantification of pPOL2 (left) and POL2 (right). Each line represents one representative cell. pLe = preleptotene; Le = leptotene; mPa = mid-pachytene. The horizontal axis represents the diameter of the cell. For each point of the diameter, the intensity of pPOL2 or POL2 is quantified with ImageJ software. MSCI is indicated with an orange dashed line.



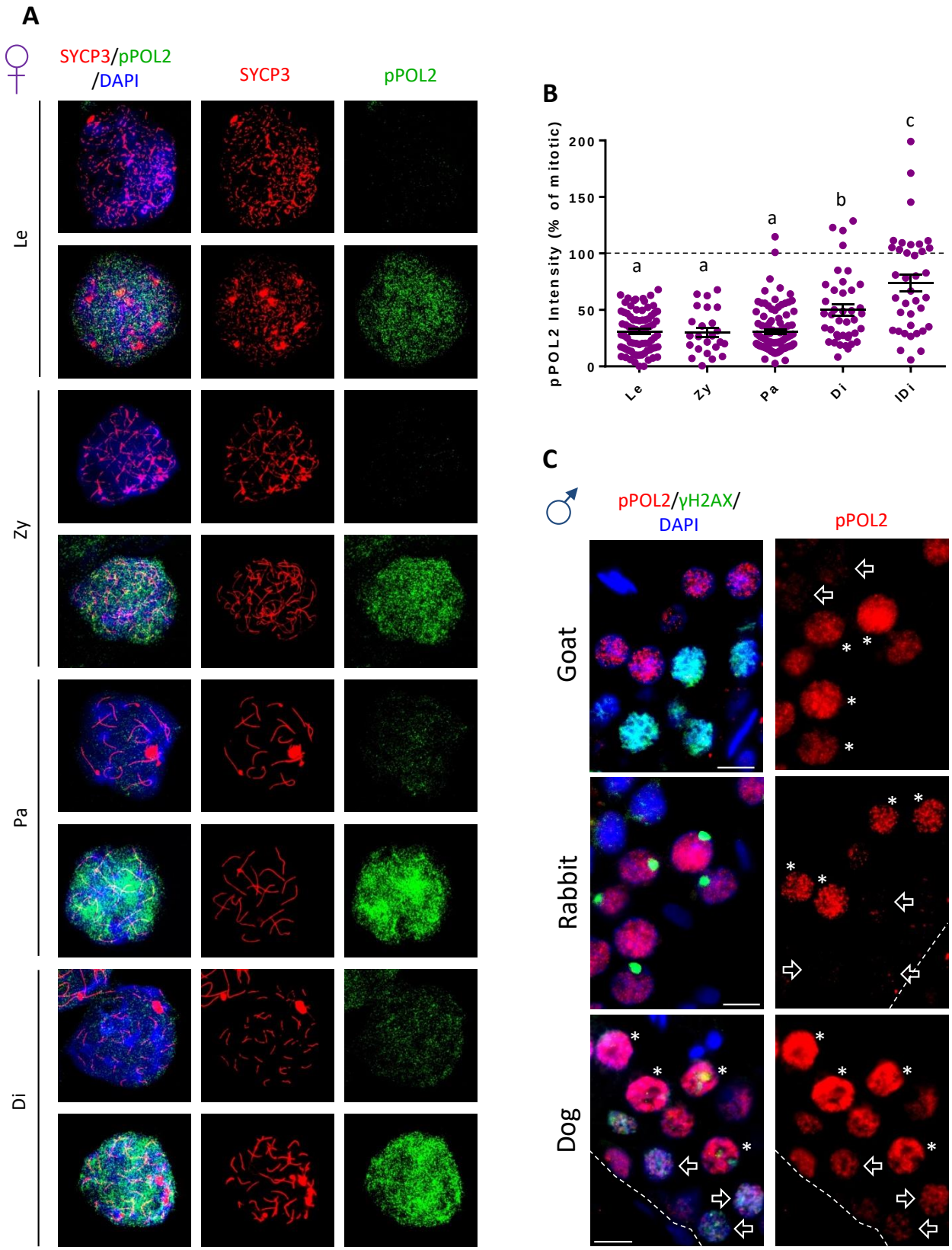


Supp 2. pPOL2 and POL2 are dynamic during spermatogenesis. A) Each line represent one different cell. Cells are ordered top-down from the less differentiated to the more differentiated stage of spermatogenesis. Sg A= Type A spermatogonia, n=19; Sg Int/B= intermediary type and B spermatogonia, n=26; pLe= preleptotene, n=27; Le=leptotene, n=27; Zy=zygotene, n=22; ePa=early pachytene, n=27; mPa=mid pachytene, n=50; lPa/Di=late pachytene/diplotene, n=32; rSd=round spermatids, n=50; eSd=elongated spermatids, n=4. For each cell, intensity of pPOL2 (left) and POL2 (right) is quantified in testis sections with ImageJ software thanks to Plot profile analysis. Each column represent a point along the diameter of the cell, from 0 to 10 (with 0 and 10 representing the cytoplasm of the cell and 5 representing the centre of the cell). ePa spermatocytes (orange rectangle) are low for pPOL2 and high for POL2.
B) Quantification of mean of pPOL2 (upper graph) and POL2 (below) intensity in nucleus. Different letters indicate significant difference (Ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons)



Supp 3. Correlation between POL2 and pPOL2.

POL2 and pPOL2 intensities were measured as discribed in Supp 2. Upper pannel represents all spermatogenic stages. Lower pannel, from left to right, focus on the changes occurring from type A spermatogonia to leptotene spermatocytes (left), from early pachytene to late pachytne/diplotene (middle) and from round to elongated spermatids (right). These evidence respectively the set up of EMLT, the hyperactivation of POL2 and the transcriptional repression occuring during spermiogenesis.

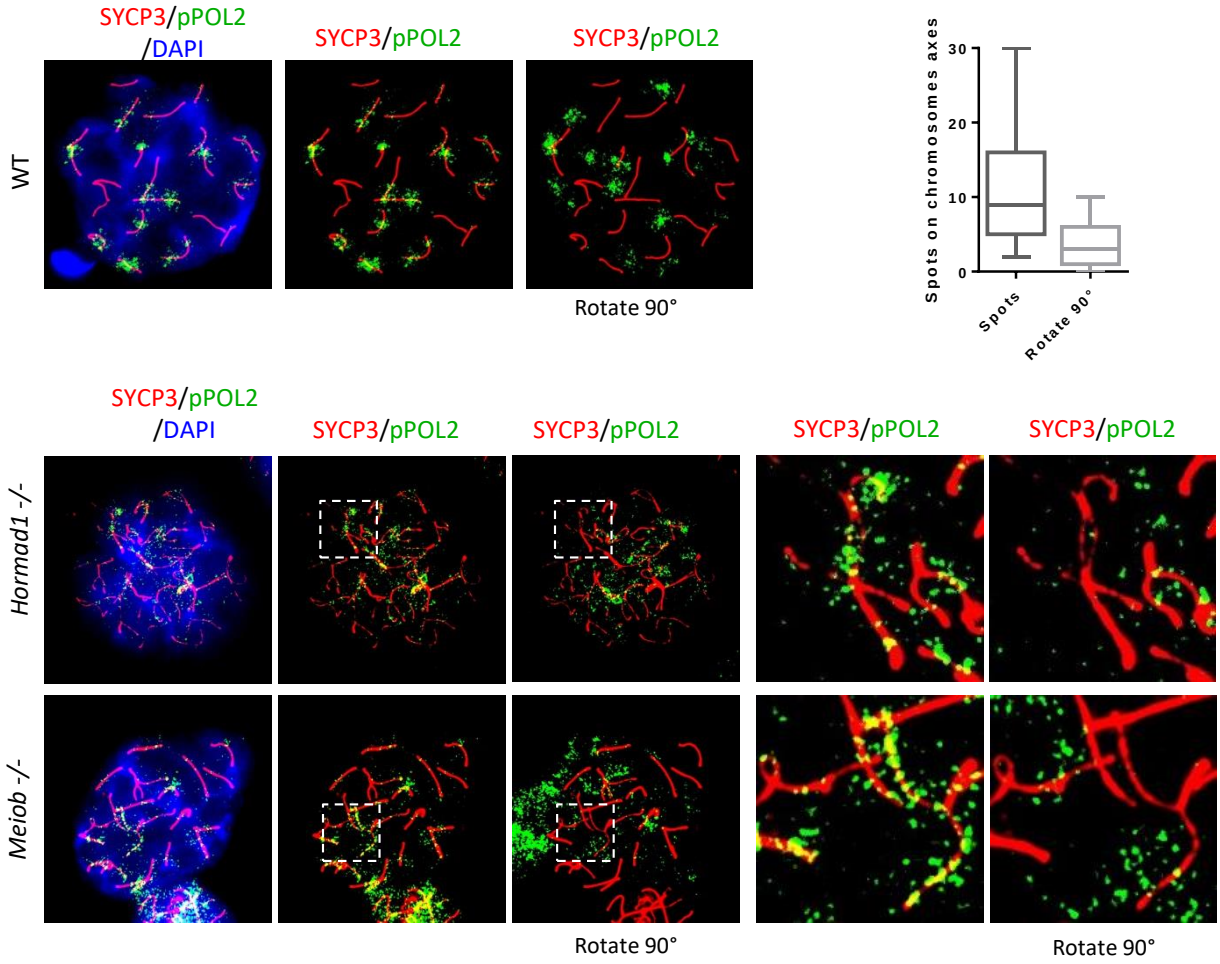

A
SYCP3/pPOL2
/DAPI
SYCP3
pPOL2
Le
Zy
Pa
Di
B
pPOL2 Intensity (% of mitotic)
200
150
100
50
0
a
a
a
b
c
Le
Zy
Pa
Di
IDi
C
pPOL2/γH2AX/
DAPI
pPOL2
Goat
Rabbit
Dog

Supp 4. Conservation of EMLT in female mice and in other mammals.

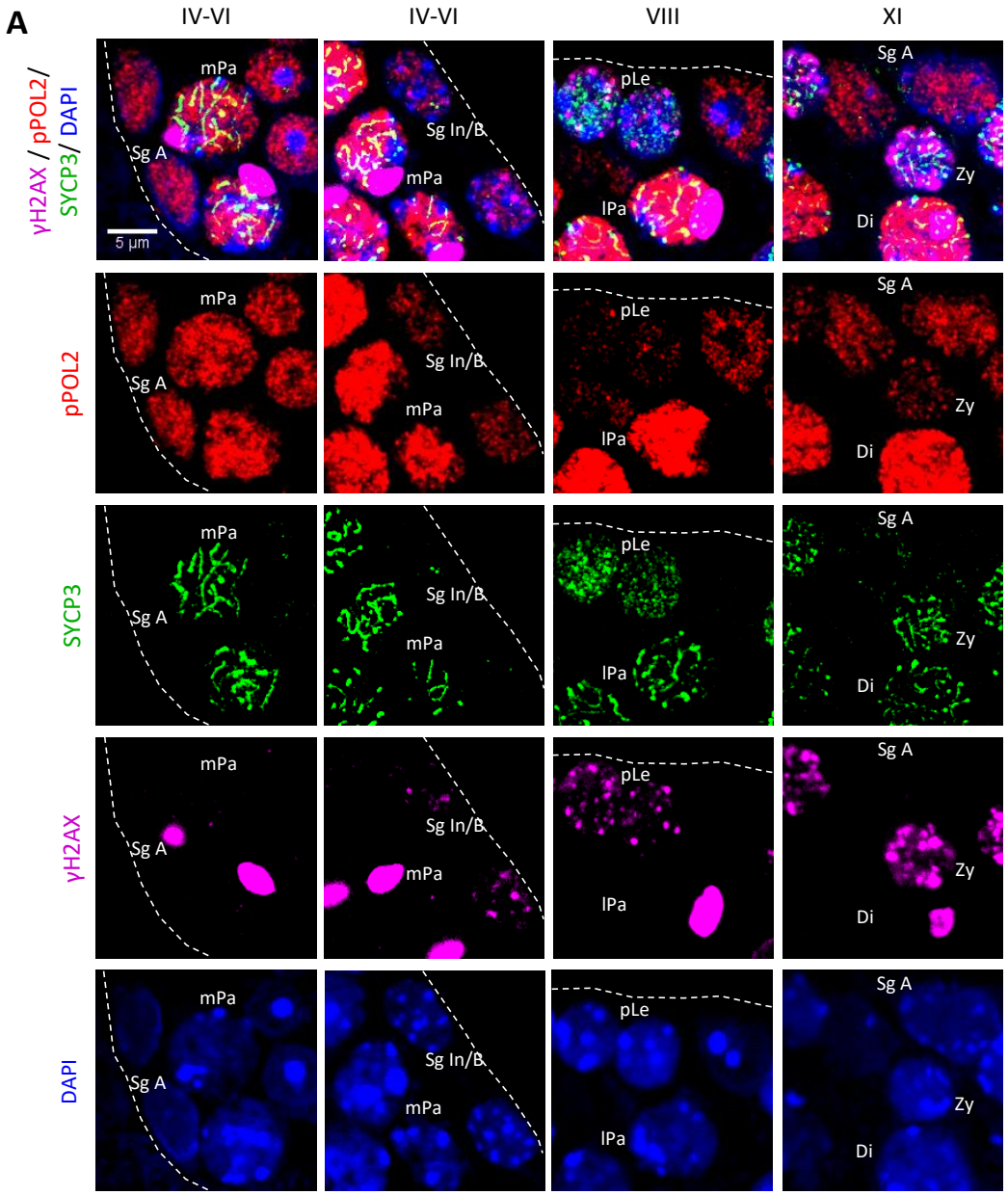
A) Characterisation of pPOL2 expression profile during prophase I in female mice by co-immunolabelling of pPOL2 (green) and SYCP3 (red) on chromosome spreads. DNA is stained with DAPI (blue).

B) Quantification of pPOL2 intensity on mouse oocyte chromosome spreads. pPOL2 intensity is normalised to mitotic cells (100%, black dashed line). Each violet dot represents one cell. Oocytes were retrieved from different embryos (n=5); black bars represent means with sem. pPOL2 staining intensity is heterogeneous at each stage of prophase I. Le=leptotene; Zy=Zygotene; Pa=Pachytene; Di=Diplotene; lDi=late Diplotene. Different letters above the columns indicate significant difference (Ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons).

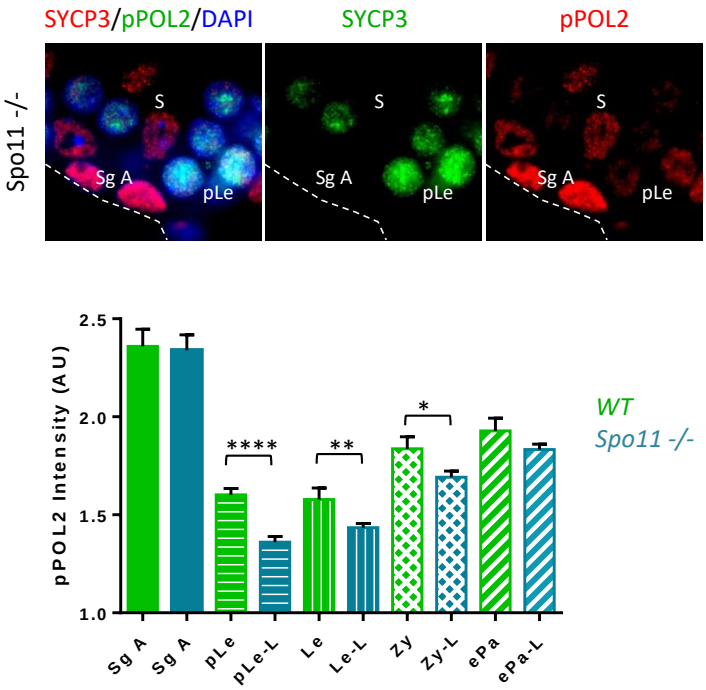
C) Immunofluorescence analysis of pPOL2 (red) intensity in spermatocytes of different mammalian species (Goat, Rabbit and Dog). Spermatocytes are identified thank to γH2AX (green) staining. At the beginning of prophase I (diffuse γH2AX, white arrows) pPOL2 is very low. At the end of prophase I (γH2AX at sex body, white stars) pPOL2 staining is higher. Dotted white curves delimit seminiferous tubules. Scale bars= 10µm



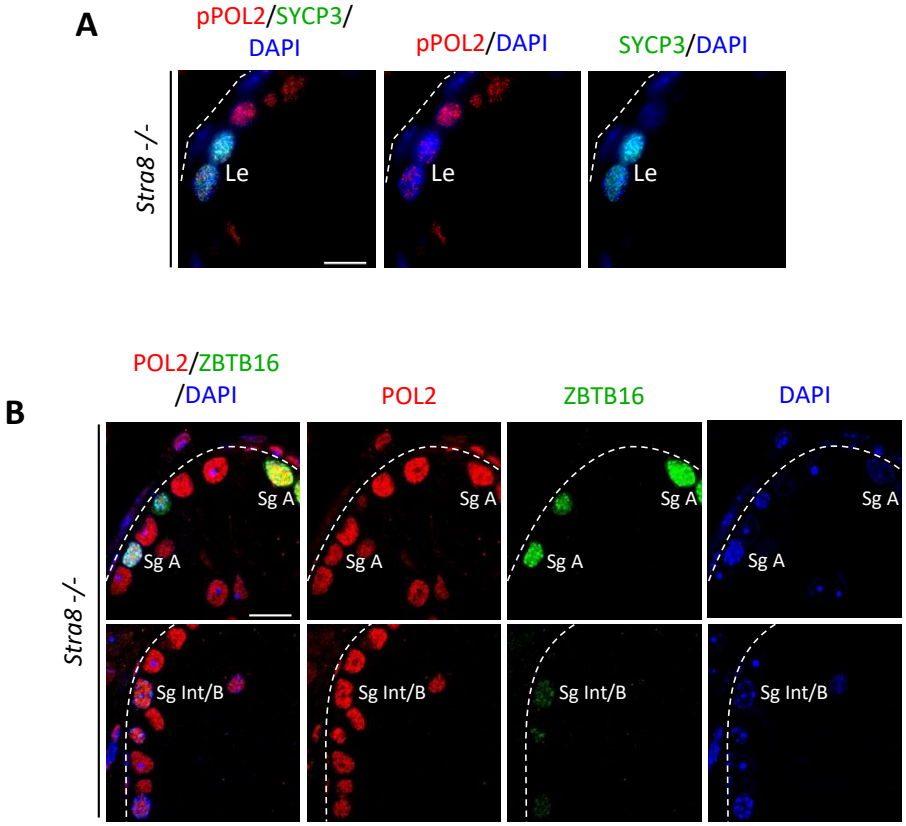
Supp 5. Reappearance of pPOL2 on chromosomes axes. Co-immunolabelling of pPOL2 (green) and SYCP3 (red) on chromosome spreads. DNA is stained with DAPI (blue).
A) In WT pachytene spermatocytes pPOL2 reappears first on chromosome axes as patches. 90° rotation of green colour (pPOL2) confirms that patch localisation on axes is not random.
B) In *Hormad1* and *Meiob* mutants pPol2 reappears on synapsed and asynapsed axes at pachytene stage. White dashed squared represent enlarged images (right).



Supp 6. Dynamic of pPOL2 during spermatogenesis is correlated with γH2AX.
Immunofluorescence analysis of pPOL2 (red), SYCP3 (green) and γH2AX (magenta) on testes sections. DNA is stained with DAPI (blue). A spermatogonia (Sg A), negative for γH2AX, are highly stained for pPOL2. Intermediary/B spermatogonia (Sg Int/B), preleptotene (pLe) and zygotene (Zy) cells are stained for γH2AX and show a low level of pPOL2 staining. γH2AX is absent (except in the sex body) in late prophase I spermatocytes (mPa, lPa, Di), which are high stained for pPOL2. Roman numbers indicate the stage of epithelium cycle. Dotted white curbs delimit seminiferous tubules. Scale bar= 5µm



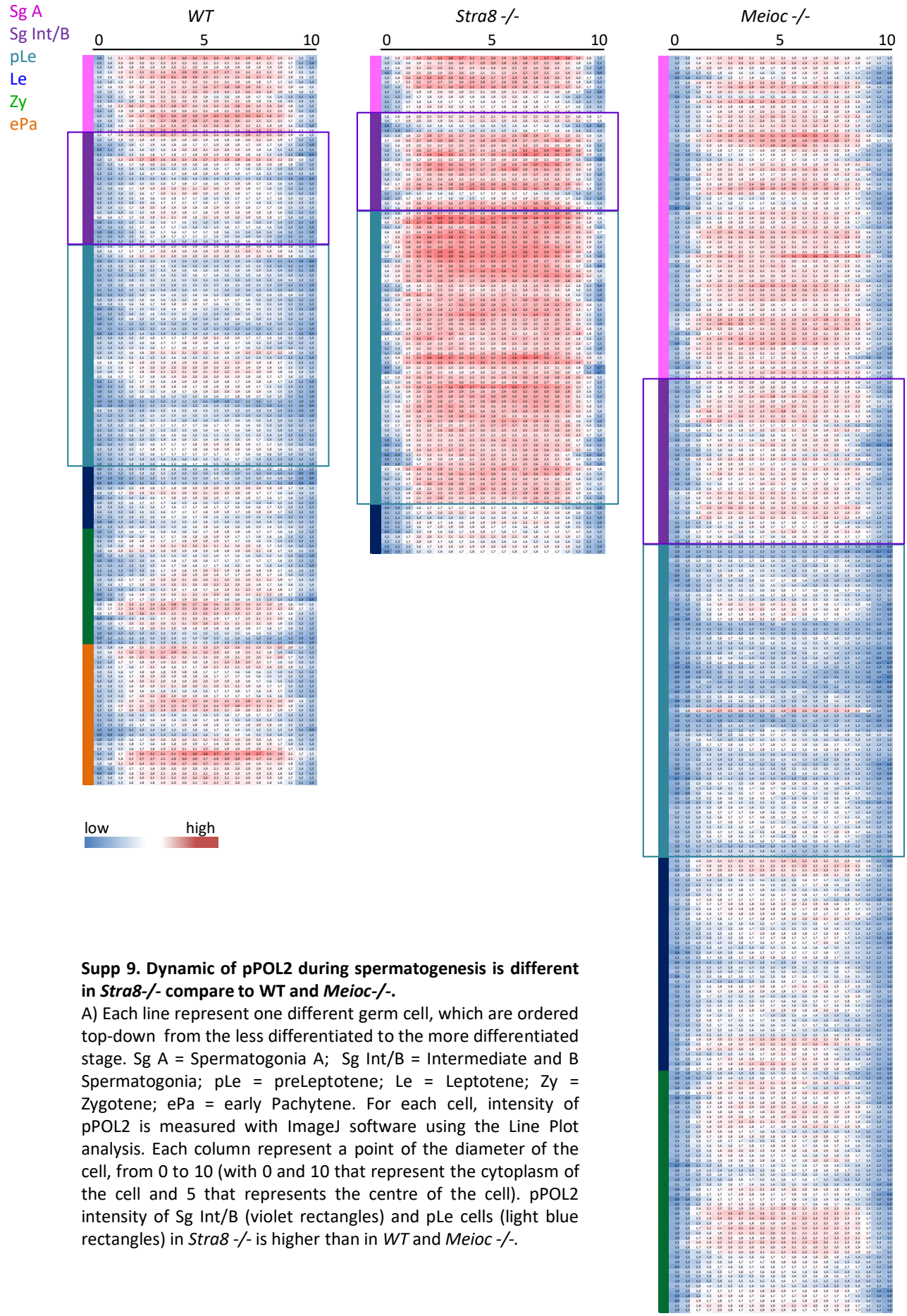
Supp 7. In *Spo11 -/-* mutants EMLT is more pronounced. Co-immunolabelling of pPOL2 (green) and SYCP3 (red) in testis sections. DNA is stained with DAPI (blue). pPOL2 intensity is quantified. SgA= Type A spermatogonia ; pLe= preleptotene; Le= leptotene, Zy=zygotene; ePa= early pachytene; -L = like. *P<0,05 **P<0,01 **** P<0.0001 (Unpaired T-test).



Supp 8. EMLT induction in *Stra8 -/-* mice is delayed.

A) Co-labelling of pPOL2 (red) and SYCP3 (green) in *Stra8-/-* testis sections. DNA is stained with DAPI (blue). Leptotene (Le) cells in *Stra8-/-* testes are subjected to EMLT and show weak pPOL2 staining. Scale bar= 10 µm

B) Co-labelling of POL2 (red) and ZBTB16 (green) in *Stra8-/-* testis sections. DNA is stained with DAPI (blue). Both type A spermatogonia (Sg A) and intermediary type and B spermatogonia (Sg Int/B) are robustly stained for pPOL2. Scale bar= 10 µm

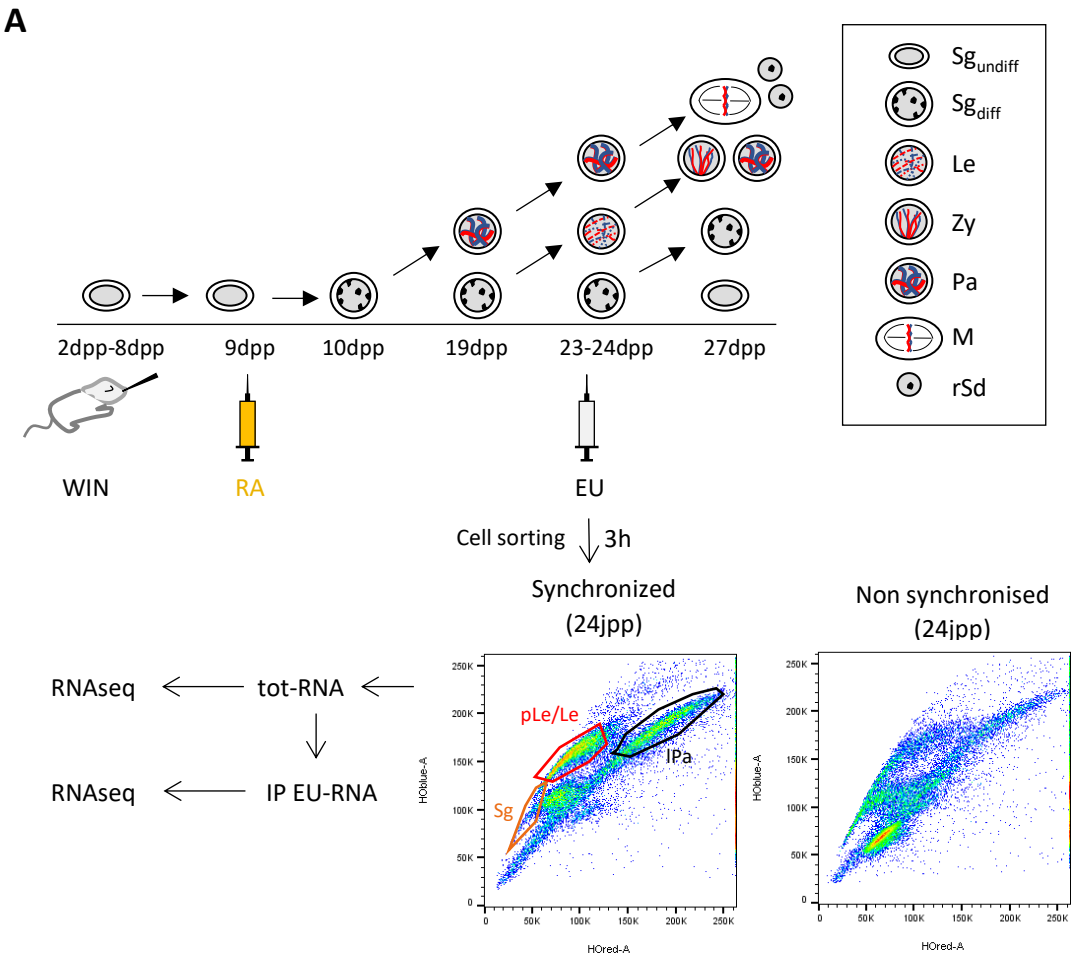


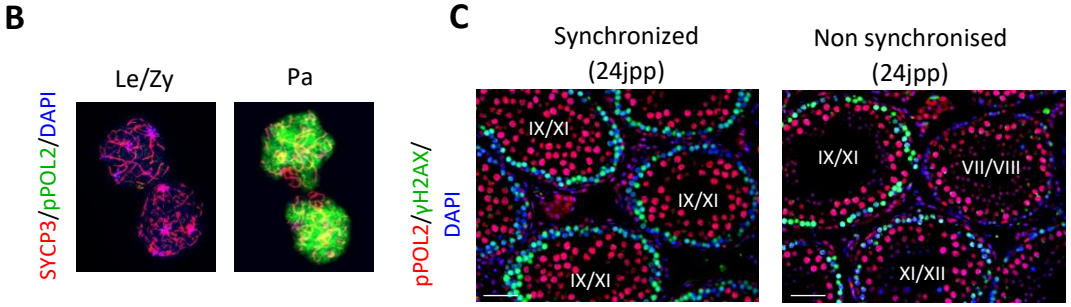
Supp 9. Dynamic of pPOL2 during spermatogenesis is different in *Stra8-/-* compare to WT and *Meioc-/-*.

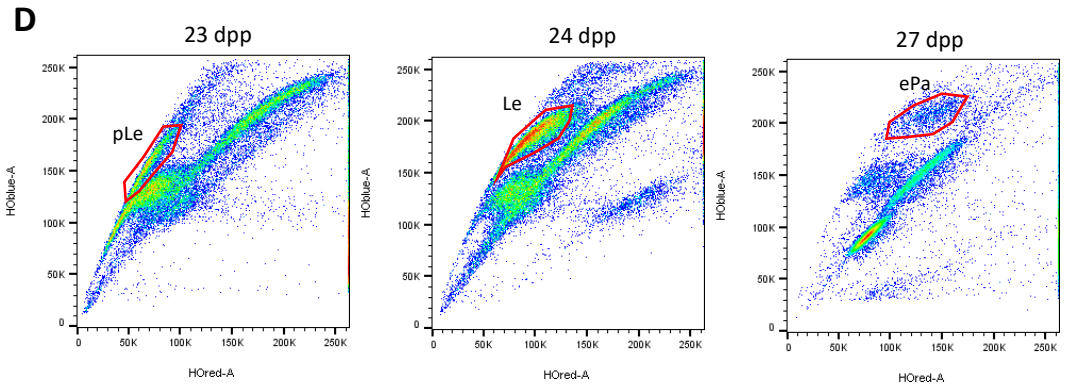
A) Each line represent one different germ cell, which are ordered top-down from the less differentiated to the more differentiated stage. Sg A = Spermatogonia A; Sg Int/B = Intermediate and B Spermatogonia; pLe = preLeptotene; Le = Leptotene; Zy = Zygotene; ePa = early Pachytene. For each cell, intensity of pPOL2 is measured with ImageJ software using the Line Plot analysis. Each column represent a point of the diameter of the cell, from 0 to 10 (with 0 and 10 that represent the cytoplasm of the cell and 5 that represents the centre of the cell). pPOL2 intensity of Sg Int/B (violet rectangles) and pLe cells (light blue rectangles) in *Stra8 -/-* is higher than in *WT* and *Meioc -/-*.

Antibody	Host species	Mono/poly clonal	Application	Concentration	Compagny	Reference
POL2	Mouse	Mono	IF	1/200	ThermoFisher	MAI-46093
pPOL2	Rabbit	Mono	IF	1/200	Abcam	ab193468
STRA8	Rabbit	Poly	IF	1/500	Abcam	ab49602
SYCP3	Rabbit	Poly	IF	1/500	Novus	NB300-232
SYCP3	Mouse	Mono	IF	1/500	Abcam	ab97672
SYCP3	Guinnea-Pig	Poly	IF	1/500	Our lab	
ZBTB16	Mouse	Mono	IF	1/200	Santa Cruz	SC28319
γH2AX	Rabbit	Poly	IF	1/500	Abcam	ab11174
γH2AX	Mouse	Mono	IF	1/500	Millipore	05-636
Alexa488 anti-rabbit	Donkey	Poly	IF	1/500	Life technologies	A21206
Alexa488 anti-mouse	Donkey	Poly	IF	1/500	Life technologies	A21202
Alexa488 anti-guinneaPig	Goat	Poly	IF	1/500	Life technologies	A11073
Alexa594 anti-rabbit	Donkey	Poly	IF	1/500	Life technologies	A21207
Alexa594 anti-mouse	Donkey	Poly	IF	1/500	Life technologies	A21203
594anti-guinneaPig	Donkey	Poly	IF	1/500	Sigma-Aldrich	SAB4600096
Cy5 anti-rabbit						
Cy5 anti-mouse						
Alexa647anti-rabbit						
Alexa647anti-mouse						
Alexa350 anti-guinnea-pig	Donkey	Poly	IF	1/200	Life technologies	

Table S1. List of primary and secondary antibodies used in this article for immunofluorescence (IF). Poly, Polyclonal antibody; Mono, Monoclonal antibody.


A
Sg undiff
Sg diff
Le
Zy
Pa
M
rSd
2dpp-8dpp
9dpp
10dpp
19dpp
23-24dpp
27dpp
WIN
RA
EU
Cell sorting
3h
Synchronized
(24jpp)
Non synchronised
(24jpp)
RNAseq
tot-RNA
RNAseq
IP EU-RNA
pLe/Le
lPa
Sg
HOblue-A
HOred-A


B
Le/Zy
Pa
SYCP3/pPOL2/DAPI
C
Synchronized
(24jpp)
Non synchronised
(24jpp)
pPOL2/γH2AX/
DAPI
IX/XI
IX/XI
IX/XI
IX/XI
VII/VIII
XI/XII


D
23 dpp
24 dpp
27 dpp
pLe
Le
ePa
HOblue-A
HOred-A

III.B. RNAseq : ARN totaux contre ARN néotranscrits

Après avoir étudié la relation (ou l'absence de relation) du *silencing* global avec les différents évènements de la prophase I, nous avons souhaité analyser la qualité de cet arrêt transcriptionnel à l'échelle du génome. L'analyse de la transcription dans des cellules rares et silencieuses d'un point de vue transcriptionnel s'est révélée un défi particulièrement motivant. Dans un premier temps nous avons couplé une méthodologie de synchronisation de la spermatogenèse, qui permet d'enrichir les populations méiotiques, à un tri par FACS, permettant de séparer ces populations. Nous avons ensuite isolé les ARN néotranscrits à travers l'injection d'éthynyl-uridine (3 h) et l'immunoprécipation des ARN ayant incorporé cet analogue de base. Cela nous a ainsi permis de préparer des librairies correspondant aux ARN totaux et néotranscrits pour différentes populations cellulaires. Cette analyse a nécessité de regrouper plusieurs échantillons (3 à 4) par stade d'intérêt. En plus, chaque échantillon est composé de cellules du même stade issues de plusieurs animaux. Les ARN néotranscrits sont en effet très peu abondants.

L'analyse des données de RNAseq est faite en collaboration avec Frédéric Chalmel (IRSET, Rennes). Cette analyse n'est pas encore complète, j'ai donc décidé de montrer les résultats préliminaires à part, sans les inclure dans le manuscrit (en préparation).

III.B.1. Préparation des échantillons

Dans la **Figure 20**, je schématise le protocole utilisé pour le séquençage des ARN, qui consiste en : I) synchroniser la spermatogénèse dans des testicules postnataux, II) incorporer l'Ethynyl-Uridine dans les ARN naissants, III) trier les différentes populations germinales à 23 et 24 jpp (spermatogonies, leptotènes et pachytènes), IV) extraire les ARN totaux et V) utiliser une fraction des ARN totaux pour immunoprécipiter les ARN néotranscrits ayant incorporé l'Ethynyl-Uridine, par la méthode *Click-iT*.

Figure 20: Protocol expérimental : synchronisation, tri, immunoprecipitation des ARN néotranscrits et séquençage des ARN. A) Schématisation du protocol : nous avons synchronisé la spermatogenèse comme décrit précedemment (Hogarth et al.). À 23 ou 24 jpp (dpp), nous avons injecté l'Ethynyl-Uridine (EU). Après 3 h nous avons trié par FACS différentes populations de cellules germinales: spermatogonies (Sg, 2n), préleptotènes/leptotènes (pLe/Le, 4n précoces) et pachytènes tardifs (lPa, 4n tardives). À partir des cellules triées nous avons etraît les ARN totaux (tot-RNA). Nous avons utilise une partie des ARN totaux pour immunoprecipiter les ARN ayant incorporé l'EU (IP EU-RNA) en utilisant la méthode *Click-iT (Thermo Fisher)*. Nous avons construit les librairies à partir des ARN totaux ainsi qu'à partir des ARN néotranscrits et nous les avons envoyé à sequencer (RNAseq). Sgundiff = spermatogonies indifférenciées; Sgdiff = spermatogonies differenciées ; Le = leptotène ; Zy = zygotène ; Pa = pachytène ; M = metaphases ; rSd = spermatids rondes. **B)** Immunomarquage de SYCP3 (rouge) et pPOL2 (vert) sur étalements de cellules triées: population leptotène (Le/Zy) et population pachytène (Pa). L'ADN est marqué en bleu (DAPI). **C)** Immunomarquage de la pPOL2 (rouge) et γH2AX (vert) sur coupe d'un testicule de 24 jpp synchronisé (à gauche) et non-synchronisé (à droite). L'ADN est marqué en bleu (DAPI). Les nombres romains indiquent le stade de l'épithélium séminifère. **D)** Profils FACS à partir de testicules de trois différentes âges (23, 24, 27 jpp) synchronisés. On observe la progression synchrone des cellules germinales dans la spermatogenèse. En exemple, les préleptotènes (pLe) à 23 jpp ont progressé en leptotene (Le) à 24 jpp et en début pachytene (ePa) à 27 jpp.

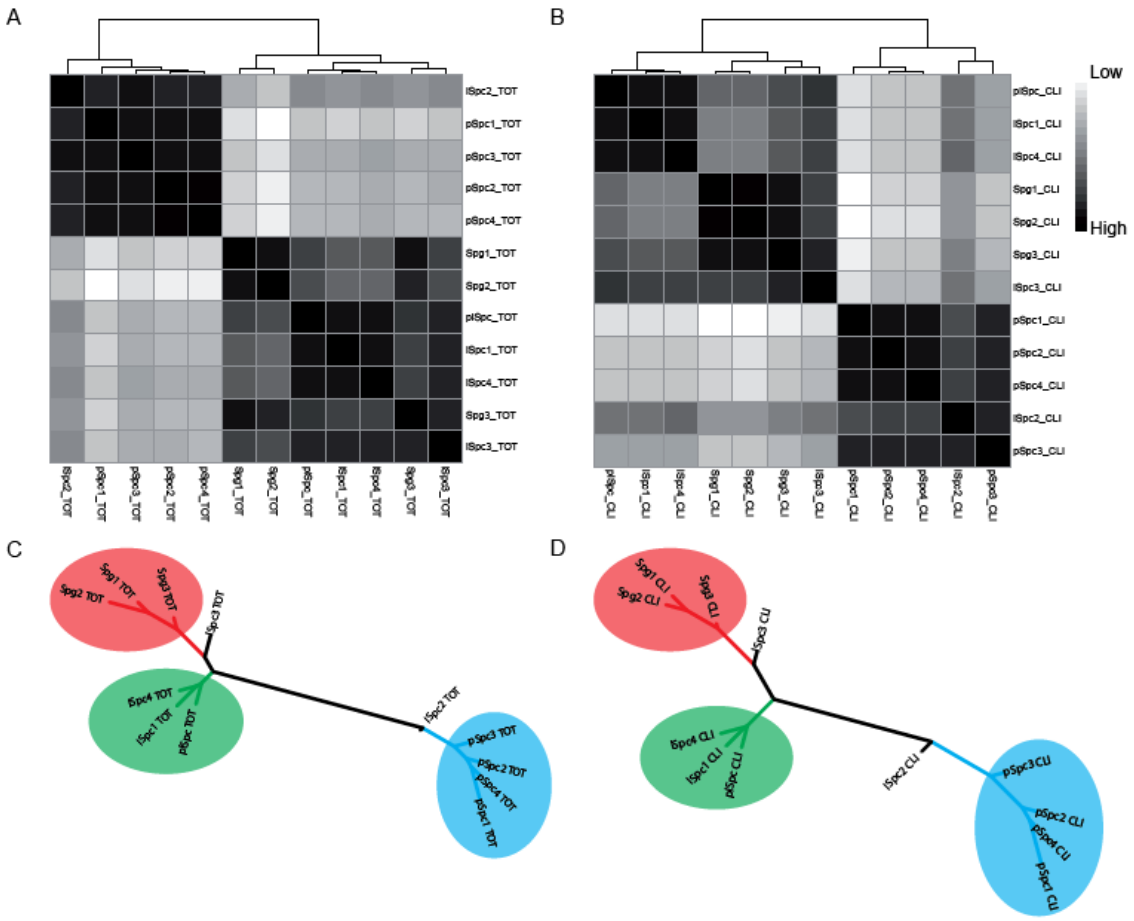


Figure 21: *Clustérisation* des échantillons séquencés en fonction des ressemblances transcriptomiques. Nous avons séquencé les ARN totaux et les ARN néotranscrits de 12 échantillons: 3 spermatogonies (Spg1, Spg2, Spg3) ; 1 préleptotène (plSpc), 4 leptotènes (lSpc1, lSpc2, lSpc3, lSpc4) et 4 pachytènes (pSpc1, pSpc2, pSpc3, pSpc4). **A) et C)** Clusterisation des échantillons sur la base des donnés du séquençage des ARN totaux (TOT). **B) et D)** Clusterisation des échantillons en fonction des séquençages des ARN néotranscrits (CLI) **C) et D)** Les échantillons sont ordonnés en fonction des ressemblances transcriptomiques, à partir de l'échantillon Spg2 (choix arbitraire). Plus on s'éloigne de l'échantillon Spg2, plus en avance dans la spermatogenèse. En rouge : population des spermatogonies ; en vert : population des préleptotène/leptotènes ; en bleu : population des pachytènes

Nous avons synchronisé la spermatogénèse comme décrit par Hogarth et al. (Hogarth et al., 2013). Brièvement, nous avons traité quotidiennement des souriceaux au WIN 18,446 (inhibiteur de l'enzyme de biosynthèse de l'AR, RALDH2) entre 2 et 8 jpp. Ceci prévient la différenciation des spermatogonies A indifférenciés en spermatogonies A1 différenciés. À 9 jpp nous avons injecté l'AR en intrapéritonéal, ce qui induit la première vague de spermatogénèse de manière synchrone au sein du testicule. Cette synchronicité est maintenue pour les vagues de spermatogénèse suivantes.

À 23 ou 24 jpp nous avons traité les souriceaux *in vivo* (injection intrapéritonéal) avec de l'Ethynyl-Uridine. Après 3 heures, nous avons dissocié le testicule et trié les cellules germinales à trois différents stades (profil n/2n/4n) : spermatogonies, spermatocytes I précoces (leptotène) et spermatocytes I tardifs (pachytène). À partir des populations triées, nous avons extrait les ARN totaux. Nous avons utilisé une partie des ARN totaux pour immunoprécipiter les ARN néotranscrits, ayant incorporé l'Ethynyl-Uridine, par la méthode C*lick-iT (Thermo Fisher)*.

Nous avons ensuite construit les librairies d'ARN à partir des ARN totaux (TOT) et des ARN néotranscrits (CLI) et nous les avons envoyés à séquencer au CNRGH du CEA. Nous avons effectué l'analyse transcriptomique sur 12 échantillons: 3 spermatogonies (Spg1, Spg2, Spg3) ; 1 préleptotène (plSpc), 4 leptotènes (lSpc1, lSpc2, lSpc3, lSpc4) et 4 pachytènes (pSpc1, pSpc2, pSpc3, pSpc4).

III.B.2. Clustering de nos échantillons

En premier, nous avons effectué une comparaison globale des transcrits présents dans nos échantillons (pour les ARN totaux ainsi que pour les ARN néotranscrits), afin de déterminer la ressemblance entre nos échantillons. En **Figure 21**, nous pouvons observer que nos échantillons sont groupés en deux blocs principaux: les pachytènes clustérisent ensemble et les spermatogonies, le préleptotène et les leptotènes constituent un deuxième bloc. Les deux mêmes clusters ressortent par l'analyse des ARN totaux et des ARN néotranscrits. Bizarrement, l'échantillon que nous avons nommé leptotène lSpc2 clustérise avec les pachytènes. Ceci pourrait être dû au fait que cet échantillon leptotène dérive de testicules contenant des spermatocytes plus avancés dans la spermatogénèse ; les spermatocytes pourraient donc être des cellules en début de pachytène plutôt que des spermatocytes en leptotène. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une contamination dans notre échantillon : dans ce cas, on pourrait avoir des spermatocytes en leptotène mélangés avec des spermatocytes en pachytène. Dans le cluster composé par les spermatogonies, le préleptotène et les leptotènes, nous pouvons observer deux sous-groupes : les spermatogonies 1 et 2 (Spg1 et Spg2) clustérisent très bien ensemble, ainsi que le préleptotène (plSpc) clustérise très bien avec les leptotènes 1 et 4 (Spc1 et Spc4). Cette ressemblance du préleptotène au leptotènes 1 et 4 on la retrouve à la fois en ARN totaux et en ARN néotranscrits. Ceci pourrait être dû au fait que la population plSpc contient des préleptotènes tardifs, ayant déjà démarré la programmation méiotique.

Nous avons ensuite créé une 'pseudo flèche temporelle' permettant d'ordonner nos échantillons en fonction de leurs similitudes (**Figure 21C** et **21D**). Le résultat ressemble à une arborisation, plus on avance dans cet arbre, plus on s'éloigne de l'échantillon spermatogonie 2 et plus on avance dans la spermatogénèse. Nous pouvons observer très clairement les trois populations déjà déterminées par la clustérisation : les

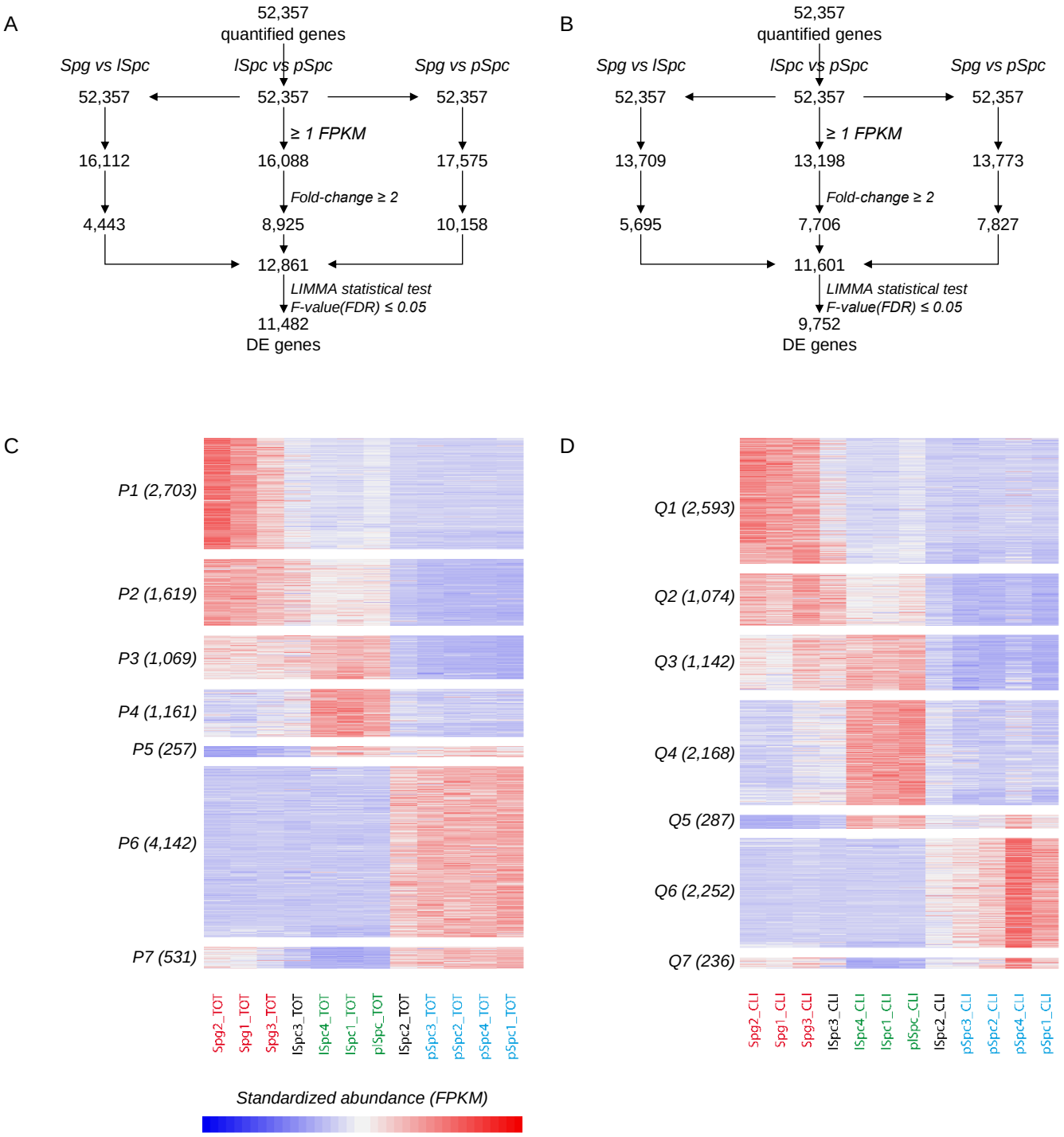


Figure 22: Regroupement des gènes en fonction de leur profil d'expression en ARN totaux (TOT) et en ARN néotranscrits (CLI). A) Identification de 11.482 gènes différemment exprimés (DE genes) dans nos trois catégories principales de populations cellulaires (Spg =spermatogonies, lSpc = leptotènes, pSpc = pachytènes), à partir de 52.357 gènes quantifiés dans l'analyse des ARN totaux (TOT). **B)** Identification de 9.759 gènes différemment exprimés (DE genes) à partir de 52.357 gènes quantifiés dans l'analyse des ARN néotranscrits (CLI). **C) et D)** Les échantillons sont ordonnés de gauche à droite en fonction de leur avancement dans la spermatogénèse, déterminé précédemment (Figure 20). Chaque ligne représente un des gènes identifiés comme différemment exprimé. Nous identifions différents groupes de gènes ayant des profils d'expression équivalents. Les profils sont nommés P pour les ARN totaux et Q pour les ARN néotranscrits. Nous identifions 7 profils différents, pour les ARN totaux (de P1 à P7) et les ARN néotranscrits (de Q1 à Q7).

spermatogonies (population Sg), le préleptotène avec les leptotènes 2 et 4 (population pLe/Le) et les pachytènes (population Pa). La population des préletotène/leptotènes est plus proche des spermatogonies que des pachytènes. Le leptotène 3 se place entre les spermatogonies et les leptotènes, en étant probablement plus précoce. Le leptotène 2 se trouve entre les leptotènes et les spermatocytes pachytènes.

III.B.3. Profils d'expression

Nous avons ordonné nos échantillons en fonction de leur avancement dans la spermatogénèse (déterminé par l'arbre en **Figure 21**). Nous avons ensuite identifié les gènes différemment exprimés dans nos trois populations (Sg, pLe/Le et Pa) (**Figure 22A** et **Figure 22B**). Pour les ARN totaux, à partir des 52,357 gènes séquencés, 11,482 ont un niveau d'expression qui varie dans nos populations ; pour les ARN néotranscrits, nous identifions 9,752 gènes différemment exprimés. Ces gènes varient de manière dynamique en suivant différents profils d'expression. Nous pouvons observer que, pour chacune de nos populations, nous pouvons identifier un groupe de gènes qui est spécifiquement exprimé. Ceci est valable pour les ARN totaux (profils P) ainsi que pour les ARN néotranscrits correspondants (profils Q). On démarre de gènes exprimés majoritairement dans les spermatogonies (P1) jusqu'à arriver aux gènes exprimés spécifiquement en pachytène (P6). Similairement, en Q1 nous retrouvons les gènes spécifiquement transcrits dans les spermatogonies jusqu'à arriver aux gènes transcrits uniquement en pachytène (Q6). Les profils P7 et Q7 correspondent aux gènes exprimés (P7) et transcrits (Q7) dans les spermatogonies et plus tardivement dans les pachytènes.

L'objectif principal étant de déterminer si des gènes sont différemment exprimés et transcrits en méiose, nous avons analysé la corrélation des profils P (ARN totaux) et Q (ARN néotranscrits) pour l'ensemble des gènes. Nous déterminons donc deux groupes de gènes : ceux ayant un même profil d'expression (ARN totaux) et transcription (ARN néotranscrits) et ceux ayant un profil d'expression (ARN totaux) qui ne corrèle pas avec le profil de transcription (ARN néotranscrits). Précisément, à partir de 11,482 gènes pour les ARN totaux et 9,752 pour les ARN néotranscrits, nous identifions 6,940 gènes ayant un profil corrélé entre ARN totaux et néotranscrits (profils R, **Figure 23**). De manière intéressante, nous identifions 2,612 gènes qui ont un profil différent entre TOT et CLI (profils S, **Figure 24**). Nous pouvons, par exemple, observer des gènes exprimés surtout en pachytène mais qui sont transcrits majoritairement en leptotène (S3). Ceux-ci sont probablement les gènes qui sont transcrits et stabilisés. En S7 nous identifions les gènes qui sont fortement transcrits dans les spermatogonies mais qui sont exprimés de manière équitable dans les spermatogonies et leptotènes. En S8 nous avons des gènes qui sont fortement transcrits en leptotène mais qui sont exprimés de manière homogène dans nos différentes populations. En S1 et S6 nous observons des gènes exprimés dans les spermatogonies mais qui ne sont pas fortement transcrits. Une possible explication est que ces gènes sont faiblement transcrits et stabilisés. Le profil S5 regroupe les gènes qui sont fortement exprimés au stade pachytène mais qui ne sont transcrits dans aucune de nos populations. Il se peut que ces ARN soient transitoirement transcrits dans les spermatocytes en zygotène ou en début de pachytène, absents dans notre analyse.

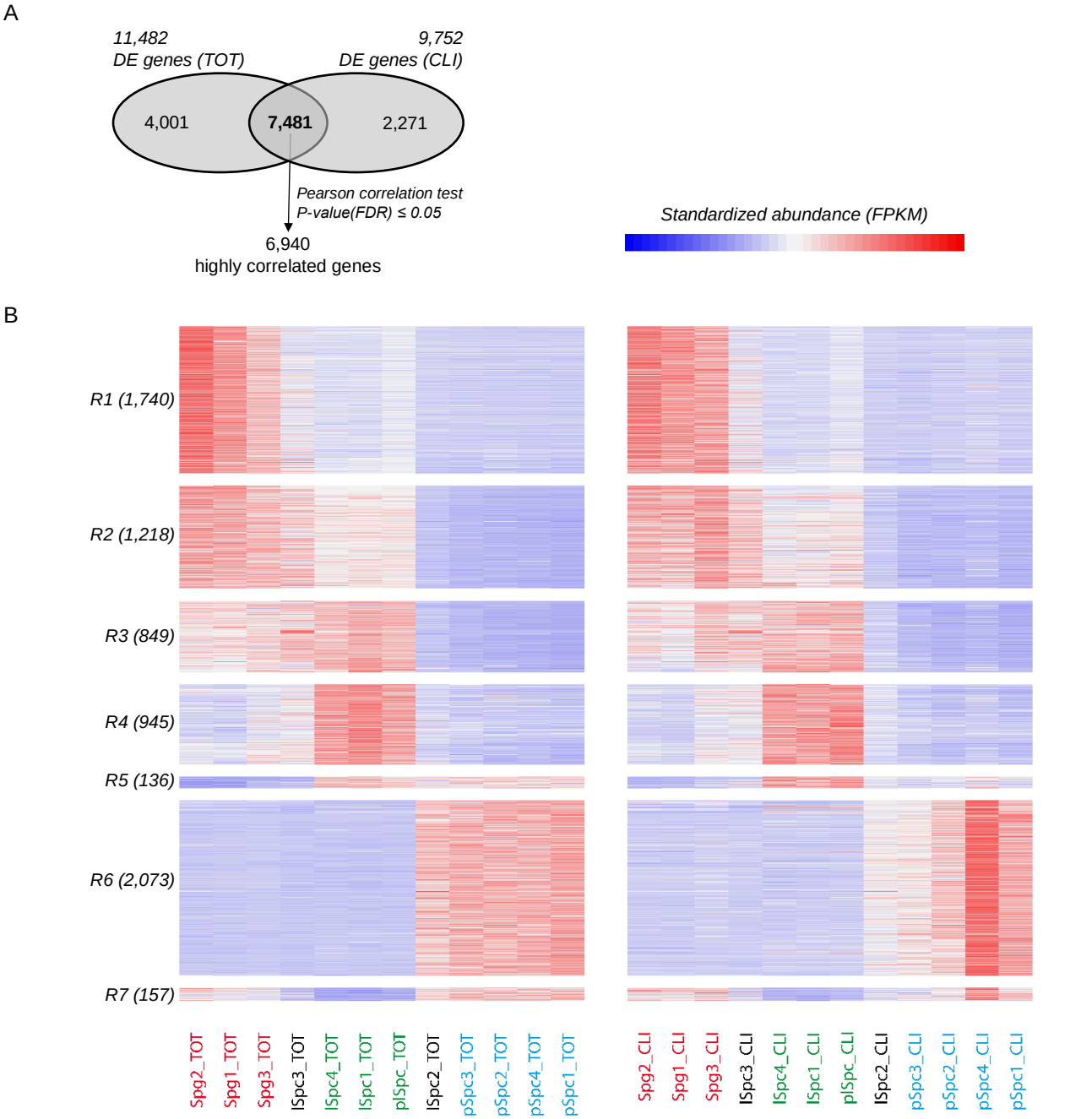


Figure 23: Représentation des gènes ayant un profil P (ARN total) et Q (ARN néotranscrit) corrélés. Identification de 6.940 gènes avec un profil d'expression corrélé en ARN total et ARN néotranscrit. Chaque ligne représente un même gène à gauche (ARN total) et à droite (ARN néotranscrit). Les gènes sont groupés en fonction de leurs profiles d'expression. Nous nommons les différents groupes avec la lettre R (de 1 à 7).

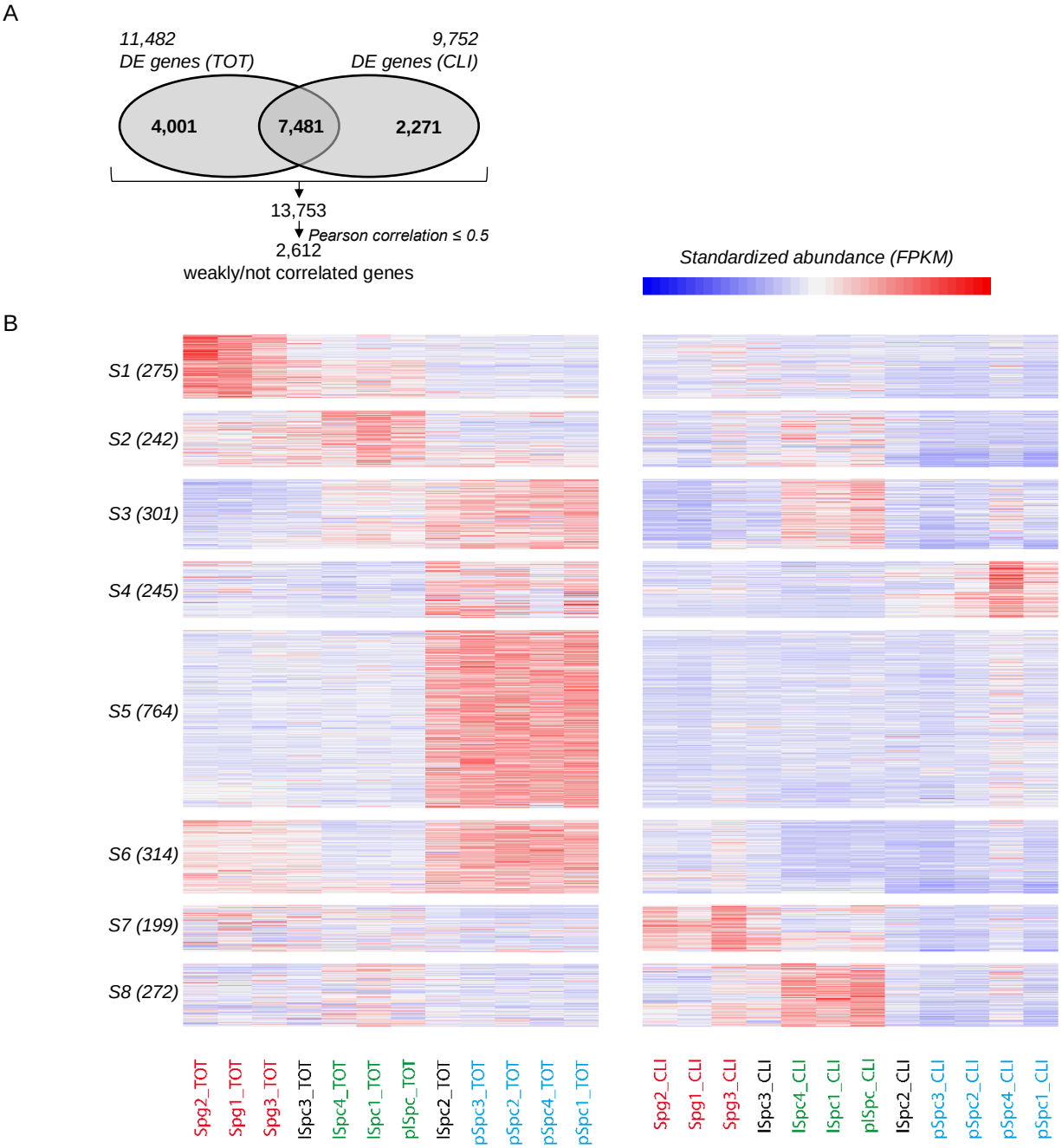


Figure 24: Représentation des gènes ayant un profil P (ARN total) et Q (ARN néotranscrit) NON corrélés. Chaque ligne représente un même gène à gauche (ARN total) et à droite (ARN néo-transcrit). On voit qu'un même gène (situé sur la même ligne) a un profil différent en ARN total et ARN néotranscrit. Nous groupons les gènes en différents profils (profils S, de 1 à 8).



Figure 25: Profils dynamiques de l'expression de gènes de spermatogonies. En bleu, profils obtenus en ARN totaux; en orange profils obtenus en ARN néotranscrits. R1, R2, R3 = groupes auxquels appartiennent les gènes (voir Figure 23). Sg = speramatogonies ; pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène.

III.B.4. Quels types de gènes ?

L'analyse des profils d'expression de gènes connus et représentatifs de chacune des populations (spermatogonies, leptotènes et pachytènes) nous permet de valider l'exactitude de notre séquençage et la pureté de nos populations cellulaires. Nous pouvons observer que les marqueurs des spermatogonies, tels *Zbtb16, Nanos3, Sox4,* sont spécifiquement exprimés dans les spermatogonies (**Figure 25**). Les gènes méiotiques, tels *Smc3, Meiob, Rad21L*, sont exprimés dans les leptotènes (**Figure 26**). D'autres gènes méiotiques, tels *Sycp2* et *Mdc1* sont exprimés en leptotène ainsi qu'en pachytène. Nous retrouvons, dans les pachytènes, la variante d'histone *H1t* et le facteur *Pou5f2* (**Figure 27**). Pour chacun de ces gènes nous traçons et comparons le profil obtenu par le séquençage des ARN totaux et celui obtenu par le séquençage des ARN néotranscrits. Nous observons que la plupart des gènes méiotiques-spécifiques analysés montrent un profil de transcription (ARN néotranscrits) qui correspond à leur profil d'expression (ARN totaux). Ceci est en défaveur d'un phénomène de stabilisation des ARN méiotiques en début de prophase I. Cependant, certains gènes clés de la méiose (*Hormad2*, *Rad51*, *Stag3, Atr*) montrent un profil de néotranscription qui diffère de leur profil d'expression (ARN totaux) (**Figure 28**). Par exemple, *Rad51* montre un pic de transcription en leptotène mais reste exprimé de manière constante ; *Stag3* et *Atr* sont exprimés de plus en plus avec l'avancement vers les stades pachytènes, tandis qu'ils sont majoritairement transcrits en leptotène. Ces différents profils suggéreraient un phénomène de déstabilisation.

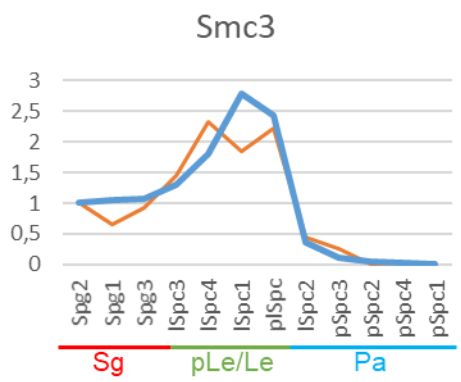
Nous nous sommes ensuite demandé par quelles catégories de gènes sont majoritairement représentés nos différents profils S et R. Pour cela, nous avons déterminé l'ontologie des gènes qui les composent (**Figure 29**). Nous observons que les profils R4 et R5 (gènes néotranscrits et exprimés majoritairement dans les échantillons leptotènes) sont enrichis en gènes méiotiques.

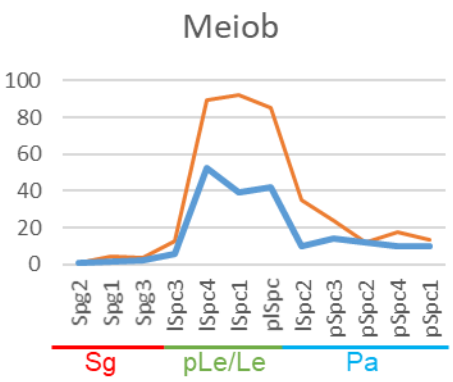
La population R3 correspond aux gènes qui commencent à être néotranscrits et exprimés dans les spermatogonies mais qui augmentent en leptotène. Ceux-ci sont principalement des gènes codant pour des protéines liées à la structure de la chromatine et à la réplication de l'ADN. Ceci est en accord avec la programmation de la phase S préméiotique.

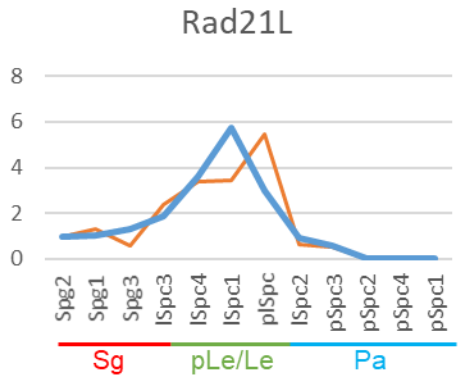
Concernant les profils non-corrélés (profils S), nous remarquons que le profil S2 est enrichi en gènes liés au métabolisme des ARN (mRNA *processing*, *splicing*, RNA export, traduction). Le profil de ces gènes (pic d'expression en leptotène mais faiblement transcrits) suggère que les ARN soient stockés dans les cellules. En S7 nous trouvons les gènes fortement transcrits dans les spermatogonies mais exprimés en ARN total de manière assez homogène dans nos populations cellulaires ; ce profil est enrichi en facteurs de régulation de la transcription associés à l'ARN Polymérase II.

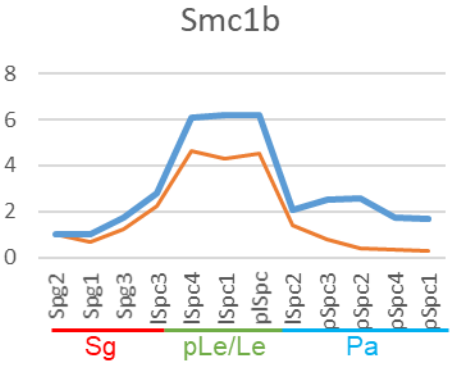
En conclusion, nous caractérisons pour la première fois le paysage de la transcription en début de méiose. Nous voyons que certains gènes ont des profils non corrélés entre néotranscription et ARN totaux qui suggèrent des phénomènes de régulations post-transcriptionnelles sous-jacentes. Le fait que la majorité des gènes méiotiques montre un profil transcriptionnel corrélé à l'abondance des ARN totaux plaide en défaveur d'un mécanisme global de stabilisation. En revanche nous avons identifié des évènements inattendus de déstabilisation (*Hormad2* et *Rad51*).

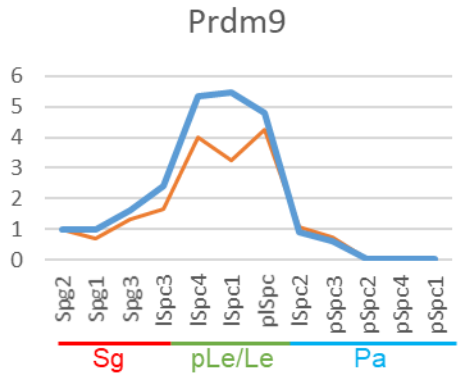
R4

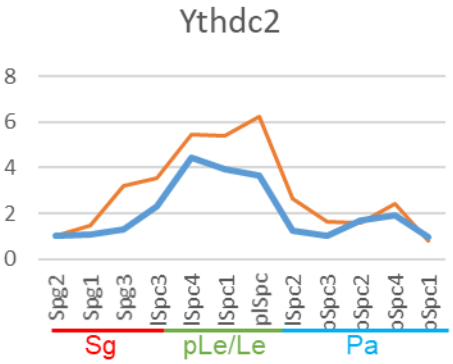

Smc3
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa

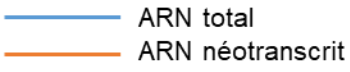

Meiob
100
80
60
40
20
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa


Rad21L
8
6
4
2
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa


Smc1b
8
6
4
2
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa


Prdm9
6
5
4
3
2
1
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa


Ythdc2
8
6
4
2
0
Spg2 Spg1 Spg3 lSpc3 lSpc4 lSpc1 plSpc lSpc2 pSpc3 pSpc2 pSpc4 pSpc1
Sg pLe/Le Pa


ARN total
ARN néotranscrit

R4

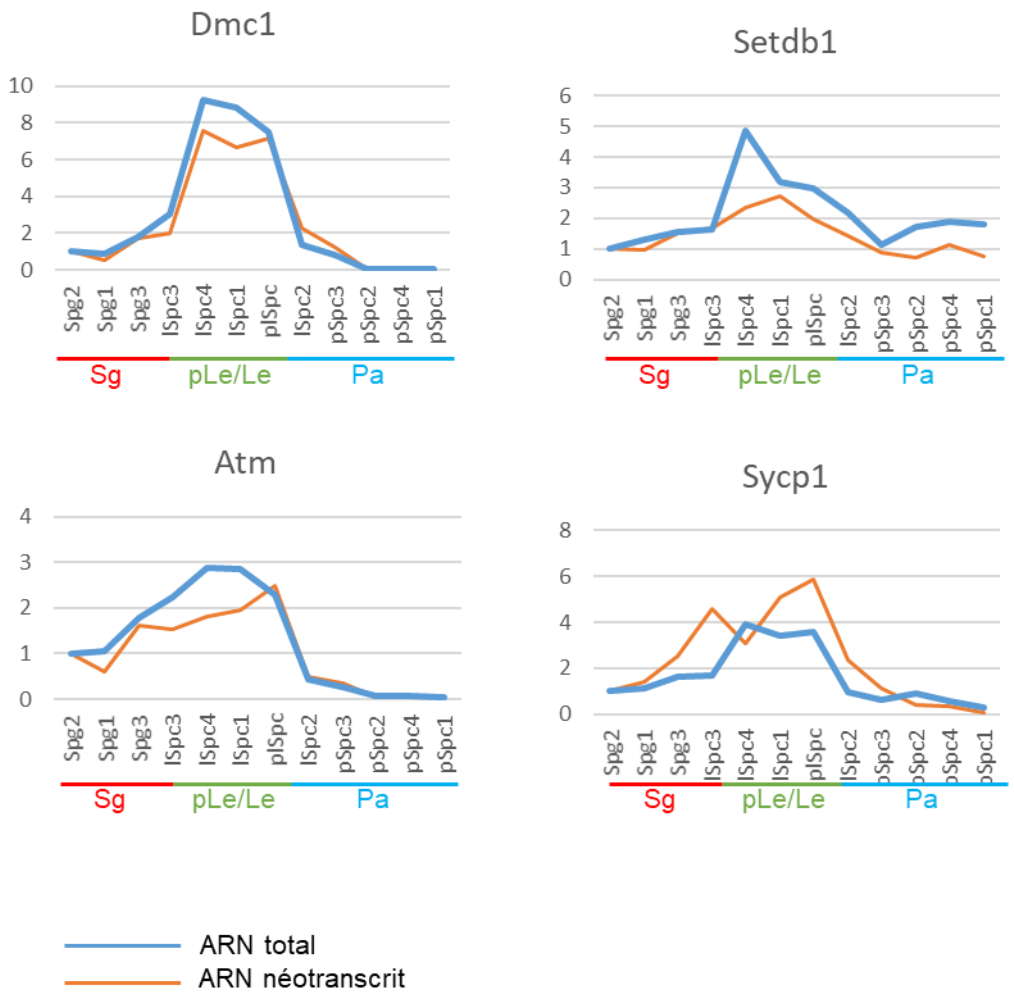


Figure 26: Profils dynamiques de l'expression de gènes exprimés en méiose. En bleu, profils obtenus en ARN total; en orange, profils obtenus en ARN néotranscrits. R4 = groupe auquel appartiennent les gènes (voir Figure 23). Sg = speramatogonies ; pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène.

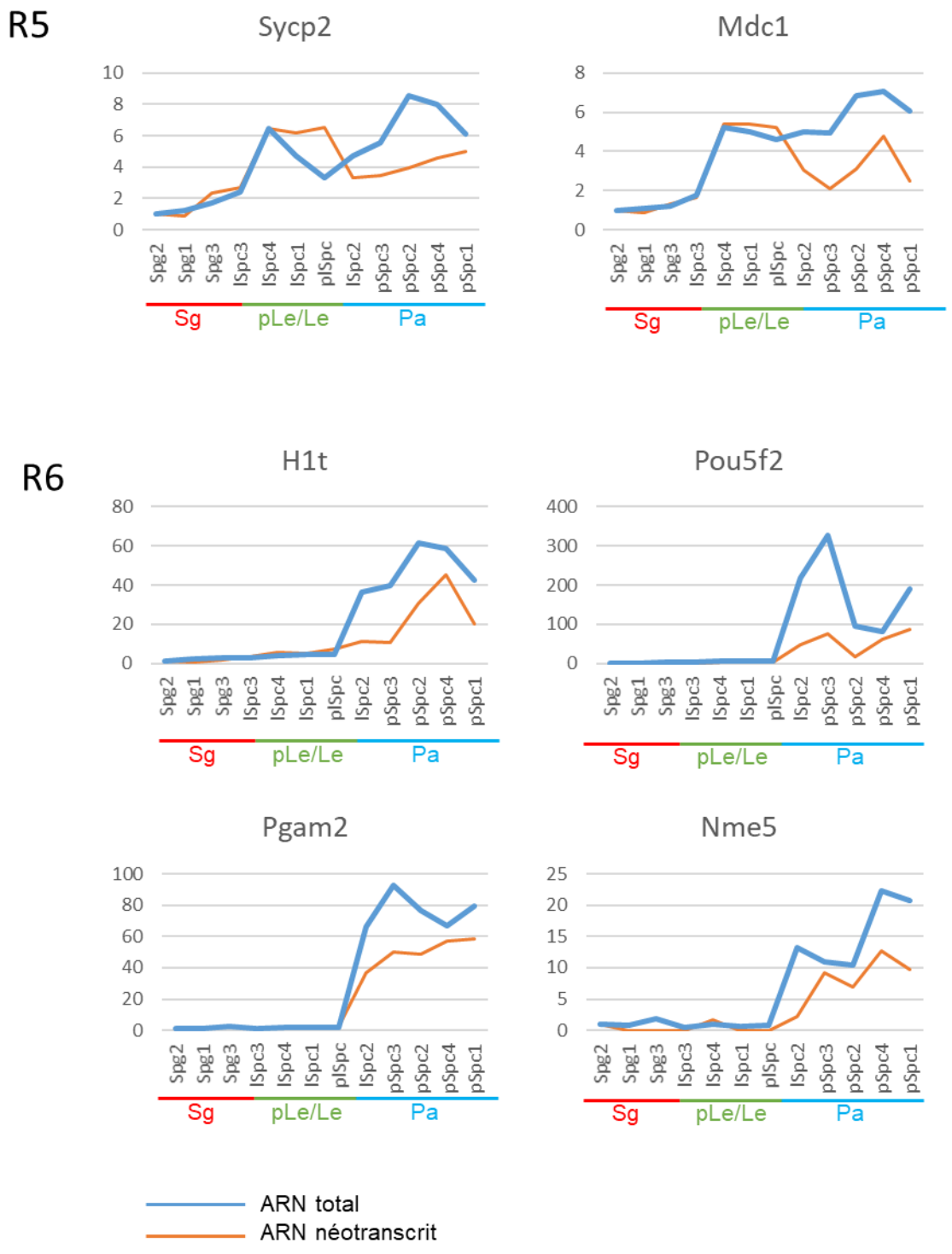


Figure 27: Profils dynamiques de l'expression de gènes méiotiques et post-méiotiques. En bleu, profils obtenus en ARN totaux; en orange profils obtenu en ARN néotranscrits. R5 et R6 = groupes auxquels appartiennent les gènes (voir figure 24). Sg = spermatogonies ; pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène.

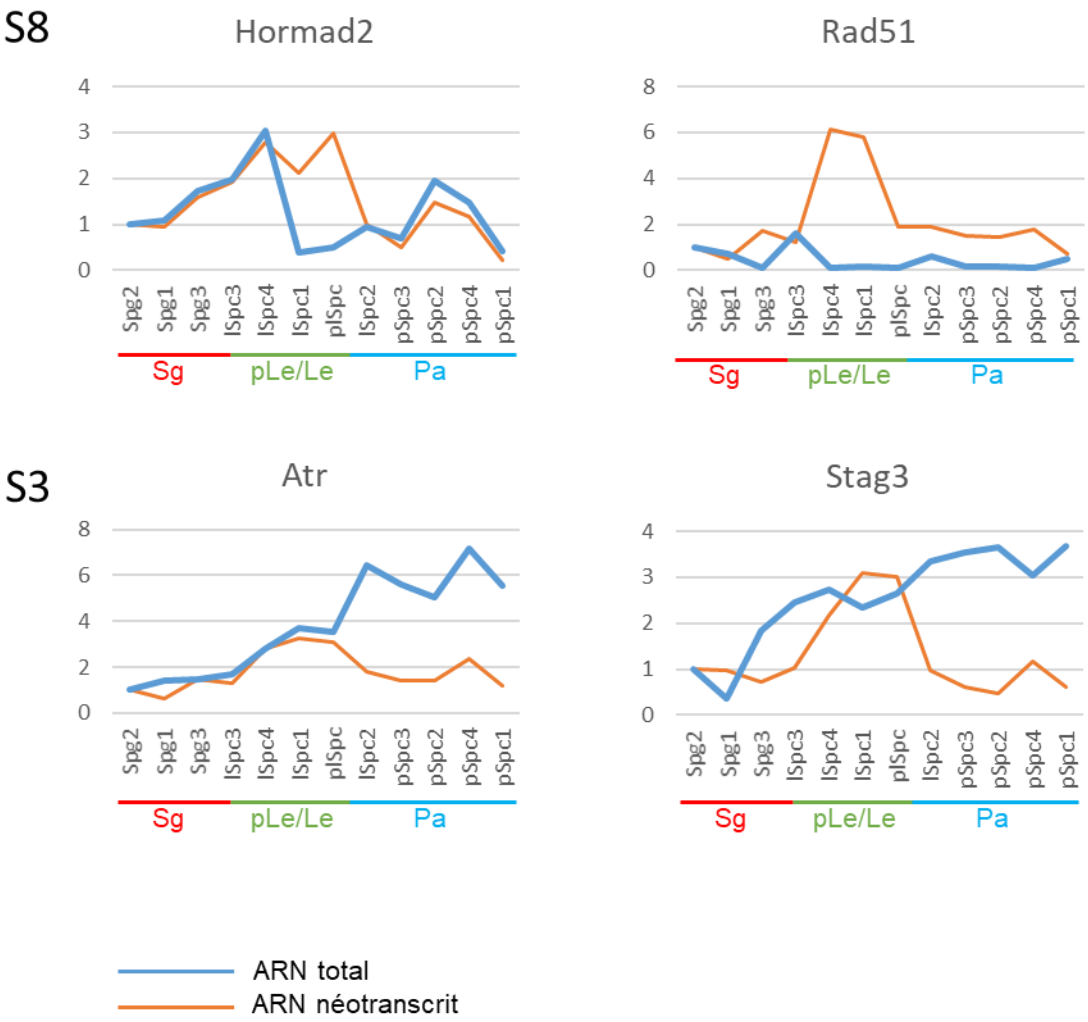


Figure 28: Profils dynamiques de l'expression de gènes qui diffèrent en terme d'expression (ARN total) et transcription (ARN néotranscrit). En bleu, profils obtenus en ARN total; en orange profils obtenus en ARN néotranscrits. S8, S3, S2, S4 = groupes auxquels appartiennent les gènes (voir Figure 24). Sg = spermatogonies ; pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène.

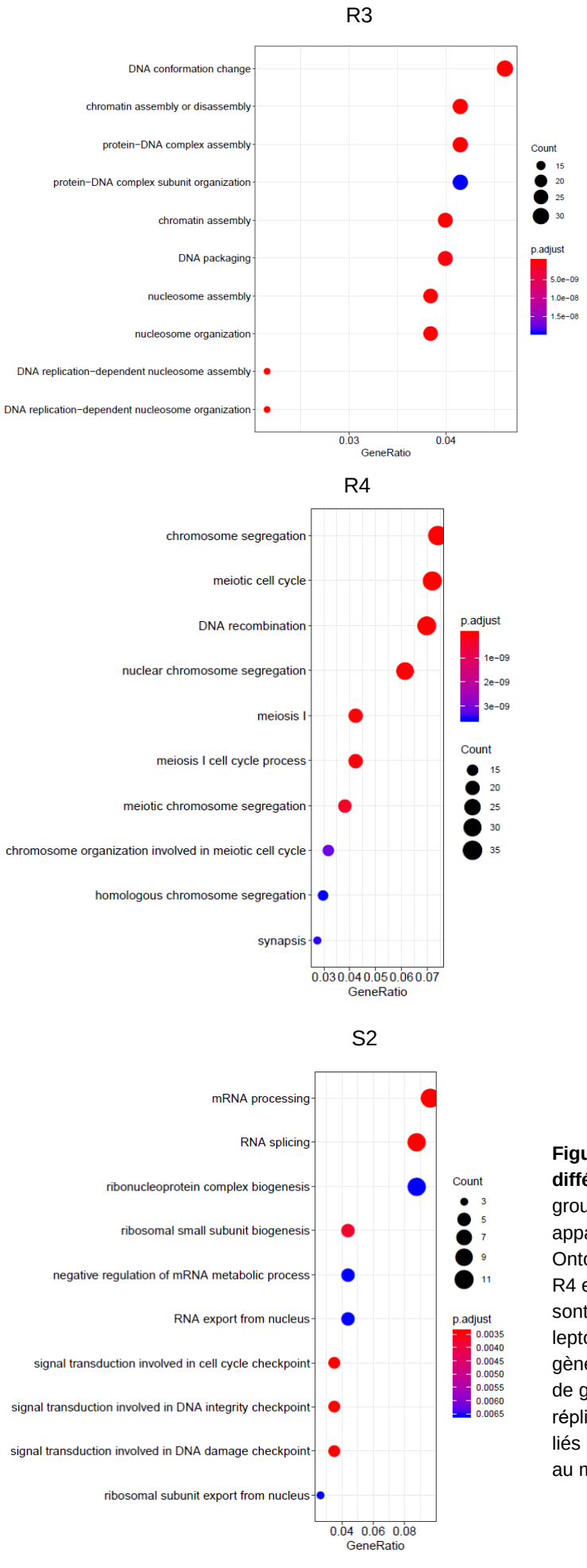


Figure 29: Ontologie des gènes appartenant à différents groupes (R3, R4 et S2). Les différents groupes (R et S) sont enrichis en gènes appartenant à des processus spécifiques. Ontologie des gènes faisant partie des profils R3, R4 et S2 (exemples choisis). Par rappel, R3 et R4 sont les gènes transcrits majoritairement au stade leptotène et la population S2 correspond aux gènes stabilisés en leptotène. En R3 prévalence de gènes liés à la structure chromatinienne et à la réplication de l'ADN; en R4 prévalence de gènes liés à la méiose; en S2 prévalence de gènes liés au métabolisme des ARN.

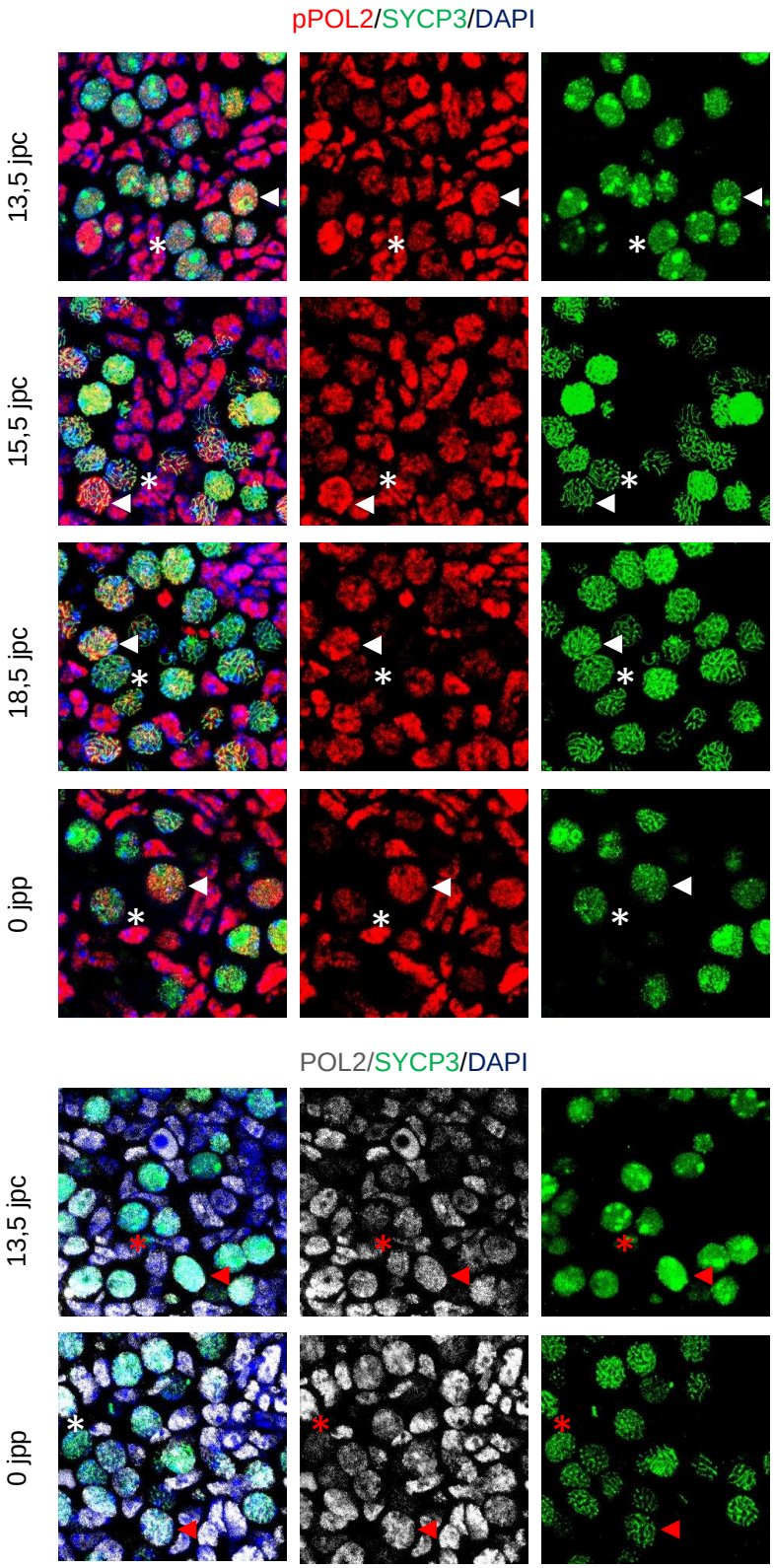


Figure 30: Les cellules germinales femelles sont transcriptionnellement hétérogènes. A) Analyse en immunofluorescence de la pPOL2 (rouge) et SYCP3 (vert) sur des coupes d'ovaires fœtaux à différentes âges (13,5; 15,5; 18,5 jpc et 0 jpp). L'ADN est marqué en bleu (DAPI). À chaque âge, il y a coexistence d'ovocytes faiblement marqués pour la pPOL2 (étoiles blanches) et d'ovocytes fortement marqués (pointes de flèches blanches). **B)** Analyse en immunofluorescence de la POL2 (gris) et SYCP3 (vert) sur des coupes d'ovaires fœtaux à deux âges différents (13,5 et 18,5 jpc). Les ovocytes sont faiblement marqués (étoile rouge) ou fortement marqués (pointe rouge).

III.C. Résultat complémentaire : Analyse de la pPOL2 dans les ovaires fœtaux

Dans l'article, nous avons vu que l'existence du phénomène de *silencing* est moins évidente chez la femelle que chez le mâle. Nous avons approfondi l'analyse de l'expression de la pPOL2 dans les cellules germinales femelles en prophase I, par des immunomarquages sur coupes à différents âges : 13,5, 15,5 et 18,5 jpc et 0 jpp (**Figure 30**). A 13,5 jpc les cellules germinales sont aux stades préleptotène et début-leptotène et commencent à exprimer SYCP3. A 15,5 jpc les ovocytes sont majoritairement en fin de zygotène ou en début de pachytène. A 18,5 jpc les ovocytes sont au stade diplotène et à 0 jpp ils sont bloqués en fin de diplotène/diakinèse. De manière concordante aux résultats obtenus avec les étalements des chromosomes, à chaque âge nous observons que le niveau d'intensité de la pPOL2 varie d'un ovocyte à l'autre. Cette analyse sur coupe nous donne une information en plus par rapport aux étalements : les ovocytes avec un marquage pPOL2 fort ou faible n'appartiennent pas à des clusters différents dans l'ovaire mais, au contraire, deux ovocytes ayant un marquage pPOL2 d'intensité très différente peuvent se trouver côte-à-côte.

Nous avons parallèlement effectué un marquage POL2 total sur des coupes d'ovaires à 13,5 jpc et 0 jpp. Nous observons que, similairement à la pPOL2, le niveau d'intensité de la POL2 varie d'une cellule germinale à l'autre. Ce résultat est préliminaire ; des marquages supplémentaires sont nécessaires pour une validation.

Cette donnée est intrigante car l'on sait que les ovocytes sont reliés par des ponts cytoplasmiques au sein de nids ovigères (Greenbaum, Iwamori, Agno, & Matzuk, 2008). Un groupe d'ovocytes, au sein d'un même syncitium, est très synchrone. Il y aurait donc dans un même groupe des ovocytes fortement et faiblement transcriptionnellement actifs.

Discussions et conclusions

L'Acide Rétinoïque

I.A. Un mot sur le modèle d'électroporation.

Pour exprimer de manière ectopique les CYP26 dans les gonades fœtales, nous avons développé un modèle original : l'électroporation des gonades fœtales. Ceci a permis la création d'un nouveau modèle de « gain-de-fonction » qui permet une approche génétique *ex vivo* complémentaire aux modèles de perte de fonction. Dans l'interprétation de nos résultats il faut tenir compte d'une possible variabilité dans l'efficacité d'électroporation ainsi que du fait qu'uniquement une partie de la gonade est touchée par l'électroporation. Par l'analyse de la RFP au microscope inversé, nous observons qu'entre 20 et 30% de la surface de nos gonades ont incorporé le plasmide. Cependant, l'analyse de la RFP sur coupe montre un faible nombre de cellules RFP-positives (pas quantifié). Il ne faut pas oublier que les CYP26 agissent via le métabolisme de facteurs diffusibles et que dans le testicule fœtal CYP26B1 agit sur les cellules germinales malgré son expression spécifique au sein des cellules de Sertoli. Ainsi, l'électroporation de notre plasmide dans une cellule n'empêche pas que celui-ci puisse agir sur plusieurs cellules voisines. Cette hypothèse est renforcée par notre analyse des effets de la transfection de *Cyp26b1* ou *Cyp26a1,* dans les cellules HEK 293, sur l'expression de *Rarb2*, gène cible de l'AR. Après culture des cellules en présence d'AR, nous purifions, à partir d'une même plaque de cellules transfectées, les cellules exprimant le plasmide et les cellules ne l'exprimant pas. Nous observons que CYP26B1 et CYP26A1 diminuent l'expression de *Rarb2* dans les cellules exprimant les plasmides ainsi que dans les cellules voisines n'exprimant pas le plasmide. Une façon de compléter notre démonstration et de s'assurer que l'effet observé sur STRA8 soit bien dû à l'activité de CYP26B1, serait d'électroporer un plasmide codant pour l'enzyme CYP26B1 muté au niveau du site catalytique. Enfin, dans le cadre de l'étude du rôle de l'AR endogène, le développement d'une approche transgénique sera important: l'invalidation simultanée des trois enzymes de biosynthèse de l'AR (RALDH) ou des trois récepteurs RAR. Le développement de ces modèles transgéniques est lourd à cause I) de la nécessité d'invalider simultanément trois gènes et II) du rôle indispensable de la voie de signalisation de l'AR dans le développement embryonnaire.

La méthode d'électroporation que nous avons développée, représente une voie alternative et rapide pour surexprimer un gène. Elle pourrait être facilement exploitée pour une première approche rapide, avant le développement ultérieur de modèles transgéniques. Notons que des modèles d'électroporation de testicules murins postnataux et adultes sont de plus en plus utilisés (Shibuya, Morimoto, & Watanabe, 2014; Q. Zhang, Ji, Busayavalasa, & Yu, 2019)**.** En outre, Svingen et al. ont développé une méthode de magnétofection *ex vivo* sur des gonades fœtales de 11,5 jpc pour exprimer des shRNA et étudier ainsi la fonction de gènes candidats (Svingen et al., 2009). La même équipe (P. Koopmann) a également publié un travail basé sur un protocole d'injection intracardiaque de morpholinos dans des embryons à 11,5 jpc (McClelland, Wainwright, Bowles, & Koopman, 2015). L'objectif de l'ensemble de ces travaux est le même : une étude préliminaire rapide de la fonction d'un gène candidat. Parmi tous ces modèles, notre approche « gain de fonction » demeure originale bien que nous n'ayons démontré son efficacité que dans le cadre de molécules dotées d'une activité enzymatique.

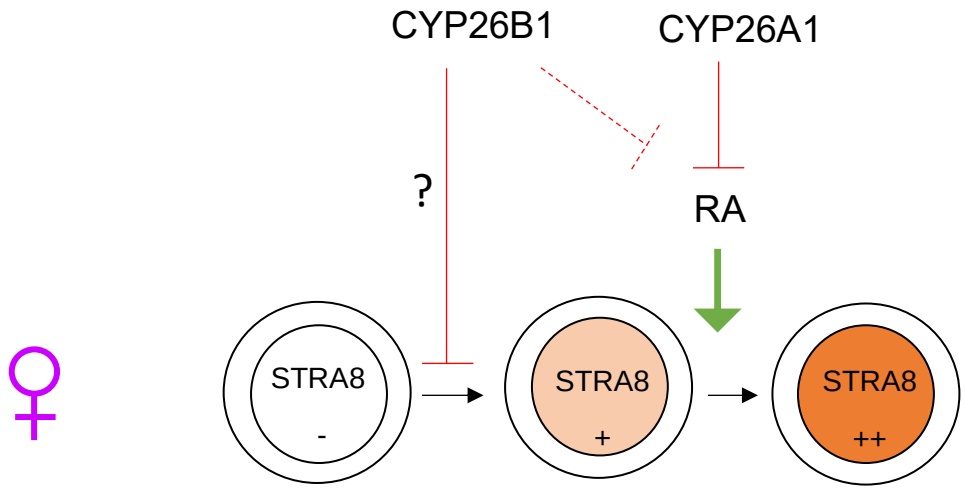


Figure 1. Modèle proposé pour expliquer les effets de l'électroporation de CYP26B1 ou CYP26A1 dans les ovaires fœtaux murins. CYP26B1 inhibe l'induction initiale de STRA8 via un mécanisme inconnu (?). CYP26A1 inhibe l'amplification secondaire mais pas l'induction de STRA8.

I.B. Quelle place pour l'acide rétinoïque dans l'induction méiotique?

La discussion autour du rôle central de l'AR dans l'induction de *Stra8* en vie fœtale et, ainsi, de la méiose, est complexe. En effet, on retrouve dans la littérature des données contradictoires sur la place occupée par l'AR dans l'activation de STRA8 dans l'ovaire fœtal. Dans l'article sur l'AR, nous relançons le débat sur I) le rôle de l'**AR endogène** dans l'induction de **STRA8** dans l'ovaire fœtal et sur II) le rôle de **CYP26B1** dans le métabolisme de l'AR dans le testicule fœtal. Le rôle clé de CYP26B1 dans l'inhibition de STRA8 a été clairement démontré dans des modèles transgéniques (souris *Cyp26b1-/-*); cependant, il n'y a pas de preuves formelles que son action sur *Stra8* passe par la dégradation de l'AR.

Ici, nous développons un modèle original permettant pour la première fois d'étudier l'effet de l'AR endogène (ou plus précisément de sa dégradation) sur l'induction de *Stra8.* Dans ce modèle, nous comparons les effets d'une expression ectopique, dans l'ovaire fœtal, des deux cytochromes P450: CYP26B1 et CYP26A1. Notre proposition de départ était que, si CYP26B1 dégrade l'AR comme CYP26A1, l'expression ectopique de l'un ou de l'autre cytochrome conduirait au même résultat final. Cependant, nous observons que, en exprimant CYP26B1 ou CYP26A1, nous n'obtenons pas le même effet sur STRA8. En effet, CYP26B1, mais pas CYP26A1, diminue le nombre de cellules germinales DDX4-positives/STRA8-positives dans l'ovaire électroporé. Ce résultat suggère que l'inhibition de STRA8 par CYP26B1 soit indépendante de la voie de dégradation de l'AR. À l'heure actuelle, le seul substrat connu pour les deux cytochromes est l'AR et aucun autre métabolite spécifique de l'une ou de l'autre enzyme n'a été identifié. Cependant, ces deux enzymes présentent une homologie partielle (43% d'homologie) (MacLean et al., 2001; White et al., 2000) et CYP26A1 a une activité catalytique de dégradation de l'AR supérieure à celle de CYP26B1 (jusqu'à 10 fois) (Topletz et al., 2013). Notre hypothèse que CYP26B1 pourrait métaboliser également une molécule différente de l'AR est, en outre, appuyée par une étude identifiant des inhibiteurs spécifiques de CYP26B1 ou de CYP26A1 (Foti, Diaz, & Douguet, 2016). Les sites actifs de ces deux cytochromes ne sont donc pas identiques, ce qui appuie l'existence de ligands spécifiques à l'une ou à l'autre enzyme. L'identification d'un métabolite spécifique à CYP26B1 serait possible par des études métabolomiques. Il serait en effet envisageable de transfecter une lignée cellulaire (HEK 293) avec des plasmides codants pour la GFP, CYP26B1 ou CYP26A1 et de cultiver les cellules en présence de lysats testiculaires fœtaux (13,5 jpc). Ensuite, l'analyse du métabolome permettrait d'identifier un éventuel métabolite, présent dans les testicules fœtaux, spécifique à CYP26B1.

Dans notre modèle, CYP26B1 et CYP26A1 réduisent de manière similaire le niveau de l'ARN de *Stra8* dans les ovaires fœtaux. En présence de CYP26A1 les cellules germinales sont donc STRA8-positives mais elles expriment *Stra8* à un niveau plus faible. Nous concluons ainsi que CYP26A1 inhibe l'expression de *Stra8* en aval de son induction primaire. De manière intéressante, nous avons vérifié pour nous-mêmes que CYP26B1 est effectivement capable de métaboliser l'AR (cellules HEK293). Cependant, si on rapporte l'expression de l'ARNm de *Stra8* au nombre de cellules STRA8-positives, il n'y a pas une forte diminution du taux d'ARNm de *Stra8* par cellule germinale. Il semble donc que CYP26B1 diminue faiblement la transcription de *Stra8*, ce qui pourrait être en accord avec sa moindre activité de dégradation de l'AR par rapport à CYP26A1.

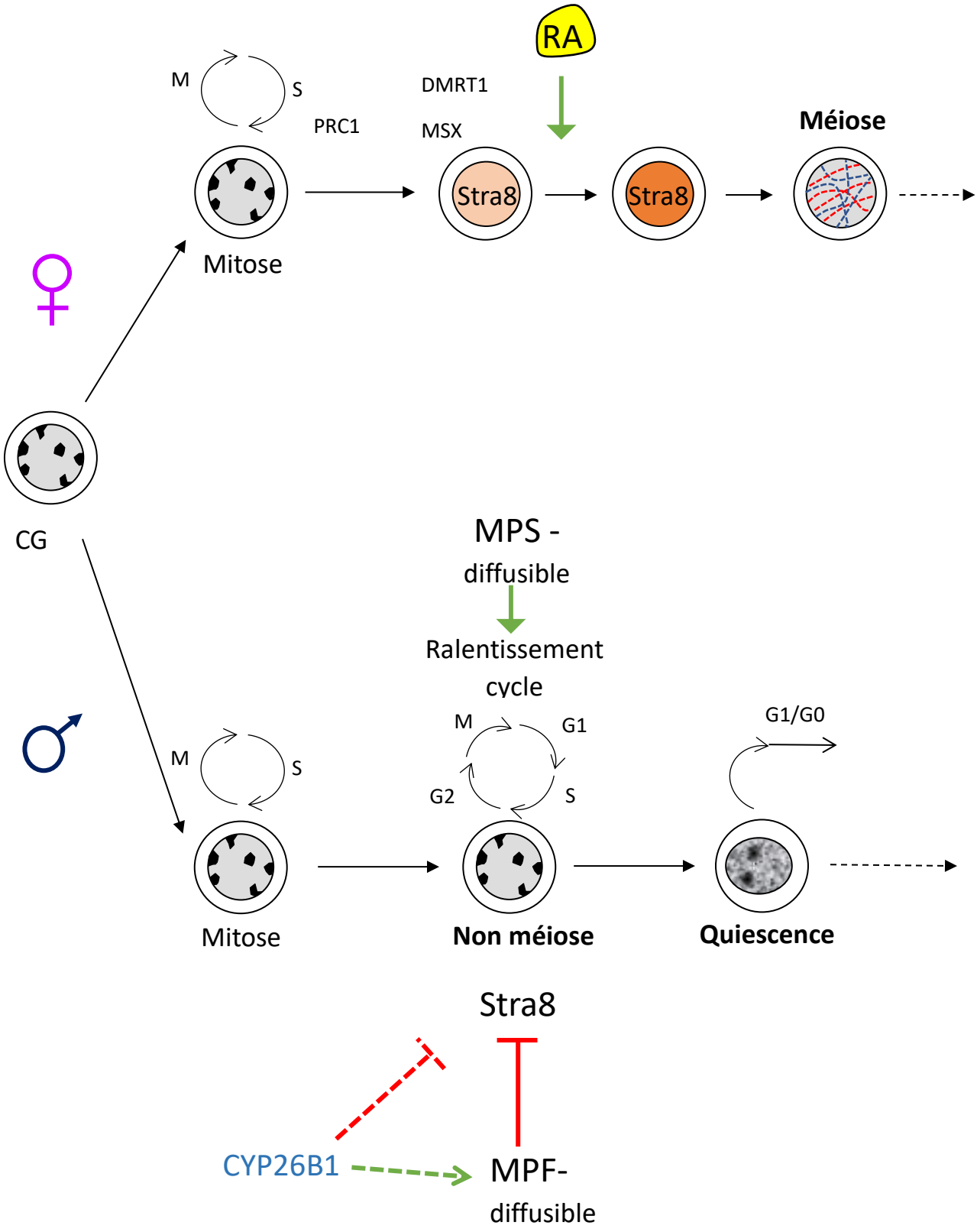


Figure 2. Schéma proposé pour la régulation dichotomique de l'entrée en méiose (ovaire) et l'entrée en quiescence (testicule) en vie fœtale. CG= Cellule Germinale ; RA = Rétinoïque Acide ; MPS = Mitotic Preventing Substance ; MPF = Meiotic Preventif Factor. En vert, régulations positives ; en rouge, régulations négatives ; en pointillés : régulations hypothétiques.

Dans le schéma en **Figure 1** je résume les conclusions obtenues par l'analyse de l'expression de Stra8 (ARN et protéine) dans les ovaires électroporés avec *Cyp26b1* ou *Cyp26a1*. CYP26B1 inhibe l'activation initiale de Stra8. Nous plaçons donc CYP26B1 en amont de l'induction primaire de Stra8. Différemment, CYP26A1 induit une baisse du niveau d'expression de *Stra8* sans diminuer le pourcentage de cellules germinales STRA8-positives. CYP26A1 inhibe donc l'expression de Stra8 suite à son induction primaire.

Nous proposons donc que l'AR soit impliqué dans l'amplification secondaire de *Stra8* mais que l'activation primaire de *Stra8* soit indépendante de l'AR. Les résultats complémentaires que nous avons obtenus *in vitro* renforcent cette hypothèse: nous montrons que le traitement à court terme (6 h) d'ovaires fœtaux avec un agoniste inverse des trois RAR (BMS) ne prévient pas l'expression de *Stra8*. L'inhibition de *Stra8* est visible uniquement au bout de 24 h de culture. Ceci suggère que l'effet de l'AR sur l'expression de *Stra8* soit secondaire ou indirect et est en faveur d'un rôle de l'AR dans l'amplification de *Stra8* (baisse de *Stra8* après 24 h) et pas dans son induction (expression normale de *Stra8* après 6 h).

I.C. Questionnement autour du rôle de CYP26B1

Le rôle de CYP26B1 en tant que facteur **nécessaire** à la prévention de la méiose dans le testicule fœtal constitue une certitude. En effet, les cellules germinales expriment STRA8 et entrent en méiose dans les testicules fœtaux *Cyp26b1* -/-. Nous montrons ici pour la première fois que CYP26B1 est aussi **suffisant** pour prévenir l'expression de Stra8 (ARN et protéine) dans l'ovaire fœtal.

De manière intéressante, dans notre modèle, la prolifération des cellules germinales ovariennes ne diminue pas. Cette observation suggère que les cellules germinales qui n'ont pas initié la méiose (DDX4-positives/STRA8-négatives) soient maintenues dans un état prolifératif et qu'elles ne se soient donc pas engagées vers un destin mâle (quiescence). Cette observation est très intéressante et ouvre la discussion sur un autre aspect: la concomitance de deux évènements clés dans les cellules germinales mâles: I) l'inhibition de la méiose et II) le ralentissement de l'activité prolifératives aboutissant à l'entrée en quiescence. Ces deux évènements sont fortement reliés et difficiles à séparer: dans les testicules fœtaux murins les cellules germinales **n'initient pas** la méiose et elles entrent en **quiescence** de façon simultanée*. Est-ce que la méiose est inhibée par l'entrée en quiescence? Ou plutôt, est-ce qu'un signal d'inhibition de la méiose précède un deuxième signal induisant la quiescence? Ou est-ce que le ralentissement de l'activité prolifératives n'est qu'un moyen pour donner le temps à un signal inhibiteur de la méiose d'agir?*

Ici, nous montrons que l'expression ectopique des CYP26 diminue Stra8 sans induire la quiescence (pas de diminution du pourcentage des cellules Ki67-positives). Cela signifie que ces deux évènements, inhibition de la méiose et induction de la quiescence, sont indépendants et séparables. Cette conclusion est appuyée par le fait que, dans les mutants *Stra8 -/-,* les cellules germinales femelles n'initient pas la méiose, sans pour autant entrer en quiescence (Baltus et al., 2006).

Dans des expériences de coculture d'un ovaire fœtal en présence d'un testicule fœtal, les cellules germinales ovariennes n'entrent pas en méiose et, en plus, elles arrêtent le cycle cellulaire en entrant en quiescence (Guerquin et al., 2010). Le même résultat est obtenu en cultivant un ovaire fœtal en présence d'un milieu

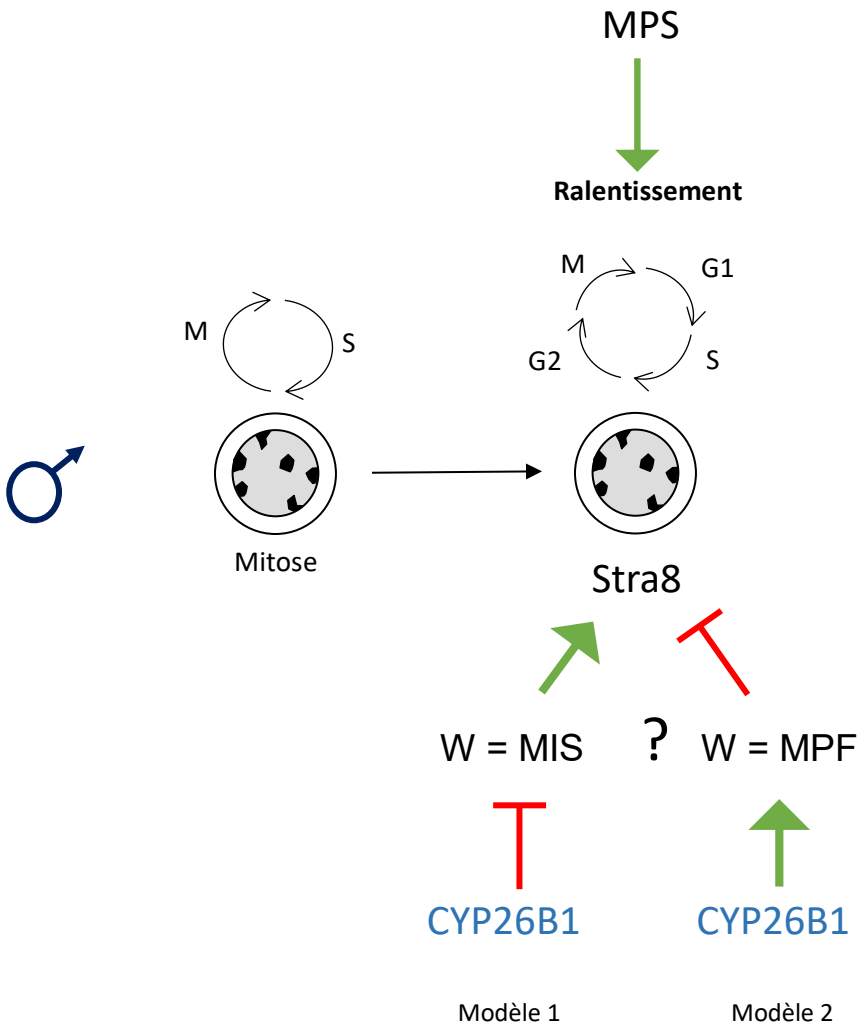


Figure 3. Deux modèles possibles sur le rôle de CYP26B1 dans le testicule fœtal. Modèle 1: CYP26B1 dégraderait un facteur W qui agirait en tant que *Meiotic Inducing Substance* (MIS). Modèle 2: CYP26B1 activerait un facteur W inconnu que nous proposons être le MPF (*Meiotic preventing Factor*). Un autre facteur (MPS) indépendant de CYP26B1 agirait sur le ralentissement du cycle cellulaire et l'entrée en quiescence.

conditionné testiculaire. En revanche, différentes populations somatiques purifiées du testicule n'ont pas toutes la faculté d'induire la quiescence de CG, malgré leur capacité commune à prévenir la méiose. En outre, Best et al. montrent que l'inhibition de toute activité sécrétrice testiculaire induit la méiose des cellules germinales mâles (Best et al., 2008).

Dans l'ensemble, ces expériences prouvent que les activités « prévention de la méiose » et « arrêt du cycle cellulaire » peuvent être séparées et donc contrôlées par des facteurs distincts. Ainsi, le *Meiotic Preventing Factor* (MPF) doit être I) un **facteur secrété et diffusible,** II) capable d'inhiber la **méiose** sans activer **la quiescence**. En outre, nous remettons en question la place de CYP26B1 en tant que MPF: malgré sa capacité de prévenir la méiose, CYP26B1 est un cytochrome et **n'est donc pas un facteur diffusible**. CYP26B1 pourrait être cependant l'activateur du MPF diffusible, ce qui expliquerait pourquoi CYP26B1 est suffisant à prévenir la méiose sans être le MPF! Nous cherchons donc I) un *Meiotic Preventing Factor* (MPF) ainsi que II) une *Mitotic Preventing Substance* (MPS). Un schéma est présenté en **Figure 2**.

Dans l'ensemble, nous concluons donc que CYP26B1 est nécessaire et suffisant à inhiber STRA8 mais pas à induire la quiescence. En outre, CYP26B1 ne peut pas être le MPF diffusible ; ce dernier reste donc encore à identifier, ainsi que le MPS.

I.D. Notre modèle dans un contexte physiologique

Notre modèle d'électroporation a permis de proposer un rôle alternatif de l'AR dans l'amplification de l'expression de *Stra8* dans les ovaires fœtaux murins. Dans le testicule fœtal, CYP26B1 agirait donc sur un facteur inconnu, que nous dénommons facteur « W », qui reste actuellement à identifier. Deux options, schématisées en **Figure 3**, sont envisageables. Modèle 1) Le facteur W est exprimé à la fois dans l'ovaire et testicule fœtaux. Dans l'ovaire fœtal le facteur W induit la méiose, et CYP26B1 dégrade le facteur W. Ce modèle ressemble au modèle actuel de l'AR. Modèle 2) Dans ce deuxième modèle, le facteur W produit par CYP26B1 correspond au facteur testiculaire diffusible qui prévient la méiose, le MPF. Dans ce modèle, CYP26B1 produirait le facteur diffusible W qui inhiberait l'induction de *Stra8.* En absence de CYP26B1, et donc de W, dans l'ovaire fœtal, *Stra8* est activé et par la suite amplifié (entre outre par l'AR). Dans ce modèle, l'activation initiale de *Stra8* pourrait être un évènement autonome dans les CG; en effet, plusieurs facteurs intrinsèques aux cellules germinales capables de réguler l'expression de *Stra8* ont déjà été identifiés : *PRC1* et PRC2, MSX1 et MSX2, DMRT1 (voir introduction, chapitre I.B.3. *Régulateurs intrinsèques de l'entrée en méiose*). Ce deuxième modèle permet de réconcilier plusieurs aspects. Il permettrait d'expliquer pourquoi CYP26B1 est suffisant sans pour autant être le facteur diffusible, et pourquoi les cellules germinales peuvent entrer en méiose spontanément si elles sont sorties de leur contexte gonadique.

I.E. Rôle de l'AR sur les cellules somatiques

Notre article met en évidence un rôle de l'AR exogène et endogène sur les cellules somatiques testiculaires en vie fœtale. Nous montrons I) un effet sur la prolifération des cellules de Sertoli et II) un effet sur la production de testostérone par les cellules de Leydig.

Nous montrons qu'un ajout d'AR inhibe la prolifération des cellules de Sertoli. Cet effet passe par RARalpha; en effet, aucune diminution de prolifération des cellules de Sertoli n'est observée à la suite du traitement avec de l'AR exogène dans des souris *Rara -/-*. Ceci est plutôt logique vis-à-vis de notre observation à partir de cellules isolées, puisque RARalpha est le seul récepteur RAR exprimé dans les cellules de Sertoli en vie fœtale.

La baisse de prolifération des cellules de Sertoli est retrouvée en inhibant les trois enzymes CYP26, ce qui assure une augmentation du niveau d'AR endogène dans les testicules fœtaux. Pourtant, l'invalidation de CYP26B1 ne mime pas cet effet, ce qui démontre encore une fois une séparation entre la voie de CYP26B1 et la voie de l'AR

Un effet de l'AR exogène sur les cellules de Sertoli avait déjà été observé dans des testicules fœtaux humains: la culture de testicules fœtaux humains en présence d'AR diminue le niveau d'expression d'AMH (Jørgensen, Nielsen, Perlman, Lundvall, Mitchell, Juul, & Meyts, 2015). En sachant que les cellules de Sertoli jouent un rôle fondamental dans le maintien de la structure testiculaire et dans le soutien des cellules germinales, une baisse de leur prolifération et de leur nombre expliquerait pourquoi l'AR induit une déstructuration du testicule.

Nous démontrons que l'effet sur la stéroïdogenèse passe par le récepteur RARalpha (souris *Rara -/-*), bien que les trois RAR soient exprimés dans les cellules de Leydig. Il est donc envisageable que l'effet de l'AR sur les cellules de Leydig soit indirect et qu'il passe par les cellules de Sertoli. Un effet de l'AR sur la stéroïdogenèse avait aussi déjà été montré chez le rat et l'homme. Cependant, chez le rat l'AR inhibe la sécrétion de testostérone plutôt que l'augmenter comme chez la souris ((Livera, Rouiller-Fabre, Durand, & Habert, 2000) et nos résultats). Lambrot et al. montrent un effet positif du traitement de l'AR sur la stéroïdogenèse chez l'homme (Lambrot et al., 2006).

I.F. Est-ce que notre modèle trouve sa place dans la littérature ?

Tout d'abord, il est important de rétablir la création du modèle actuel sur la régulation dichotomique de l'entrée en méiose par la voie de l'AR. En 2006, deux modèles transgéniques murins ont mis en évidence, de manière concomitante, I) le rôle de *Stra8* en tant que "gardien" de l'entrée en méiose et II) le rôle de l'enzyme CYP26B1 comme "facteur prévenant la méiose" (MPF, *Meiotic Preventing Factor*). Ces deux facteurs, STRA8 et CYP26B1, font partie de la voie de signalisation de l'AR, en tant que gènes cibles (*Stra8* et *Cyp26b1*) et en tant qu'enzyme de dégradation (CYP26B1). À cela se rajoute le fait qu'une activité de l'AR (RARE-LacZ) est détectée en vie fœtale dans le mésonéphros adjacent aux gonades ainsi que, dans une moindre mesure, dans l'ovaire fœtal murin. Un modèle a donc été extrapolé: l'AR, synthétisé principalement par le mésonéphros, induirait l'expression de *Stra8* dans les CG femelles pré-méiotiques, tandis que CYP26B1, exprimé dans les

cellules de Sertoli, dégraderait l'AR dans les testicules fœtaux en prévenant ainsi l'induction de *Stra8* dans les CG testiculaires.

Le modèle actuel a été donc conçu malgré l'absence de preuves, *in vivo,* du rôle de l'AR endogène dans l'induction de *Stra8.* De nombreuses études ont ensuite montré que l'inhibition de la voie de signalisation de l'AR (inhibition des enzymes de biosynthèse RALDH ou des récepteurs RAR), prévient l'expression de *Stra8* dans des ovaires fœtaux. Similairement, l'ajout d'AR exogène ou l'activation de ses récepteurs par des agonistes, induit *Stra8* et l'entrée en méiose dans des testicules fœtaux. Cependant, l'ensemble de ces démonstrations se basent sur des modèles *in vitro* de culture organotypique. L'utilisation d'AR exogène ou d'agonistes/antagonistes pourraient exercer des actions non-spécifiques. De manière simple nous pouvons envisager que ces molécules saturent l'activité catalytique de CYP26B1 (en empêchant ainsi de jouer un rôle physiologique vis-à-vis de W). Par ailleurs, il a été montré qu'un antagoniste du récepteur RARalpha peut induire de manière aspécifique le récepteur PPARg (Schupp, Curtin, & Kim, 2007). En outre, la modification du système physiologique par la culture *in vitro* et l'ajout de composés chimiques pourrait forcer des effets non-physiologiques de l'AR sur *Stra8* sans pour autant signifier que l'AR endogène soit l'inducteur majeur de *Stra8*. En effet, le fait que *Stra8* soit un gène cible de l'AR a été prouvé ; il se peut donc que la modification de la voie de signalisation de l'AR induise des effets sur le niveau d'expression de *Stra8*. Cependant, cela ne prouve pas que, *in vivo*, l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose soient dépendants de l'AR. Par exemple, la culture de testicules fœtaux en elle-même pourrait lever le blocage initial de Stra8 en diluant un potentiel MPF sécrété ce qui faciliterait une action de l'AR *in vitro.*

Dans plusieurs études, le rôle de l'AR a été relié à une augmentation de l'apoptose plutôt qu'à une induction de la méiose. La culture de testicules fœtaux de rats en présence d'AR induit l'apoptose des CG résultant en une réduction de leur nombre (Li & Kim, 2004; Livera, Rouiller-Fabre, Durand, et al., 2000). De manière similaire, la culture de testicules fœtaux humains en présence d'AR a comme conséquence une altération du développement testiculaire et une réduction du nombre de CG, plutôt qu'un effet sur l'induction de la méiose (Jørgensen, Nielsen, Perlman, Lundvall, Mitchell, Juul, & Rajpert-De Meyts, 2015; Lambrot et al., 2006). En plus de son action sur l'apoptose, l'AR a un effet sur la prolifération des CG. Plusieurs auteurs ont, en effet, montré une augmentation des CG prolifératives, BrdU-positives ou Ki67-positives, dans des testicules fœtaux traités à l'AR chez la souris et le rat (Livera, Rouiller-Fabre, Durand, et al., 2000; Trautmann et al., 2008). En outre, une augmentation de l'activité mitotique est observée dans des CG XY murines isolées à 11,5 ou 13,5 jpc et cultivées 48 h (Koshimizu, Watanabe, & Nakatsuji, 1995). Une augmentation de la prolifération des CG a été décrite aussi dans des ovaires traités à l'AR, chez homme (Jørgensen, Nielsen, Perlman, Lundvall, Mitchell, Juul, & Rajpert-De Meyts, 2015; Lambrot et al., 2006; Le Bouffant et al., 2010) et la souris (Morita & Tilly, 1999). Dans les ovaires fœtaux, le traitement avec l'AR exogène est corrélé aussi à une accélération de la progression méiotique chez l'homme (Jørgensen, Nielsen, Perlman, Lundvall, Mitchell, Juul, & Rajpert-De Meyts, 2015; Le Bouffant et al., 2010) et le rat (Livera, Rouiller-Fabre, Valla, & Habert, 2000). Donc, en analysant la littérature, le traitement des gonades fœtales avec de l'AR exogène n'a pas un effet spécifique et unique sur l'induction de la méiose mais semblerait agir à différents niveaux avec des effets pro-prolifératifs et pro-apoptotiques qui prévalent. On pourrait envisager que l'effet mitotique de l'AR (retrouvé sur tous types de CG) empêche le ralentissement du cycle cellulaire des CG mâles en favorisant ainsi leur échappement à un signal inhibiteur de la méiose (MPF/W). L'AR n'aurait donc pas un effet de substance inductrice de la

méiose (MIS) mais plutôt d'une substance pro-prolifération qui induit comme effet indirect l'entrée en méiose dans les cultures testiculaires. Par ailleurs*, a priori*, il n'y a pas de raison qu'une substance inductrice de la méiose induise la mort des CG mâles fœtales ; la présence d'ovocytes dans des cordons est en effet possible (McLaren, 1980). *Donc pourquoi un traitement à l'AR serait-il fatal?* Il serait envisageable que l'induction de la méiose par l'AR soit « aberrante » et qu'elle résulte donc résulte dans la mort des CG car l'AR ne constitue pas le bon levier physiologique de l'entrée en méiose!

I.G. Conclusions

En conclusion, l'AR agit à différents niveaux dans les gonades fœtales, sur les cellules germinales ainsi que somatiques, et a des effets très divers: sécrétion, apoptose, prolifération, méiose. Nous identifions des nouveaux rôles de l'AR sur la sécrétion de testostérone et sur la prolifération des cellules de Sertoli dans le modèle murin. En outre, nous proposons un rôle secondaire à l'AR endogène dans l'amplification de *Stra8* plutôt que dans son induction. Ainsi, l'induction initiale de *Stra8* pourrait dépendre d'une orchestration de signaux extrinsèques et intrinsèques plutôt que d'un seul facteur extrinsèque (AR), comme proposé jusqu'à maintenant. Cette hypothèse ne deviendra valide que lorsqu'un nouveau MPF aura été identifié.

II. Transition mitose/méiose: STRA8, MEIOC et YTHDC2

II.A. Comparaison de trois mutants : Stra8 -/-, Meioc -/- et Ythdc2 -/-

Une partie de mes résultats de thèse consiste dans l'analyse phénotypique de trois mutants impliqués dans la transition mitose/méiose: *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-.* Les connaissances actuelles démontrent un rôle de STRA8 en tant que facteur transcriptionnel et un rôle du complexe MEIOC/YTHDC2 au niveau post-transcriptionnel. Malgré cette implication à deux différents niveaux de régulation de la vie des ARN, nous notons que la ressemblance phénotypique de ces mutants est marquante: une diminution des cellules initiant la méiose, un blocage très précoce en prophase I, la présence de métaphases anormales. Ceci suggère donc un lien direct entre la régulation transcriptionnelle par STRA8 et la régulation post-transcriptionnelle par MEIOC/YTHDC2. Une comparaison des gènes régulés par STRA8 avec les transcrits régulés par YTHDC2/MEIOC permettrait de mettre en évidence leur éventuelle correspondance. Cette comparaison est faisable grâce aux données transcriptomiques publiées par différentes équipes. Kojima et al. ont récemment publié des donnés de séquençage d'ARN de testicules postnataux *Stra8 +/+* et *Stra8 -/-,* ainsi que des données de ChIP-Seq après immunoprécipitation de STRA8 dans des testicules synchronisés enrichis en spermatocytes en préleptotène (M. L. Kojima et al., 2019). Ces données pourraient être comparées aux données d'analyses transcriptomiques de testicules postnataux *Ythdc2-/-* et *Meioc-/-*. Il est à noter, cependant, que l'ensemble des séquençages d'ARN est effectué sur des testicules entiers ; ce qui pourrait biaiser l'interprétation des résultats. En effet, même si les testicules utilisés sont des testicules postnataux, les populations cellulaires ne sont pas identiques et certaines dérégulations géniques peuvent être mal interprétées à cause de la concomitance de plusieurs stades spermatogoniaux. Pour surmonter ce problème, j'ai récemment séquencé les ARN extraits à partir de spermatocytes en préleptotène et leptotène triés à partir de testicules sauvages et *Meioc -/-* triés. Nous sommes en train d'analyser les résultats, que nous comparerons par la suite aux gènes régulés par *Stra8*. Une alternative complémentaire serait de comparer les cibles directes liées par STRA8 (ChIP-Seq) au niveau génomique aux ARN liés par YTHDC2 et MEIOC (RIP-Seq) (Bailey et al., 2017; M. Kojima et al., 2017).

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la ressemblance phénotypique entre *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* dériverait d'une continuité entre les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui contrôleraient le même programme génique. Dans cette continuité régulationnelle, un défaut de la transcription ou bien de la disponibilité des transcrits conduirait aux mêmes altérations.

Nous ne pouvons cependant pas exclure une seconde hypothèse: une altération de l'activité de STRA8 chez les mutants *Meioc -/-* et Ythdc2 -/-. Nous observons, chez les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* une accumulation de cellules STRA8-positives ainsi qu'une augmentation de *Stra8* en RT-qPCR. Ceci est concordant avec l'observation d'une accumulation, chez ces deux mutants, de spermatocytes aux stades préleptotène et leptotène. La présence de STRA8 suggère qu'il soit actif ; cependant, on observe un marquage de STRA8 majoritairement cytoplasmique chez les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* par rapport aux testicules sauvages. Cette localisation cytoplasmique est frappante dans nos marquages anti-STRA8 (Voir résultats) mais aussi dans les marquages effectués par d'autres équipes, bien que cet aspect ne soit pas discuté par les auteurs (M. Kojima et al., 2017).

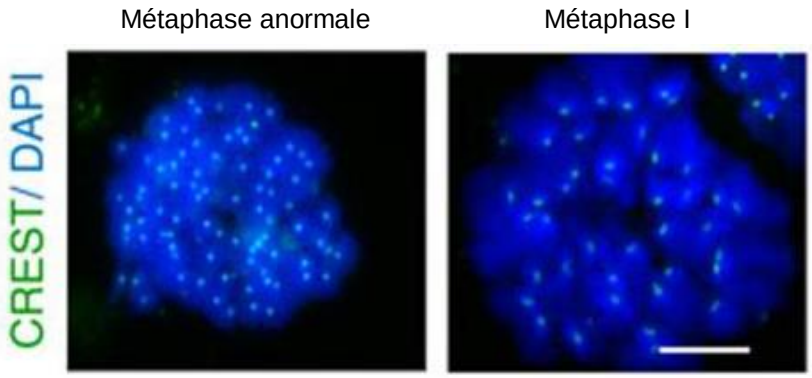


Figure 4. Différence entre une métaphase anormale (gauche) et une métaphase I méiotique. 40 univalents avec 80 foci CREST (vert, anti-centromères) dans les métaphases anormales; 20 bivalents avec 40 foci CREST dans les métaphases I. Barre 5µM. Figure modifiée de Abby et al. 2016

Le fait que STRA8 puisse se localiser dans le cytoplasme n'est, en soit, pas aberrant. Il a en effet été préalablement décrit une possible transition de STRA8 du noyau au cytoplasme et vice-versa (Tedesco et al., 2009b). Cependant, dans les spermatocytes sauvages, nous observons un marquage STRA8 quasi-exclusivement nucléaire, tandis que chez les mutants le marquage est majoritairement cytoplasmique. Ce marquage peut être interprété de deux façons différentes: I) STRA8 est initialement dans le noyau et transite au cytoplasme à cause du retard/blocage de la progression méiotique; II) la localisation de STRA8 est altérée depuis sa traduction dans les cellules en préleptotène. Dans cette deuxième hypothèse, l'altération de la localisation de STRA8 pourrait induire un dysfonctionnement de ce facteur et une dérégulation des gènes cibles de STRA8. Ceci pourrait biaiser les analyses transcriptomiques des mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-*. Celles-ci refléteraient à la fois une accumulation de défauts de la transcription (dérégulation STRA8) et post-transcriptionnels. Dans cette deuxième hypothèse, les métaphases anormales, communes aux trois mutants, pourrait dériver des mêmes dérégulations du programme transcriptionnel dues à l'absence/localisation impropre de STRA8. Les deux hypothèses sont difficiles à différencier. Une possibilité serait de forcer la localisation nucléaire de STRA8 chez les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-,* en enlevant, par exemple, la séquence d'export nucléaire (NES). Si le phénotype de ces souris est le même, alors la localisation de STRA8 n'a pas de conséquences sur le phénotype des souris *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-.* Ceci est envisageable : en effet, Tedesco et al. ont identifié 3 domaines potentiels NES dans la séquence murine de *Stra8* et la mutation d'un de ces NES prévient l'export nucléaire de STRA8 (Tedesco et al., 2009b).

II.B. Métaphases anormales

Comme montré dans les résultats, une caractéristique commune des phénotypes des souris *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-* est la présence de métaphases anormales. Ces métaphases se distinguent des métaphases I de méiose par la présence d'un seul hémi-fuseau (métaphases monopolaires), tandis que les métaphases I sont bipolaires.

En outre, elles sont marquées par les facteurs méiotiques SYCP3, STRA8 et elles s'accumulent au sein de tubes séminifères contenant des spermatocytes en tout début de prophase I. Les métaphases anormales sont marquées de manière aberrante pour γH2AX, signe que les cassures double brin ont eu lieu, ont été signalées, mais n'ont pas été réparées.

Dans l'ensemble, ces caractéristiques prouvent que ces métaphases dérivent directement des spermatocytes en début de prophase I, ayant effectué la transition mitose/méiose mais n'arrivant pas à poursuivre leur progression méiotique. Ces métaphases anormales ont déjà été décrites dans plusieurs études des mutants *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-,* à la fois chez les mâles et les femelles. Des expériences d'incorporation de BrdU confirment leur dérivation directe depuis les cellules germinales en début de prophase I (Abby et al., 2016; Mark et al., 2008).

Au sein des métaphases anormales, les chromosomes sont très compacts et apparaissent de forme presque sphérique (**Figure 4**). Alors que dans la métaphase I on observe 20 bivalents (40 chromosomes associés en 20 paires de chromosomes homologues), les métaphases anormales semblent contenir 40 univalents. Cela est en faveur d'une dérivation précoce des cellules méiotiques en métaphases anormales, avant l'appariement

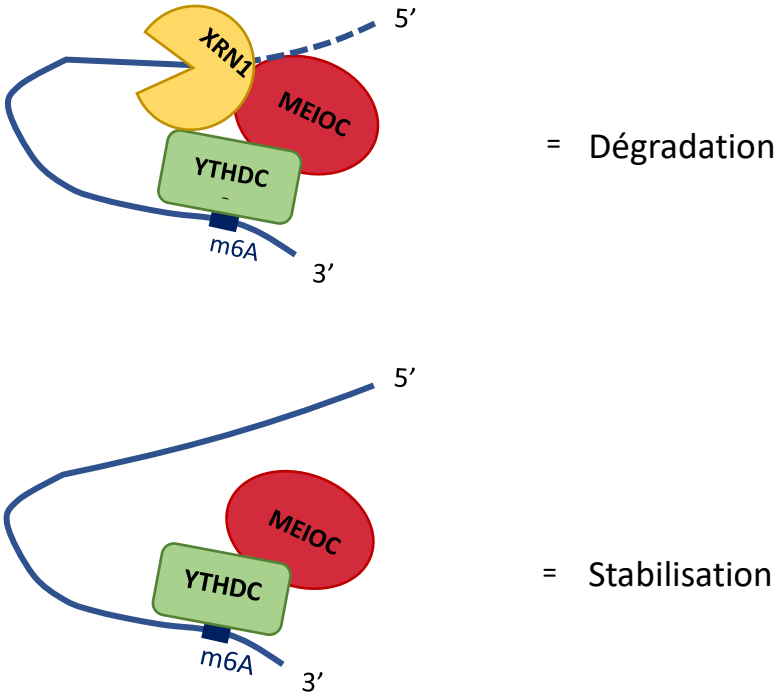


Figure 5. Modèle d’une double-action possible de MEIOC et YTHDC2 sur la dégradation et stabilisation des ARN. Dans ce modèle (modèle numéro III dans le texte), nous proposons que l’interaction ou pas d’YTHDC2/MEIOC avec XRN1 induit respectivement la dégradation ou la stabilisation des ARN. YTHDC2 interagit avec les ARN au niveau des modification m6A.

des chromosomes homologues. Chaque univalent est composé de 2 chromatides sœurs, signe que la réplication a eu lieu (Abby et al., 2016; M. Kojima et al., 2017; Mark et al., 2008).

Nous proposons que les métaphases anormales soient le résultat d'une mauvaise reprogrammation méiotique. Outre les trois mutants *Stra8 -/-*, *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-,* j'ai travaillé, au cours de ma thèse, sur un large spectre de mutants de la prophase I méiotique: mutants de cohésines (*Stag3, Rad21L*), de cassures (*Spo11, Meiob, Prdm9*), de signalisation/*checkpoints* (*Atr, Atm, Hormad1*). Bien que l'origine des défauts soit différente, l'ensemble de ces mutants montre des caractéristiques communes : défauts de *synapsis* et cassures (formation ou réparation). Cependant, les métaphases anormales sont une spécificité des mutants *Stra8*, *Meioc* et *Ythdc2*. Ces trois mutants se distinguent des autres pour leur implication très précoce dans le *switch* du programme mitotique vers le programme méiotique. Ceci implique donc que les métaphases anormales dérivent d'une mise en place aberrante du programme méiotique. Ne disposant pas du bon bagage transcriptionnel nécessaire aux évènements de la prophase, les cellules germinales sont détournées vers un essai inefficace de division métaphasique qui se termine par leur mort par apoptose. Le groupe de David Page propose plutôt que le rôle spécifique de MEIOC/YTHDC2 soit de maintenir une prophase longue durant la première division méiotique et ainsi d'empêcher le passage des cellules en métaphases avant l'achèvement des évènements de prophase I (M. Kojima et al., 2017). Cette interprétation peut être conciliée avec notre hypothèse mais n'explique pas la présence des métaphases anormales chez le mutant *Stra8 -/-*. Quoiqu'il en soit chez ces trois mutants les cellules engagent la prophase I et en sortent précipitamment à travers une métaphase aberrante. Cette sortie précipitée est cohérente avec le fuseau monopolaire car les centrioles n'ont alors pas encore eu le temps de se séparer, ce qui a lieu en fin de prophase I (fin de pachytène et /diplotène). Il reste à clarifier comment est effectivement orchestré le maintien en prophase I et le rôle, dans cette orchestration, de MEIOC et YTHDC2. Page et al. proposent une implication des cyclines, avec notamment le maintien d'acteurs du cycle mitotique tels que la cycline A2. Ce maintien n'a pas été décrit chez les mutants *Stra8 -/-* à notre connaissance (M. Kojima et al., 2017).

II.C. MEIOC et YTHDC2 : entre stabilisation et dégradation

Dans la littérature on retrouve plusieurs études indépendantes, toutes sorties entre 2016 et 2018, caractérisant le phénotype des mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-.* L'ensemble des études concordent sur le rôle post-transcriptionnel des partenaires MEIOC/YTHDC2. Différentes analyses transcriptomiques d'ovaires fœtaux et testicules postnataux *Meioc -/- vs Meioc +/+ et Ythdc2 -/- vs Ythdc2 +/+* mènent aux mêmes résultats : I) une surexpression des gènes mitotiques (telle la cycline A2) et II) une inhibition des gènes méiotiques en absence de *Meioc* ou *Ythdc2*.

Abby et al. associent ces dérégulations avec un rôle de MEIOC dans la **stabilisation** des ARN méiotiques (Abby et al., 2016), tandis que Kojima et al. remettent ouvertement en question cette conclusion en proposant un rôle de MEIOC et son partenaire YTHDC2 dans la **dégradation** des ARN mitotiques (M. Kojima et al., 2017). Depuis, l'observation d'une augmentation d'ARN-m6A liés par YTHDC2 dans les mutants *Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-,* serait en faveur d'un rôle de ces facteurs dans la dégradation des ARN. En outre, il a été montré par différentes équipes que YTHDC2 et MEIOC peuvent interagir avec XRN1, une 3'-5' exoribonucléase qui

pourrait avoir le rôle actif de dégradation des ARN dans le complexe YTHDC2/MEIOC/XRN1 (Abby et al., 2016; Kretschmer et al., 2018; Wojtas et al., 2017).

Nous pouvons donc émettre plusieurs hypothèses : I) YTHDC2 et MEIOC sont impliqués uniquement dans la dégradation des ARN mitotiques (avec XRN1) et la *downrégulation* du programme méiotique chez les mutants est une conséquence de la mauvaise extinction du programme mitotique ou II) MEIOC et YTHDC2 sont impliqués dans la stabilisation des ARN méiotiques et c'est la mise en place du programme méiotique qui est nécessaire pour éteindre complètement le programme mitotique ou III) MEIOC et YTHDC2 agissent à la fois sur les ARN mitotiques en les dégradant et sur les ARN méiotiques en les stabilisant. Une possibilité serait qu'en fonction de l'interaction ou non avec XRN1, ces deux facteurs soient impliqués respectivement dans la dégradation ou la stabilisation. Ceci expliquerait le fait que dans les résultats de spectrométrie de masse après IP anti-MEIOC, XRN1 sort beaucoup moins enrichi que YTHDC2 (5 vs 134 enrichement fold) (Abby et al., 2016). Si cette hypothèse est vraie, il reste à comprendre ce qui détermine l'interaction (ou non) avec XRN1.

Ce troisième modèle pourrait trouver une explication au blocage précoce de prophase I chez les mutants *Ythdc2 -/-* et *Meioc -/-* en leptotène et zygotène-like qui semble discordant avec la détection de ces protéines dans le cytoplasme des spermatocytes jusqu'au stade diplotène, avec une intensité maximale au stade pachytène. YTHDC2 et MEIOC pourraient être impliqués initialement dans l'extinction du programme mitotique en début de prophase I et successivement dans la stabilisation du programme méiotique.

II.D. MEIOC et YTHDC2: *en quoi diffèrent-ils ?*

Malgré la ressemblance phénotypique, nous mettons en évidence une différence entre les mutants *Stra8 -/-* et *Ythdc2 -/- versus* les mutants *Meioc -/-.* En effet, dans les testicules *Meioc -/-* on observe plus de spermatocytes initiant la méiose et qui progressent jusqu'à des stades plus tardifs (zygotène-like). Chez ces mutants on retrouve donc I) des spermatocytes qui bloquent au stade leptotène et qui dérivent en métaphases anormales ainsi que II) une accumulation de spermatocytes au stade zygotène-like.

Pourquoi les spermatocytes Meioc -/- progressent-ils plus facilement jusqu'au stade zygotène-like ? Cette différence est bizarre si on considère que MEIOC et YTHDC2 travaillent en complexe. En analysant attentivement la localisation de YTHDC2 et MEIOC nous observons une localisation spécifique de YTHDC2 au niveau du *chromatoid body*, qui n'est pas observée pour MEIOC. Le *chromatoid body* est une structure cytoplasmique qui joue un rôle dans la régulation des ARNm (stockage, épissage). En particulier, dans cette structure il y une accumulation d'ARN qui ne sont pas instantanément traduits et de protéines de liaison aux ARN. Cette localisation de YTHDC2 dans le *chromatoid body* a déjà été décrite par Bailey et al. (Bailey et al., 2017). Chez les mutants *Meioc -/-* on observe une localisation d'YTHDC2 inaltérée, dans le cytoplasme ainsi que dans le *chromatoid body* (dans les spermatocytes plus avancés en prophase I). Il est donc possible que les rôles d'YTHDC2 et MEIOC soient en partie indépendants. YTHDC2 pourrait lier les ARN, même en absence de MEIOC, et de les transférer au *chromatoid body* pour réguler leur traduction, stabilisation et/ou dégradation. MEIOC pourrait être un partenaire qui permet de moduler l'action d'YTHDC2 en aidant ou bien en s'opposant à son rôle. On peut envisager plusieurs hypothèses : I) MEIOC aide à l'interaction initiale entre YTHDC2 et les ARN et c'est après YTHDC2 seul qui régule la localisation et le métabolisme de ces derniers ;

II) ou bien MEIOC pourrait empêcher la liaison d'YTHDC2 à certains ARN, en « séquestrant » YTHDC2 et permettant ainsi une traduction active des ARN méiotiques ; III) Ou bien YTHDC2 pourrait avoir deux actions opposées sur les ARN, en fonction de son interaction ou pas avec MEIOC et/ou d'autres partenaires.

II.E. MEIOC et YTHDC2: *existence d'un rôle tardif?*

Nous avons en outre caractérisé une localisation de MEIOC et YTHDC2 en métaphase I au niveau des centrioles. De manière curieuse, MEIOC et YTHDC2 n'interagissent pas du tout avec les centrosomes au cours de la prophase I. Cette localisation est donc spécifique en métaphase. *Qu'est-ce que cela signifie ?* Le rôle de cette localisation est inconnu à l'heure actuelle. Il serait très intéressant d'invalider *Meioc* et/ou *Ythdc2* tardivement pour étudier l'effet spécifique de cette localisation métaphasique. Nous avons au laboratoire une lignée de souris Cre-ERT2 que nous avons croisée avec des souris ayant deux sites LoxP d'une part et l'autre de l'exon 3 du gène *Meioc*. Ce modèle nous permettra d'invalider *Meioc* à des stades plus tardifs de la prophase I.

II.F. La régulation du programme méiotique

La complexité de la régulation de la transition du programme mitotique au programme méiotique émerge de plus en plus. Nous avons vu à plusieurs reprises que STRA8 est considéré comme le gardien de l'entrée en méiose ; ceci chez le mâle ainsi que chez la femelle. En effet, Anderson et al. décrivent un blocage de la spermatogénèse au stade préleptotène, avec une absence complète de spermatocytes en prophase I dans des souris *Stra8 -/-* en fond pur C57BL/6 (Anderson et al., 2008). En revanche, Mark et al. décrivent un phénotype plus 'souple' suite à l'invalidation de *Stra8* dans un fond génétique mixte C57BL/6-129Sv (Mark et al., 2008). En effet, chez ces mutants *Stra8 -/-,* certains spermatocytes dépassent le cap du préleptotène et initient la méiose avec l'expression de marqueurs spécifiques à la prophase I, tels REC8, SYCP3, SYCP1, RAD51, γH2AX.

Dans les résultats, nous avons vu que le fond génétique peut influencer de façon notable l'expression des transcrits méiotiques chez les mutants *Stra8 -/-* ainsi que *Meioc -/-*. Ces différences observées dans le niveau de transcrits entre les mutants en fond C57BL/6 et en fond mixte, sont probablement dues à une différence en termes de populations cellulaires, avec un pourcentage de cellules germinales initiant la méiose plus faible chez les souris mutantes C57BL/6 par rapport aux souris mutantes mixtes. Ceci est validé par des analyses immunohistochimiques en cours (non montrées). Ces différences d'expression de gènes méiotiques entre deux mutants pour un même gène qui diffèrent pour le fond génétique, pourraient expliquer les différences observées dans la littérature entre les différents mutants *Stra8*.

Ces observations, discordantes, sur les effets d'une invalidation de *Stra8* questionnent sur l'exactitude de sa nomination en tant que « *meiotic gatekeeper* ».

Dans nos expériences d'inhibition de la voie AR/*Stra8* par le BMS 453 (agoniste inverse RAR), à partir de 6 jpp, nous observons une progression normale de la prophase I jusqu'en début de pachytène (10 jpp). Des

analyses à des âges plus avancés seraient nécessaires pour évaluer jusqu'à quel stade les cellules avancent dans les testicules traités au BMS. Nous proposons donc que l'expression de STRA8 avant 6 jpp (âge du début du traitement), dans les spermatogonies A différenciées soit suffisante pour permettre l'entrée en méiose plus tardive des spermatocytes. Ceci ressemble aux observations de T. Kent et al. qui voient des spermatocytes en pachytène suite au traitement quotidien de souris avec du WIN 18,446 pendant 12 jours. Les spermatocytes en pachytène montrent des défauts de synapsis et réparation des cassures et les auteurs proposent donc un rôle de STRA8 pour la progression correcte de la prophase I (Kent et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces expériences démontrent que l'AR est nécessaire précocement lors de la transition des spermatogonies indifférenciées en différenciées, mais une inhibition plus tardive de la voie de l'AR, provoquant une inhibition de STRA8 au stade préleptotène, ne prévient pas l'initiation méiotique, tout en altérant l'expression des gènes méiotiques (résultats des analyses de RT-qPCR dans les travaux avec le BMS) et induit des défauts de prophase I.

Ceci correspond enfin avec la proposition de Kojima et al. d'un rôle de STRA8, en préleptotène, dans l'amplification d'un programme méiotique préexistant, plutôt que dans l'activation *de novo* de ce programme (M. L. Kojima et al., 2019). Nous pouvons donc proposer que dans les spermatogonies A différenciées STRA8 contribue au démarrage initial du programme méiotique et l'amplification de ce dernier aurait lieu au stade préleptotène. Ceci est aussi en accord avec notre proposition d'une activation de STRA8 en deux étapes dans l'ovaire fœtal : une induction initiale, suivie par son amplification (voir discussion AR). Ceci pourrait permettre de proposer une régulation en deux étapes du programme méiotique.

II.G. Conclusion

En conclusion, je propose d'élargir la vision sur le rôle de STRA8 au moment du switch mitose/méiose. STRA8 est sûrement un régulateur clé du programme méiotique mais il n'est pas le seul. MEIOC et YTHDC2 ont été identifiés et caractérisés pour leur rôle dans la mise en place correcte du programme méiotique. La forte similitude des phénotypes des trois souris mutantes (*Stra8 -/-, Meioc -/-* et *Ythdc2 -/-*) suggère leur action sur le même programme bien qu'ils n'agissent pas au même niveau : niveau transcriptionnel (STRA8) et post-transcriptionnel (MEIOC/YTHDC2). D'autres facteurs restent probablement à identifier, car l'invalidation concomitante de *Stra8* et *Meioc* ne prévient pas complètement l'entrée en méiose. Tout cela suggère l'existence d'un réseau de facteurs impliqués dans l'initiation de la méiose plutôt que d'un seul gardien méiotique.

III. Silencing transcriptionnel et entrée en méiose

III.A. Pourquoi la régulation post-transcriptionnelle jouerait-elle un rôle important au cours de la prophase I méiotique?

Dans l'introduction du manuscrit nous avons vu qu'à plusieurs reprises dans la vie des cellules germinales, il existe des arrêts globaux de la transcription (CGP, spermatides, EGA) qui sont souvent associés à des mécanismes de régulations post-transcriptionnelles (stabilisation). De manière intéressante, V. Monesi en 1964 et Page et al. en 2012, proposent une baisse de l'activité transcriptionnelle en début de prophase I (MONESI, 1964; Page et al., 2012). Bizarrement, ce phénomène n'a pas été étudié ultérieurement, à la différence d'un autre mécanisme de *silencing*, spécifique des chromosomes sexuels (MSCI) qui, lui, a été largement caractérisé. Dans la première figure du manuscrit, nous confirmons l'absence de pPOL2 aux premiers stades de prophase I (leptotène/zygotène) et sa réapparition progressive au cours du stade pachytène. Nous associons cette absence de pPOL2 à une inactivation globale de la transcription (EMLT), et nous confirmons ainsi les études de V. Monesi et Page et al.

La réactivation des autosomes au stade pachytène est globale, sans être pourtant homogène. En effet, nous observons un marquage pPOL2 plus intense au niveau de certains domaines chromosomiques, qui pourraient correspondre à des domaines hyper-transcrits. Il serait donc intéressant de déterminer si la localisation de ces domaines est la même d'un spermatocyte à l'autre ou bien si elle est aléatoire. L'absence de marquage pPOL2 est maintenue au niveau des chromosomes sexuels aux stades pachytènes et diplotènes. Nous supportons donc la vision de Page et al., qui voient le phénomène de MSCI comme un maintien du *silencing « genome-wide »,* déjà en place en début de prophase I, plutôt que comme une extinction « *de novo »* de la transcription. Malgré cette continuité temporelle entre le EMLT et le MSCI, nous démontrons que les mécanismes régulant ces deux phénomènes ne sont pas les mêmes. En effet, nous montrons que l'invalidation de régulateurs clés du MSCI (ATR, SETDB1) ne prévient pas l'EMLT.

Dans cette étude nous écartons en outre l'hypothèse que l'EMLT soit régulé par les événements clés de la prophase I: le changement de la structure chromatinienne, le *synapsis* des chromosomes homologues, la formation et réparation des cassures double brin. L'analyse de mutants nuls d'acteurs clés de chacun de ces évènements, nous permet en effet de prouver qu'une inactivation transcriptionnelle (absence de pPOL2) ainsi qu'un début de réactivation de la transcription (réapparition de pPOL2) se produisent avec le *timing* attendu. Cette observation est, pour nous, surprenante. En effet, la structure chromatinienne avec les cohésines, ainsi que les cassures de l'ADN, sont souvent associées à des modifications de la transcription. Il reste à vérifier une possible relation inverse à celle que nous avons cherchée : l'inactivation de la transcription pourrait être I) nécessaire à la mise en place correcte (spatiale et/ou temporaire) des cassures double brin méiotiques ou bien II) à la formation correcte de la structure axes-boucle et au correct appariement des chromosomes homologues. Dans cette optique, il se peut que les gènes maintenus transcriptionnellement actifs au moment de l'EMLT soient associés avec des sites spécifiques de cassures ou de dépôt de cohésines. Il pourrait être intéressant de comparer la localisation des gènes néotranscrits en début de prophase I, identifiés par le séquençage des ARN marqués à l'éthynyl-uridine, avec les sites chauds de cassures et les sites de

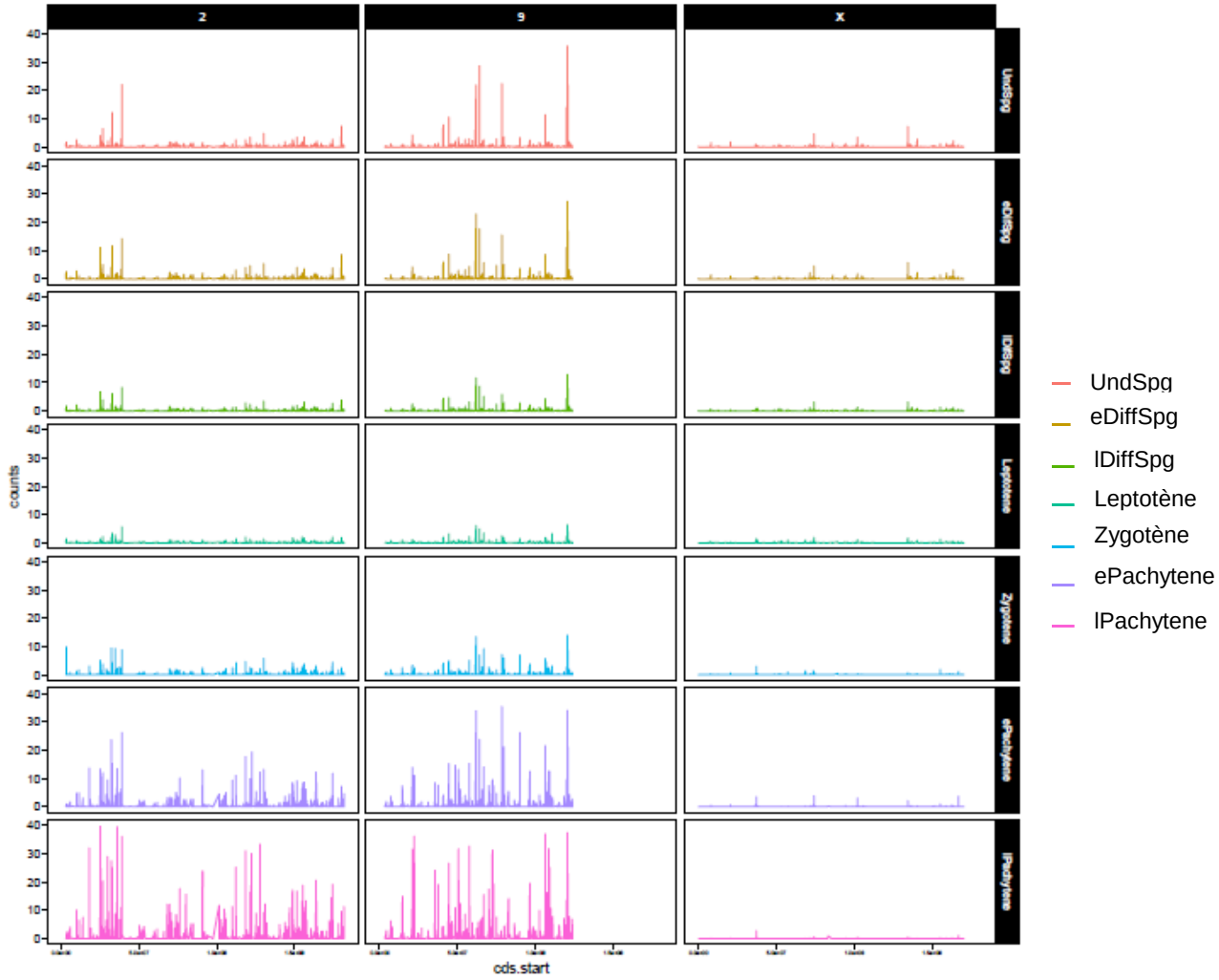


Figure 6: La densité des transcrits est dynamique au cours de la spermatogénèse. Les profils sont obtenus à partir de données de *Single cell RNA-Seq* (Ernst et al.). Représentation de la densité de transcrits normalisés sur le nombre de cellules, par stade de spermatogénèse: spermatogonies indifférenciées (UndSpg); spermatogonie différenciées précoces (eDiffSpg); spermatogonies différenciées tardives (lDiffSpg); Leptotène; Zygotène; début pachytène (ePachytene); fin pachytène (lPachytene). Analyse de trois chromosomes sélectionnés: chromosome 2 (2), chromosome 9 (9) et chromosome X (X). Nous observons que la densité de transcrits change en fonction du stade de la spermatogénèse. Les gènes sur le chromosome X sont faiblement exprimés à tous les stades.

localisation des cohésines. En particulier, les sites de cassures ont été définis par des séquençages ChIP-seq après immunoprécipitation de PRDM9 ainsi que par le séquençage des oligo-Spo11. Malheureusement cette approche est compliquée par le fond transgénique non consanguin (NMRI) que nous avons choisi pour notre étude de la néo-transcription et dans lequel les points chauds de cassures n'ont pas été caractérisés. En effet, on sait que les sites de cassures peuvent varier entre deux fonds génétiques murins (Frédéric Baudat et al., 2013).

III.B. Quels facteurs pourraient être à l'origine du EMLT ?

Le mécanisme ou facteur à l'origine du EMLT reste donc encore à identifier. Cependant nous avons montré que l'EMLT se met en place très précocement, avant l'entrée en méiose. En effet nous constatons une baisse d'intensité de la pPOL2 qui débute dans les spermatogonies différenciées pour rejoindre son niveau d'intensité le plus faible en préleptotène et en leptotène. Cette cinétique originale n'avait jamais été décrite. L'analyse de novo de données de séquençages d'ARN sur cellules uniques publiées récemment (Ernst et al., 2019) (réanalysée par MJ Guerquin, **Figure 6**) vient valider notre profil de la dynamique de l'EMLT. En effet, en comparant la quantité de transcrits présents dans des cellules représentatives de chaque stade, nous obtenons un profil identique à celui tracé par la quantification de la pPOL2: une diminution de la quantité des transcrits dans les spermatogonies différenciées pour rejoindre la quantité la plus faible aux stades préleptotènes et leptotènes.

Sur cette base, le régulateur du *silencing* doit être présent et actif déjà dans les spermatogonies. De manière intéressante, nous observons une mise en place tardive, au stade leptotène, de l'EMLT dans les mutants *Stra8 -/-*. Ce résultat suggère que STRA8 puisse réguler indirectement le *silencing* via la régulation transcriptionnelle du régulateur de l'EMLT. Le panel de gènes régulés par STRA8 est cependant très vaste et la recherche du régulateur de l'EMLT parmi ces gènes serait audacieuse.

Un autre niveau de régulation du *silencing* pourrait être celui de l'épigénétique. Nous avons traité, dans l'introduction, du dynamisme des modifications épigénétiques au cours de la spermatogénèse. Les immunomarquages de modifications post-traductionnelles d'histones permettent d'observer des changements globaux d'intensité de ces marques au cours de la spermatogénèse. Certaines parmi celles-ci ont un profil curieusement similaire au profil que nous avons décrit pour la pPOL2 : H3K9me3, H3K4me, H3K9ac ainsi que les acétylations de l'histone H4K8ac et H4K12ac. *L'EMLT pourrait-il donc être une conséquence directe de l'état épigénétique de la cellule?* Dans ce cas, l'invalidation des enzymes catalysant ces modifications épigénétiques pourrait altérer la mise en place de l'EMLT. Nous sommes actuellement à la recherche des enzymes candidates. Nous proposons que la marque H3K9me3, qui est aujourd'hui la marque proposée comme inhibant la transcription dans le MSCI, soit un bon candidat également pour le EMLT. Cependant, l'enzyme impliquée dans le dépôt de la marque H3K9me3 serait différente de celle impliquée dans le MSCI (SETDB1) que nous avons démontré n'être pas à l'origine du EMLT (mutants *Setdb1 cKO*).

III.C. POL2 et pPOL2: recrutement ou activation?

Une autre observation intéressante est que le profil de l'ARN polymérase II totale (POL2, phosphorylée et non-phosphorylée) suit un profil très semblable à la pPOL2. Leur profil diffère uniquement en fin de prophase I méiotique : ceci est logique car les stades mi-pachytène, fin-pachytène et diplotène sont caractérisés par une hyperactivation de la transcription associée à une forte augmentation de la forme active de la pPOL2.

La diminution de la POL2 globale, ainsi que de la pPOL2, au cours du EMLT, suggère que le *silencing* ne passe pas par l'inactivation directe de la phosphorylation du CTD de la pPOL2, mécanisme que nous avons vu être à l'origine du *silencing* global des CGP chez la Drosophile et *C.elegans*. L'EMLT semble plutôt associé à une réduction de l'ARN polymérase II au niveau de la chromatine. Nous ne détectons pourtant pas de changements au niveau transcriptionnel des sous-unités de l'ARN polymérase II (non montré). Il s'agirait donc probablement d'une absence de recrutement de l'ARN polymérase II au niveau de la chromatine, ce qui va également dans le sens de l'éventuelle régulation épigénétique évoquée ci-dessus. Il serait cependant sage de s'assurer de la présence de la POL2 de manière globale dans les cellules par une quantification en *Western-Blot* sur des cellules triées.

Dans la même idée, nous observons que le MSCI est caractérisé aussi par une absence de POL2 totale ainsi que de pPOL2 au niveau des chromosomes sexuels. Dans mes travaux, j'ai cependant observé une caractéristique propre au MSCI : l'accumulation de POL2 spécifiquement le long des axes des chromosomes X et Y à partir du stade mi-pachytène. Cette caractéristique n'a jamais été rapportée dans la littérature. *Est-ce que ce marquage est spécifique ? Et est-ce qu'il joue un rôle important ?* Il serait intéressant de vérifier si dans le phénomène plus large du MSUC on retrouve aussi ce marquage POL2 le long des chromosomes inactivés. Nous ne pouvons pas exclure non plus que la POL2 localise sur les axes des chromosomes en début de prophase I au cours de l'EMLT, mais que le marquage ne soit pas facilement observable à cause d'une compaction plus faible de la chromatine (par rapport à la vésicule sexuelle en pachytène). Cette donnée est également à mettre en perspective avec la reprise de la transcription (après l'EMLT) sur les autosomes, qui semble débuter au niveau des axes. On peut donc proposer un rôle global axes chromosomiques pour le recrutement de la machinerie de transcription. Ce point pourrait réconcilier l'implication de cohésines vis-à-vis de la régulation de la transcription.

III.D. EMLT: ça sert à quoi?

Je poursuis la discussion avec la question préférée de Gabriel : « *ça sert le silencing* ? ». Pour répondre, il faudrait, idéalement, créer des modèles où le *silencing* ne se met pas en place pour évaluer les conséquences. Nous cherchons actuellement à activer artificiellement la transcription en début de méiose par l'utilisation d'inhibiteurs généraux d'ADN méthyltransférases ou d'histones déacétylases. Nos premiers essais ont été inefficaces : le traitement de morceaux testiculaires postnataux en présence de 5'azacytidine ne prévient pas l'EMLT (non montré). Ceci pourrait être dû à: I) une inefficacité du traitement (cette possibilité reste à vérifier par des marquages 5-méthylcitosine) ; ou à II) une impossibilité de forcer la transcription à ce stade à cause, peut-être, de l'absence de la machinerie transcriptionnelle.

III.E. Quelle transcription ou absence de transcription pendant l'EMLT?

La partie plus innovante du projet consiste à définir la qualité du *silencing* transcriptionnel. Les objectifs étant I) de caractériser l'étendue du blocage transcriptionnel méiotique en analysant la **néo**transcription dans les spermatocytes I en début de prophase I (préleptotène/leptotène) ; II) de définir la **dynamique** du programme transcriptionnel au cours de la prophase I en analysant trois différentes populations: spermatogonies, spermatocytes I précoces (préleptotène/leptotène) et spermatocytes I tardifs (pachytène tardif); III) de comparer les ARN néotranscrits aux ARN totaux présents dans les trois populations germinales pour mettre en évidence d'éventuels mécanismes de **stabilisation** (ou déstabilisation) d'ARN.

Malgré un large panel d'études transcriptomiques existant, à la fois sur des populations de cellules testiculaires et sur des cellules uniques, nous analysons ici pour la première fois les ARN néotranscrits. Cette étude est d'un grand intérêt étant donné les nombreux mécanismes de stabilisation et dégradation d'ARN qui sont de plus en plus caractérisés en méiose. Notre analyse se distingue en plus par l'utilisation de spermatocytes triés en début de prophase I. Cette population représente un pourcentage très faible de cellules testiculaires et elle n'est donc pas facile à isoler en quantités suffisantes pour une analyse transcriptomique. Nous exploitons ici la méthode de synchronisation de la spermatogénèse pour enrichir le pourcentage de spermatocytes en leptotène. Cette première approche a donc représenté un petit *challenge* pour analyser la transcription dans des cellules rares et silencieuses qui n'a que peu d'équivalents aujourd'hui. Les approches par séquençage Single-cell, qui pourraient également approcher cette question, ont largement éludé cette problématique. En effet dans la plupart de ces travaux les cellules qui ne contiennent que peu d'ARN sont écartées de l'analyse. Ainsi les populations des spermatocytes en préleptotène-leptotène et zygotène sont difficiles à caractériser. Seule une étude très récente a, pour la première fois, bien caractérisé ces cellules en analysant les « gouttelettes vides » (Ernst et al., 2019). Cette étude a ainsi confirmé la très faible activité transcriptionnelle de ces populations cellulaires (**Figure 6**)

Notre étude comporte cependant des limites. La première limite, et la plus importante, est que notre analyse de la néotranscription ne permet pas de comparer quantitativement les différents stades cellulaires et donc de visualiser le *silencing*. Cela est dû au fait que nous sommes partis d'une quantité d'ARN totale constante pour isoler les ARN néosynthétisés. Par ailleurs après l'amplification, le séquençage a été réalisé sur des quantités constantes de cDNA. Idéalement il aurait fallu partir d'un nombre de cellules équivalent en restant dans une gamme linéaire d'amplification, cependant cela induit d'autres biais d'analyse (extraction, immunoprécipitation et amplification). Pour corriger le biais lié à l'amplification nous avions envisagé l'incorporation d'une référence externe (*Spike-in*) qui s'est révélée peu efficace. Nous essayons de manière complémentaire une analyse quantitative par FACS des ARN néotranscrits (Ethynyl-Uridine) dans les populations triées (en cours). Pour le moment, nous constatons que si nous comparons la quantité d'ARN total extrait à partir des populations leptotènes et pachytènes en fonction du nombre de cellules, on observe plus d'ARN dans les populations pachytènes (**Figure 7**). Une autre limite concerne la profondeur du séquençage : en effet, pour certains gènes, nous observons des faibles nombres de lectures (*reads*).

Nos séquençages révèlent cependant des informations originales. Nous observons en effet des changements dynamiques de l'expression de gènes. De manière intéressante, dans l'ensemble de nos populations, il y a une grande cohérence entre l'expression d'un ARN (ARN total) et sa transcription (ARN néotranscrit).

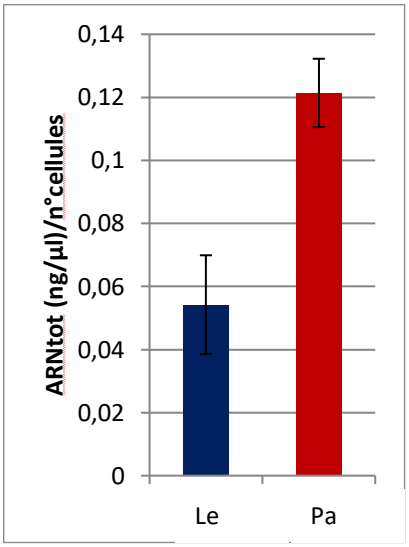


Figure 7: Les cellules en pachytène contiennent plus d'ARN que les cellules en début de prophase I. Les ARN totaux (ARNtot) ont été extrait à partir de spermatocytes en leptotène (Le) ou pachytène (Pa) triés. triées. La quantité d'ARN extrait (ng/µl) est rapportée au nombre de cellules triées.

Notamment, la plupart des gènes méiotiques montrent des profils en ARN total et en ARN néotranscrit corrélés. En outre, nous observons une grande cohérence dans les transcrits exprimés dans les différentes populations cellulaires. C'est-à-dire que nous retrouvons les marqueurs spécifiques connus de chacun de nos stades, exprimés au bon moment (voir les profils dans les résultats). Notamment, en reprenant des marqueurs des différents stades identifiés par l'analyse *Single-cell* de Ernst et al., nous les retrouvons globalement exprimés au bon stade dans nos populations (**Figure 8**). Ceci démontre la validité de nos résultats : en effet, deux approches indépendantes pointent vers les mêmes profils d'expression.

Dans l'ensemble, ces deux points valident donc notre approche.

De manière intéressante, pour certains gènes nous observons des profils en ARN total et ARN néotranscrits **non corrélés**, ce qui suggère des mécanismes de stabilisation ou dégradation associés. Nous sommes en train d'analyser précisément quels gènes sont associés à ces profils. Pour le moment, nous avons retrouvé quelques gènes clés pour la prophase I ayant un profil non corrélé : *Stag3, Hormad2, Rad51* (voir résultats). En comparant les profils d'ARN totaux aux profils des ARN néotranscrits des gènes non corrélés (profils S, Figure 22 résultats), nous visualisons indirectement les mécanismes de stabilisation et déstabilisation associés (**Figure 9**).

Les populations S5 et S6 sont les plus abondantes et sont constituées par des gènes fortement exprimés en pachytène (ARN total), sans être pour autant fortement transcrits (ARN néotranscrits). Ceci peut être expliqué par l'existence d'une phase de néotranscription intermédiaire à nos deux populations leptotènes et pachytènes (en zygotène-début pachytène) ou bien par le maintien d'un niveau constant de transcription avec une accumulation des transcrits résultant dans un pic d'expression en pachytène. Dans les deux cas, les profils de ces groupes de gènes, S5 et S6, reflètent une période de stabilisation des ARN. Ceci est très intéressant et pourrait passer par un mécanisme de stabilisation spécifique comme, par exemple, le complexe MEIOC/YTHDC2. La population S3 conforte l'existence d'un mécanisme de stabilisation d'ARN. Les gènes qui en font partie sont, en effet, fortement transcrits (néotranscription) spécifiquement au stade leptotène, tandis que leur niveau d'expression (ARN total) le plus fort est au stade pachytène. Ces ARN sont donc transcrits spécifiquement en début de prophase I mais stabilisés et stockés jusqu'en fin de prophase I. Les populations S7 et S8 regroupent des gènes exprimés à niveau plutôt constant dans nos populations mais montrant un pic de transcription (néotranscrits) respectivement aux stades spermatogonies et leptotènes. Ces profils suggèrent que les ARN sont transcrits mais rapidement éliminés. Ces ARN pourraient être momentanément transcrits à fort niveau pour être immédiatement traduits en protéines et dégradés. Nous proposons donc la présence de mécanismes spécifiques de déstabilisation/dégradation dans les spermatogonies et en début de prophase I méiotique. Ces populations sont cependant peu abondantes, ainsi que la population S2. Cette dernière regroupe des gènes avec des fortes variations d'expression (ARN total) dans nos différentes populations. Cependant le profil de néotranscription est plutôt constant, à part une légère augmentation en leptotène. Ceci fait penser à un phénomène de stabilisation qui aurait lieu très précocement, en début de prophase I méiotique. Enfin, la population S1 regroupe des gènes qui sont fortement exprimés (ARN total) dans les spermatogonies mais qui ne sont pas transcrits (ARN néotranscrits) à ce moment. Nous proposons qu'ils aient été préalablement transcrits dans des spermatogonies moins différenciées et stabilisées.

A

Élément sous droit,
diffusion non autorisée

B

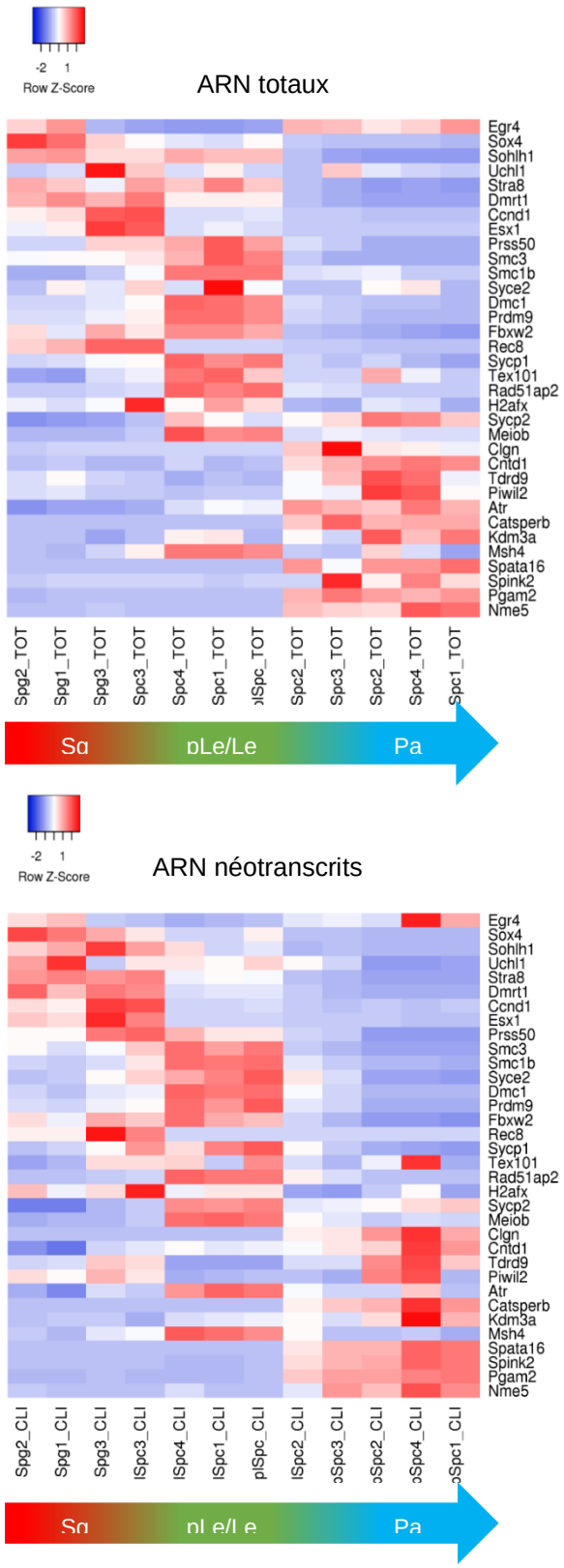


Figure 8: Comparaison des profils d'expression de marqueurs de spermatogénèse identifiés dans l'analyse Single-cell de Ernst et al. 2019. A) Figure modifiée de Ernst et al. 2019 représentant les profils d'expression de marqueurs pour chaque stade pré-méiotique et de prophase I. **B)** *Heatmaps* crées à partir de nos séquençages d'ARN totaux (en haut) et d'ARN néotranscrits (en bas). Nous avons choisi de représenter les mêmes gènes identifiés par Ernst et al. dans l'analyse *Single-cell.* On observe globalement que les profils pour un même gène correspondent. Sg = spermatogonies **;** pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène

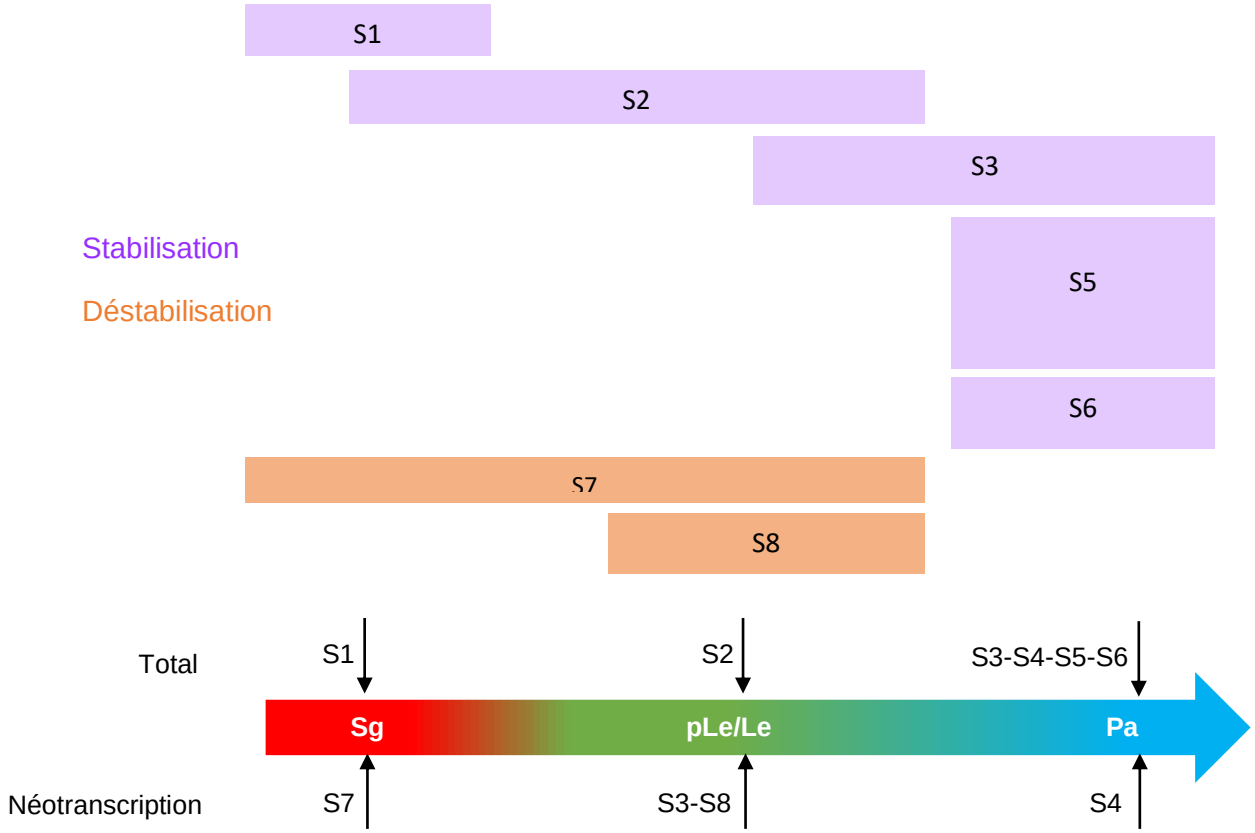


Figure 9: Phénomènes de stabilisation et déstabilisation observés par l'analyse des profils non-corrélés (profils S). Les flèches noires représentent le stade où, le groupe indiqué (de S1 à S8), est exprimé le plus fortement, en néotranscription (en dessous de la flèche temporelle) et en ARN totaux (au dessus de la flèche temporelle). Les boites colorés raprésentent les phénomènes de stabilisation (violet) ou déstabilisation (orange) que nous avons déduit à partir des profils d'expression. En exemple, S3 est transcrit principalement en pLe/Le mais est présent en plus forte quantité en Pa. Nous en déduisons que un processus de stabilisation a lieu après transcription. Sg = speramatogonies **;** pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène.

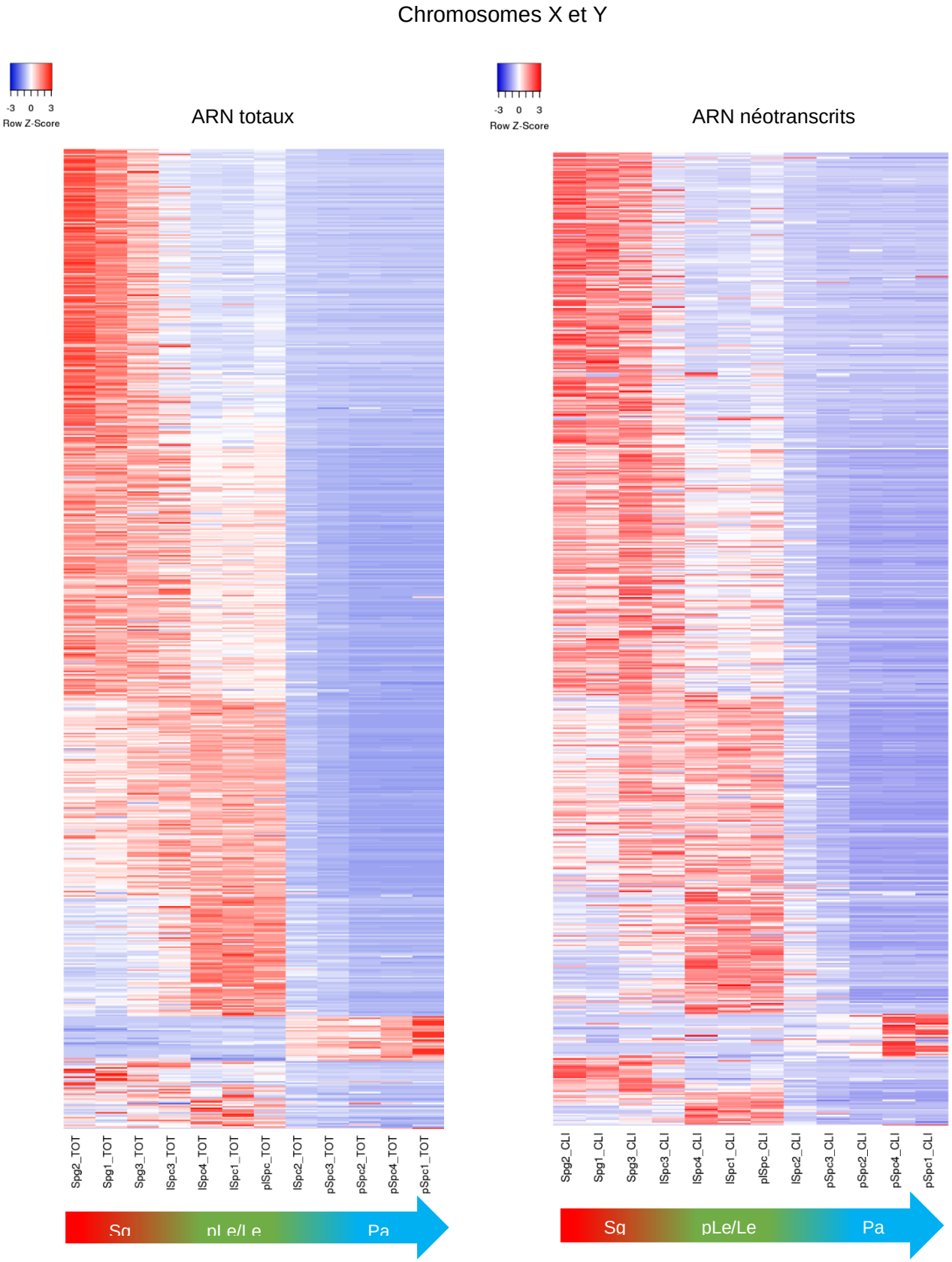


Figure 10. Profils d'expression des gènes localisés sur les chromosomes sexuels X et Y. À droite profils en ARN totaux; à gauche profils en ARN néotranscrits. Nous observons clairement le phénomène de MSCI. Certains gènes sont inactivés transcriptionnellement en leptotène et un faible nombre de gènes est actif en pachytène. Sg = spermatogonies **;** pLe = préleptotène; Le = leptotène ; Pa= pachytène

Dans l'ensemble, les profils S suggèrent la présence de phénomènes majeurs de stabilisation ayant lieu majoritairement en pachytène mais aussi en leptotène pour une minorité de gènes (S2). Il serait intéressant de comparer ces gènes, appartenant aux populations S2, S3, S5, S6 aux cibles de YTHDC2.

En plus des phénomènes de stabilisation, nous observons, en début de prophase I méiotique, des événements de déstabilisation. L'existence d'une vague de dégradation d'ARN, médiée par la 3' uridylation, en début de prophase I, a été récemment proposée comme indispensable pour une progression méiotique correcte (Morgan et al., 2019).

Enfin, nos résultats de séquençage, nous permettent de visualiser le phénomène de MSCI : les gènes liés aux chromosomes X et Y sont inactifs en pachytène (**Figure 10**). Nous observons néanmoins la présence d'un faible nombre de gènes, liés au chromosome X, qui échappent au *silencing* en pachytène. Ceci est original car, à notre connaissance, il n'a jamais été décrit. En outre, nous observons un groupe assez consistant de gènes qui est déjà inactivé au stade leptotène. Ceci est en faveur d'une continuité entre le EMLT et le MSCI. Cependant, cette continuité ne concerne pas la totalité des gènes sur les chromosomes sexuels. Nous proposons donc la présence de marques épigénétiques additionnelles qui viendraient renforcer le MSCI. À l'inverse, la disparition d'autres marques pourrait expliquer la réactivation de certains gènes dans le MSCI.

III.F. Conclusion

En conclusion, nous sommes en train de caractériser un processus de *silencing* transcriptionnel ayant lieu au moment de la transition mitose/méiose que nous dénommons EMLT. De façon inattendue, ce phénomène est indépendant des événements clés de la prophase I méiotique: structure chromatinienne, synapsis, cassures double brin. En outre, les régulateurs du MSCI ne sembleraient pas être impliqués dans le EMLT. Le dynamisme des modifications post-traductionnelles des histones en fin de différenciation des spermatogonies et au cours de la prophase I suggère un lien entre les marques épigénétiques et l'EMLT. En particulier, la marque H3K9me3 montre un profil qui correspond parfaitement avec le profil de la pPOL2.

Nous avons, pour la première fois, caractérisé le programme de néotranscription au moment de la transcription mitose/méiose, dans des cellules rares et transcriptionnellement inactives.

Ce travail de description ouvre des passionnantes perspectives pour adresser les interrelations existantes entre de grands mécanismes cellulaires, telles la transcription et la réparation de l'ADN. La méiose fournit en ce sens un modèle très approprié dans lequel la dynamique transcriptionnelle est frappée d'évènements très contrastés (EMLT / hyperactivation en pachytène / MSCI). C'est également un modèle très propre de génération de nombreuses CDBs et réparation par une voie quasi-exclusive (RH). Ainsi, la méiose offre une opportunité d'étude des liens entre les grands mécanismes cellulaires. Gageons que ces liens ne sont probablement pas spécifiques à la méiose et que leur étude fera également progresser d'autres domaines. Par exemple, les cellules cancéreuses sont très actives transcriptionnellement et très instables d'un point de vue génétique.

IV. Conclusion générale: est-il possible de conclure?

Dans ce manuscrit, j'ai mis l'accent sur la complexité régulationnelle sous-jacente à la transition mitose/méiose. Les cellules germinales doivent assurer l'extinction du programme mitotique ainsi que l'allumage du programme méiotique. Deux voies indépendantes et interconnectées permettent cette reprogrammation à deux niveaux : STRA8 au niveau transcriptionnel et MEIOC/YTHDC2 au niveau post-transcriptionnel. De manière concomitante a lieu un phénomène d'inactivation globale de la transcription. Vraisemblablement, cette baisse de l'activité transcriptionnelle pourrait permettre de cibler et réguler de manière optimale et spécifique les gènes qui doivent être maintenus dans un état actif.

Un équilibre s'instaurerait donc entre : inhibition globale, transcription ciblée de gènes spécifiques et stabilisation/dégradation de transcrits préalablement accumulés dans les cellules.

L'activation de STRA8 et de MEIOC/YTHDC2 sembleraient dépendre de deux voies indépendantes : dans le testicule l'inhibition de la voie de l'AR inhibe STRA8 mais pas MEIOC. Au moins deux voies indépendantes seraient donc impliquées dans la régulation de l'initiation méiotique. Le fait qu'une double invalidation de *Stra8* et *Meioc* ne prévient pas complètement la transition mitose/méiose suggère, en outre, l'existence d'un troisième facteur, ou bien d'un ensemble de facteurs et voies indépendantes, impliqué dans cette transition.

Dans l'ensemble, nous encourageons une vision de la transition mitose/méiose beaucoup plus large et complexe que le modèle classique AR-STRA8-méiose. L'implication de régulateurs additionnels n'est pas forcément étonnante. En effet, cette transition mitose/méiose est partagée par tous les eucaryotes et *Stra8* est spécifique des vertébrés. On peut donc légitiment attendre l'intervention d'un régulateur ancestral. A cette régulation primaire, STRA8 viendrait imposer une couche de régulation additionnelle. Dans la même optique, il serait intéressant d'évaluer à quel point l'EMLT est conservé au-delà des mammifères.

En conclusion, de nombreux travaux doivent encore être entrepris. D'un côté nous pointons vers l'identification du *Meiotic Preventing Factor* qui clarifierait le modèle dichotomique mâle/femelle de l'entrée en méiose. Il est en outre important de clarifier la place de STRA8 dans l'entrée en méiose via l'identification d'acteurs additionnels impliqués dans la transition mitose/méiose. D'un autre côté il est important de clarifier l'équilibre entre stabilisation et dégradation des ARN en début de méiose et le rôle de MEIOC et YTHDC2 dans cette balance.

Enfin, j'espère que quelqu'un, après moi, persistera dans la recherche de l'origine et de la fonction de l'EMLT.

Bibliographie

Abby, E., Tourpin, S., Ribeiro, J., Daniel, K., Messiaen, S., Moison, D., … Livera, G. (2016). Implementation of meiosis prophase i programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nature Communications*, *7*. http://doi.org/10.1038/ncomms10324

Adams, I. R., & McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells : switching from oogenesis to spermatogenesis, *1164*, 1155–1164.

Adams, S. R., Maezawa, S., Alavattam, K. G., Abe, H., Sakashita, A., Shroder, M., … Namekawa, S. H. (2018). RNF8 and SCML2 cooperate to regulate ubiquitination and H3K27 acetylation for escape gene activation on the sex chromosomes.

Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. M., & 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 of the United States of America*, *105*, 14976–14980. http://doi.org/10.1073/pnas.0807297105

Auton, A., Rui Li, Y., Kidd, J., Oliveira, K., Nadel, J., Holloway, J. K., … Boyko, A. R. (2013). Genetic Recombination Is Targeted towards Gene Promoter Regions in Dogs. *PLoS Genetics*, *9*(12). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003984

Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C. K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., … Legube, G. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nature Structural and Molecular Biology*, *21*(4), 366–374. http://doi.org/10.1038/nsmb.2796

Bailey, A. S., Batista, P. J., Gold, R. S., Grace Chen, Y., de Rooij, D. G., Chang, H. Y., & Fuller, M. T. (2017). The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. *eLife*, *6*. http://doi.org/10.7554/eLife.26116

Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y.-C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., & Page, D. C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics*, *38*(12), 1430–1434. http://doi.org/10.1038/ng1919

Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., … Bourc'his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*, *354*(6314), 909–912. http://doi.org/10.1126/science.aah5143

Barchi, M., Roig, I., Di Giacomo, M., De Rooij, D. G., Keeney, S., & Jasin, M. (2008). ATM promotes the obligate XY crossover and both crossover control and chromosome axis integrity on autosomes. *PLoS Genetics*, *4*(5). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000076

Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., Paronetto, M. P., Di Siena, S., Geremia, R., … 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. http://doi.org/10.1242/jcs.057968

Batchelder, C., Dunn, M. A., Choy, B., Suh, Y., Cassie, C., Shim, E. Y., … Blackwell, T. K. (1999). Transcriptional repression by the Caenorhabditis elegans germ-line protein PIE-1. *Genes and Development*, *13*(2), 202–212. http://doi.org/10.1101/gad.13.2.202

Baudat, F., Imai, Y., & De Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. *Nature Reviews Genetics*. http://doi.org/10.1038/nrg3573

Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., & Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell*, *6*, 989–998. http://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00098-8

Benavente, R., Pendas, A. M., Tóth, A., Davies, O. R., García-Tuñón, I., Ramos, I., … Felipe-Medina, N. (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communications*, *7*(1). http://doi.org/10.1038/ncomms13298

Ben-Yishay, R., & Shav-Tal, Y. (2019). The dynamic lifecycle of mRNA in the nucleus. *Current Opinion in Cell Biology*. http://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.007

Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A., & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, *386*(6623), 414–417. http://doi.org/10.1038/386414a0

Best, D., Sahlender, D. a, Walther, N., Peden, A. a, & Adams, I. R. (2008). Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. *Development (Cambridge, England)*, *135*, 1415–1425. http://doi.org/10.1242/dev.019497

Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L, *431*(September), 2–5.

Biswas, U., Hempel, K., Llano, E., Pendas, A., & Jessberger, R. (2016). Distinct Roles of Meiosis-Specific Cohesin Complexes in Mammalian Spermatogenesis. *PLoS Genetics*, *12*(10), 1–24. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006389

Biswas, U., Wetzker, C., Lange, J., Christodoulou, E. G., Seifert, M., Beyer, A., & Jessberger, R. (2013). Meiotic Cohesin SMC1β Provides Prophase I Centromeric Cohesion and Is Required for Multiple Synapsis-Associated Functions. *PLoS Genetics*, *9*(12). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003985

Blackwell, T. K. (2004). Germ cells: Finding programs of mass repression. *Current Biology*. http://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.052

Boekhout, M., Karasu, M. E., Wang, J., Acquaviva, L., Pratto, F., Brick, K., … Keeney, S. (2019). REC114 Partner ANKRD31 Controls Number, Timing, and Location of Meiotic DNA Breaks. *Molecular Cell*. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.023

Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D. G., & Cooke, H. J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *Journal of Cell Biology*, *176*(6), 741–747. http://doi.org/10.1083/jcb.200610027

Bolcun-Filas, E., & Schimenti, J. C. (2012). *Genetics of Meiosis and Recombination in Mice*. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 298). Elsevier Inc. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5

Borrie, M. S., Campor, J. S., Joshi, H., & Gartenberg, M. R. (2017). Binding, sliding, and function of cohesin during transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(7), E1062–E1071. http://doi.org/10.1073/pnas.1617309114

Bowles, J., Feng, C. W., Ineson, J., Miles, K., Spiller, C. M., Harley, V. R., … Koopman, P. (2018). Retinoic Acid Antagonizes Testis Development in Mice. *Cell Reports*, *24*(5), 1330–1341. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.111

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., … Koopman, P. (2006). Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science*, *312*(April), 596–601.

Bowles, J., & Koopman, P. (2010). Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction*. http://doi.org/10.1530/REP-10-0075

Braccioli, L., & de Wit, E. (2019). CTCF: a Swiss-army knife for genome organization and transcription regulation. *Essays In Biochemistry*, EBC20180069. http://doi.org/10.1042/EBC20180069

Brick, K., Thibault-Sennett, S., Smagulova, F., Lam, K.-W. G., Pu, Y., Pratto, F., … Petukhova, G. V. (2018). Extensive sex differences at the initiation of genetic recombination. *Nature*, *561*(7723), 338–342. http://doi.org/10.1038/s41586-018-0492-5

Buaas, F. W., Kirsh, A. L., Sharma, M., McLean, D. J., Morris, J. L., Griswold, M. D., … Braun, R. E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, *36*(6), 647–652. http://doi.org/10.1038/ng1366

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Molecular Cell*. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.019

Busslinger, G. A., Stocsits, R. R., Van Der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A., Galjart, N., & Peters, J. M. (2017). Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature*, *544*(7651), 503–507. http://doi.org/10.1038/nature22063

Cahoon, C. K., & Libuda, D. E. (2019). Leagues of their own: sexually dimorphic features of meiotic prophase I. *Chromosoma*. http://doi.org/10.1007/s00412-019-00692-x

Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*. http://doi.org/10.1038/nrg.2017.60

Carofiglio, F., Sleddens-Linkels, E., Wassenaar, E., Inagaki, A., van Cappellen, W. A., Grootegoed, J. A., … Baarends, W. M. (2018). Repair of exogenous DNA double-strand breaks promotes chromosome synapsis in SPO11-mutant mouse meiocytes, and is altered in the absence of HORMAD1. *DNA Repair*, *63*, 25–38. http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.01.007

Carré, G. A., & Greenfield, A. (2014). Characterising novel pathways in testis determination using mouse genetics. *Sexual Development*, *8*(5), 199–207. http://doi.org/10.1159/000358402

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., … Nussenzweig, A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, *296*(5569), 922–

927. http://doi.org/10.1126/science.1069398

Chalmel, F., & Rolland, A. D. (2015). Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction*. http://doi.org/10.1530/REP-15-0073

Chassot, A. A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., … Chaboissier, M. C. (2008). Activation of β-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Human Molecular Genetics*, *17*(9), 1264–1277. http://doi.org/10.1093/hmg/ddn016

Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, *52*(1), 198–236. http://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198

Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., & Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, *104*(6), 875–889. http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00284-7

Cooper, T. J., Wardell, K., Garcia, V., & Neale, M. J. (2014). Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR. *Experimental Cell Research*, *329*(1), 124–131. http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.016

Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., … Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, *27*(2), 159–166. http://doi.org/10.1038/84781

De Felici, M. (2011). Nuclear Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells: Epigenetic Contribution. *Stem Cells International*, *2011*, 1–15. http://doi.org/10.4061/2011/425863

De Vries, F. A. T., De Boer, E., Van Den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., … Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes and Development*, *19*(11), 1376–1389. http://doi.org/10.1101/gad.329705

Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., & Doenecke, D. (2000). Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry and Cell Biology*, *113*(6), 433–42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933220

Duester, G. (2008). Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell*. http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.002

Eckersley-Maslin, M. A., Alda-Catalinas, C., & Reik, W. (2018). Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. http://doi.org/10.1038/s41580-018-0008-z

Eick, D., & Geyer, M. (2013). The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chemical Reviews*, *113*(11), 8456–8490. http://doi.org/10.1021/cr400071f

Ernst, C., Eling, N., Martinez-jimenez, C. P., Marioni, J. C., & Odom, D. T. (2019). Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nature Communications*. http://doi.org/10.1038/s41467-019-09182-1

Eychenne, T., Werner, M., & Soutourina, J. (2017). Toward understanding of the mechanisms of Mediator function in vivo: Focus on the preinitiation complex assembly. *Transcription*. http://doi.org/10.1080/21541264.2017.1329000

Ferder, I. C., Fung, L., Ohguchi, Y., Zhang, X., Lassen, K. G., Capen, D., … Wang, N. (2019). Meiotic gatekeeper STRA8 suppresses autophagy by repressing Nr1d1 expression during spermatogenesis in mice. *PLoS Genetics*, *15*(5), e1008084. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008084

Filipponi, D., Hobbs, R. M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E. A., Pandolfi, P. P., & Dolci, S. (2007). Repression of kit Expression by Plzf in Germ Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(19), 6770–6781. http://doi.org/10.1128/mcb.00479-07

Foti, R. S., Diaz, P., & Douguet, D. (2016). Comparison of the ligand binding site of CYP2C8 with CYP26A1 and CYP26B1: a structural basis for the identification of new inhibitors of the retinoic acid hydroxylases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*, 148–161. http://doi.org/10.1080/14756366.2016.1193734

Fouquet, B., Pawlikowska, P., Caburet, S., Guigon, C., Mäkinen, M., Tanner, L., … Misrahi, M. (2017). A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *eLife*, *6*. http://doi.org/10.7554/elife.30490

Fu, X. F., Cheng, S. F., Wang, L. Q., Yin, S., De Felici, M., & Shen, W. (2015). DAZ family proteins, key players for germ cell development. *International Journal of Biological Sciences*. http://doi.org/10.7150/ijbs.11536

Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Célébi, C., Dennefeld, C., Feret, B., Klopfenstein, M., … Mark, M. (2012). Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor γ. *Endocrinology*, *153*(January 2012), 438–449. http://doi.org/10.1210/en.2011-1102

Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Di Sauro, A., Sette, C., Behr, R., & Kimmins, S. (2007). Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, *77*(July), 754–764. http://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062265

Greaves, I. K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J. A., & Tremethick, D. J. (2006). The X and Y Chromosomes Assemble into H2A.Z, Containing Facultative Heterochromatin, following Meiosis. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(14), 5394–5405. http://doi.org/10.1128/mcb.00519-06

Greenbaum, M. P., Iwamori, N., Agno, J. E., & Matzuk, M. M. (2008). Mouse TEX14 Is Required for Embryonic Germ Cell Intercellular Bridges but Not Female Fertility1. *Biology of Reproduction*, *80*(3), 449–457. http://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070649

Grey, C., Baudat, F., & de Massy, B. (2018). PRDM9, a driver of the genetic map. *PLoS Genetics*. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007479

Grey, C., Clément, J. A. J., Buard, J., Leblanc, B., Gut, I., Gut, M., … De Massy, B. (2017). In vivo binding of PRDM9 reveals interactions with noncanonical genomic sites. *Genome Research*, *27*(4), 580–590. http://doi.org/10.1101/gr.217240.116

Griswold, M. D. (2015). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, *96*(1), 1–17. http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015

Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Tourpin, S., Habert, R., & Livera, G. (2010). New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Developmental Biology*, *346*(2), 320–330. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.002

Guillemette, B., & Gaudreau, L. (2006). [H2A.Z: a histone variant that decorates gene promoters]. *Med Sci (Paris)*, *22*(11), 941–946.

Guillon, H., Baudat, F., Grey, C., Liskay, R. M., & De Massy, B. (2005). Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Molecular Cell*, *20*(4), 563–573. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.021

Hackett, J. A., Zylicz, J. J., & Surani, M. A. (2012). Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends in Genetics*. http://doi.org/10.1016/j.tig.2012.01.005

Haering, C. H., & Jessberger, R. (2012). Cohesin in determining chromosome architecture. *Experimental Cell Research*. http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.016

Hager, G. L., Mcnally, J. G., & Misteli, T. (2009). Transcription Dynamics. *Molecular Cell*, *35*(6), 741–753. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.005

Hamer, G. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science*, *119*(19), 4025–4032. http://doi.org/10.1242/jcs.03182

Hammoud, S. S., Low, D. H. P., Yi, C., Carrell, D. T., Guccione, E., & Cairns, B. R. (2014). Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, *15*(2), 239–253. http://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.006

Haston, K. M., Tung, J. Y., & Reijo Pera, R. A. (2009). Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro. *PLoS ONE*, *4*(5). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005654

Hernández-Hernández, A., Lilienthal, I., Fukuda, N., Galjart, N., & Höög, C. (2016). CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Scientific Reports*, *6*. http://doi.org/10.1038/srep28355

Herrán, Y., Gutiérrez-Caballero, C., Sánchez-Martín, M., Hernández, T., Viera, A., Barbero, J. L., … Pendás, A. M. (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO Journal*, *30*(15), 3091–3105. http://doi.org/10.1038/emboj.2011.222

Hirota, T., Blakeley, P., Sangrithi, M. N., Mahadevaiah, S. K., Encheva, V., Snijders, A. P., … Turner, J. M. A. (2018). SETDB1 Links the Meiotic DNA Damage Response to Sex Chromosome Silencing in Mice. *Developmental Cell*, *47*(5), 645–659.e6. http://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.004

Hogarth, C. A., Evanoff, R., Mitchell, D., Kent, T., Small, C., Amory, J. K., & Griswold, M. D. (2013). Turning a Spermatogenic Wave into a Tsunami: Synchronizing Murine Spermatogenesis Using WIN 18,4461. *Biology of Reproduction*, *88*(2), 1–9. http://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105346

Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. http://doi.org/10.1172/JCI41303

Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., … Jordan, P. W. (2014). Meiosis-Specific Cohesin Component, Stag3 Is Essential for Maintaining Centromere Chromatid Cohesion, and Required for DNA Repair and Synapsis between Homologous Chromosomes. *PLoS Genetics*, *10*(7). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004413

Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., … He, C. (2017). Ythdc2 is an N6 -methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, *27*(9), 1115–1127. http://doi.org/10.1038/cr.2017.99

Iacovoni, J. S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., & Legube, G. (2010). High-resolution profiling of γh2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO Journal*, *29*(8), 1446–1457. http://doi.org/10.1038/emboj.2010.38

Ishiguro, K. ichiro. (2019). The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells*. http://doi.org/10.1111/gtc.12652

Jameson, S. A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D. M., Mork, L., … Capel, B. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genetics*, *8*(3). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002575

Jeon, Y., Park, M. K., Kim, S. M., Bae, J. S., Lee, C. W., & Lee, H. (2019). TopBP1 deficiency impairs the localization of proteins involved in early recombination and results in meiotic chromosome defects during spermatogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *508*(3), 722–728. http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.001

Jørgensen, A., Nielsen, J. E., Perlman, S., Lundvall, L., Mitchell, R. T., Juul, A., & Meyts, E. R. (2015). Ex vivo culture of human fetal gonads : manipulation of meiosis signalling by retinoic acid treatment disrupts testis development, *30*(10), 2351–2363. http://doi.org/10.1093/humrep/dev194

Jørgensen, A., Nielsen, J. E., Perlman, S., Lundvall, L., Mitchell, R. T., Juul, A., & Rajpert-De Meyts, E. (2015). Ex vivo culture of human fetal gonads: Manipulation of meiosis signalling by retinoic acid treatment disrupts testis development. *Human Reproduction*, *30*(10), 2351–2363. http://doi.org/10.1093/humrep/dev194

Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., Van Berkum, N. L., … Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, *467*(7314), 430–435. http://doi.org/10.1038/nature09380

Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., … Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse, *16*(19), 2272–2280. http://doi.org/10.1093/hmg/ddm179

Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, *88*(3), 375–384.

http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81876-0

Kent, T., Arnold, S. L., Fasnacht, R., Rowsey, R., Mitchell, D., Hogarth, C. A., … Griswold, M. D. (2015). ALDH Enzyme Expression Is Independent of the Spermatogenic Cycle, and Their Inhibition Causes Misregulation of Murine Spermatogenic Processes. *Biology of Reproduction*, *94*(1). http://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131458

Khalil, A. M., Boyar, F. Z., & Driscoll, D. J. (2004). Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(47), 16583–16587. http://doi.org/10.1073/pnas.0406325101

Khobta, A., & Epe, B. (2012). Interactions between DNA damage, repair, and transcription. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.07.014

Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (1974a). Nucleolar and perichromosomal rna synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *Journal of Cell Biology*, *60*(1), 39–53. http://doi.org/10.1083/jcb.60.1.39

Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (1974b). Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *Journal of Cell Biology*, *63*(3), 923–935. http://doi.org/10.1083/jcb.63.3.923

Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (1975). Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *Journal of Cell Biology*, *65*(2), 258–270. http://doi.org/10.1083/jcb.65.2.258

Kimmins, S., Kotaja, N., Fienga, G., Kolthur, U. S., Brancorsini, S., Hogeveen, K., … Sassone-Corsi, P. (2004). A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*, *8*(5), 496–500. http://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61094-2

Klaus, E. S., Gonzalez, N. H., Bergmann, M., Bartkuhn, M., Weidner, W., Kliesch, S., & Rathke, C. (2016). Murine and Human Spermatids Are Characterized by Numerous, Newly Synthesized and Differentially Expressed Transcription Factors and Bromodomain-Containing Proteins. *Biology of Reproduction*, *95*(1), 4–4. http://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137620

Kojima, M. L., de Rooij, D. G., & Page, D. C. (2019). Amplification of a broad transcriptional program by a common factor triggers the meiotic cell cycle in mice. *eLife*, *8*, 1–32. http://doi.org/10.7554/elife.43738

Kojima, M., Soh, Y. Q. S., Godfrey, A. K., Page, D. C., de Rooij, D. G., & Mikedis, M. M. (2017). *Meioc maintains an extended meiotic prophase I in mice*. *PLOS Genetics* (Vol. 13). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006704

Kolas, N. K., Yuan, L., Hoog, C., Heng, H. H. Q., Marcon, E., & Moens, P. B. (2004). Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment. *Cytogenetic and Genome Research*, *105*(2-4), 182–188. http://doi.org/10.1159/000078188

Koshimizu, U., Watanabe, M., & Nakatsuji, N. (1995). Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. *Developmental Biology*, *168*(2), 683–685.

http://doi.org/10.1006/dbio.1995.1113

Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., & 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. http://doi.org/10.1073/pnas.0510813103

Krentz, A. D., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2011). DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Developmental Biology*, *356*(1), 63–70. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.658

Kretschmer, J., Rao, H., Hackert, P., Sloan, K. E., Höbartner, C., & Bohnsack, M. T. (2018). The m6A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5′-3′ exoribonuclease XRN1. *RNA*, *24*(10), 1339–1350. http://doi.org/10.1261/rna.064238.117

Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T. J., Zhao, X., & Duester, G. (2011). Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nature Communications*, *2*, 151. http://doi.org/10.1038/ncomms1136

Lam, K. G., Brick, K., Cheng, G., Pratto, F., & Camerini-Otero, D. R. (2018). Cell-type-specific genomics reveals histone modification dynamics in mammalian meiosis Authors.

Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadieu, A. C., Frydman, R., Habert, R., & Rouiller-Fabre, V. (2006). Use of organ culture to study the human fetal testis development: Effect of retinoic acid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *91*(7), 2696–2703. http://doi.org/10.1210/jc.2005-2113

Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M. P., Jasin, M., Program, B., … Livermore, L. (2012). ATM controls meiotic double-strand break formation, *479*(7372), 237–240. http://doi.org/10.1038/nature10508.ATM

Le Bouffant, R., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., … Livera, G. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Human Reproduction*, *25*(10), 2579–2590. http://doi.org/10.1093/humrep/deq195

Le Bouffant, R., Souquet, B., Duval, N., Duquenne, C., Herve, R., Frydman, N., … Livera, G. (2011). Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation. *Journal of Cell Science*, *124*, e1–e1. http://doi.org/10.1242/jcs.105049

Li, H., & Clagett-Dame, M. (2009). Vitamin A deficiency blocks the initiation of meiosis of germ cells in the developing rat ovary in vivo. *Biology of Reproduction*, *81*(July), 996–1001. http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078808

Li, H., & Kim, K. H. (2004). Retinoic Acid Inhibits Rat XY Gonad Development by Blocking Mesonephric Cell Migration and Decreasing the Number of Gonocytes. *Biology of Reproduction*, *70*(3), 687–693. http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023135

Lin, Y., & Page, D. C. (2005). Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Developmental Biology*, *288*(2), 309–316. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.032

Liu, H., Huang, T., Li, M., Li, M., Zhang, C., Jiang, J., … Chen, Z.-J. (2019). SCRE serves as a unique

synaptonemal complex fastener and is essential for progression of meiosis prophase I in mice. *Nucleic Acids Research*. http://doi.org/10.1093/nar/gkz226

Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Durand, P., & Habert, R. (2000). Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biology of Reproduction*, *62*, 1303–1314. http://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1303

Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Valla, J., & Habert, R. (2000). Effects of retinoids on the meiosis in the fetal rat ovary in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *165*, 225–231. http://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00271-9

Luo, M., Yang, F., Leu, N. A., Landaiche, J., Handel, M. A., Benavente, R., … Wang, P. J. (2013). MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nature Communications*, *4*. http://doi.org/10.1038/ncomms3788

Maatouk, D. M., Dinapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M., & Capel, B. (2008). Stabilization of β-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human Molecular Genetics*, *17*(19), 2949–2955. http://doi.org/10.1093/hmg/ddn193

MacLean, G., Abu-Abed, S., Dollé, P., Tahayato, A., Chambon, P., & Petkovich, M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mechanisms of Development*, *107*(1-2), 195–201. http://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00463-4

MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., & Petkovich, M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*, *148*(February), 4560–4567. http://doi.org/10.1210/en.2007-0492

Maezawa, S., Hasegawa, K., Yukawa, M., Sakashita, A., Alavattam, K. G., Andreassen, P. R., … Namekawa, S. H. (2017). Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis. *Genes and Development*, *31*(16), 1693–1703. http://doi.org/10.1101/gad.302000.117

Maezawa, S., Yukawa, M., Alavattam, K. G., Barski, A., & Namekawa, S. H. (2018). Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis. *Nucleic Acids Research*, *46*(2), 593–608. http://doi.org/10.1093/nar/gkx1052

Mahowald, A. P. (2001). Assembly of the Drosophila germ plasm. *International Review of Cytology*, *203*, 187–213. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131516

Margaritis, T., & Holstege, F. C. P. (2008). Minireview Poised RNA Polymerase II Gives Pause for Thought, 2006–2009. http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.027

Margolin, G., Khil, P. P., Kim, J., Bellani, M. A., & Camerini-Otero, R. D. (2014). Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis. *BMC Genomics*, *15*(1). http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-39

Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Féret, B., Vernet, N., … Ghyselinck, N. B. (2008). STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature

chromosome condensation. *Journal of Cell Science*, *121*, 3233–3242. http://doi.org/10.1242/jcs.035071

Matson, C. K., Murphy, M. W., Griswold, M. D., Yoshida, S., Bardwell, V. J., & 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*(4), 612–624. http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.010

McClelland, K. S., Wainwright, E. N., Bowles, J., & Koopman, P. (2015). Rapid Screening of Gene Function by Systemic Delivery of Morpholino Oligonucleotides to Live Mouse Embryos. *Plos One*, *10*, e0114932. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0114932

McLaren, A. (1980). Oocytes in the testis. *Nature*, *283*(5748), 688–689. http://doi.org/10.1038/283688a0

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, *262*(1), 1–15. http://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00214-8

Mclaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse, *262*, 1–15. http://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00214-8

McNicoll, F., Stevense, M., & Jessberger, R. (2013). Cohesin in Gametogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 102, pp. 1–34). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00001-5

Meikar, O., Vagin, V. V, Chalmel, F., Sõstar, K., Lardenois, A., Hammell, M., … Kotaja, N. (2014). An atlas of chromatoid body components, 483–495. http://doi.org/10.1261/rna.043729.113.7

Mello, C. C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R., & Priess, J. R. (1996). The PIE-1 protein and germline specification in C. elegans embryos. *Nature*, *382*(6593), 710–712. http://doi.org/10.1038/382710a0

MONESI, V. (1964). Ribonucleic Acid Synthesis During Mitosis and Meiosis in the Mouse. *The Journal of Cell Biology*, *22*(31), 521–532. http://doi.org/10.1083/jcb.22.3.521

Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., … Poulat, F. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*, *136*(11), 1813–1821. http://doi.org/10.1242/dev.032631

Morales, C. R., & Hecht, N. B. (2005). Poly(A)+ Ribonucleic Acids are Enriched in Spermatocyte Nuclei but Not in Chromatoid Bodies in the Rat Testis1. *Biology of Reproduction*, *50*(2), 309–319. http://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.309

Morelli, M. A., & Cohen, P. E. (2005). Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, *130*(6), 761–781. http://doi.org/10.1530/rep.1.00865

Moreno, N. N., Giono, L. E., Botto, A. E. C., Muñoz, M. J., & Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin , DNA structure and alternative splicing, *589*, 3370–3378.

Morgan, M., Kabayama, Y., Much, C., Ivanova, I., Di Giacomo, M., Auchynnikava, T., … O'Carroll, D. (2019). A programmed wave of uridylation-primed mRNA degradation is essential for meiotic progression and

mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, *29*(3), 221–232. http://doi.org/10.1038/s41422-018-0128-1

Morita, Y., & Tilly, J. L. (1999). Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. *Endocrinology*, *140*(6), 2696–2703. http://doi.org/10.1210/endo.140.6.6826

Mu, W., Starmer, J., Shibata, Y., Yee, D., & Magnuson, T. (2017). EZH1 in germ cells safeguards the function of PRC2 during spermatogenesis. *Developmental Biology*, *424*(2), 198–207. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.017

Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Yabuta, Y., & Saitou, M. (2013). Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*, *501*(7466), 222–226. http://doi.org/10.1038/nature12417

Namekawa, S. H., & Lee, J. T. (2009). XY and ZW: Is Meiotic Sex Chromosome Inactivation the Rule in Evolution? *PLoS Genetics*, *5*(5), e1000493. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000493

Naro, C., Jolly, A., Di Persio, S., Bielli, P., Setterblad, N., Alberdi, A. J., … Sette, C. (2017). An Orchestrated Intron Retention Program in Meiosis Controls Timely Usage of Transcripts during Germ Cell Differentiation. *Developmental Cell*, *41*(1), 82–93.e4. http://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.003

Nieto Moreno, N., Giono, L. E., Cambindo Botto, A. E., Muñoz, M. J., & Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin, DNA structure and alternative splicing. *FEBS Letters*. http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.002

Ojarikre, O. A., Hirota, T., Turner, J. M. A., McKinnon, P. J., de Rooij, D. G., ElInati, E., … Sangrithi, M. (2017). DNA damage response protein TOPBP1 regulates X chromosome silencing in the mammalian germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(47), 12536–12541. http://doi.org/10.1073/pnas.1712530114

Ontoso, D., Kauppi, L., Keeney, S., & San-Segundo, P. A. (2014). Dynamics of DOT1L localization and H3K79 methylation during meiotic prophase I in mouse spermatocytes. *Chromosoma*, *123*(1-2), 147–164. http://doi.org/10.1007/s00412-013-0438-5

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., … Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *Journal of Cell Biology*, *135*(2), 469–477. http://doi.org/10.1083/jcb.135.2.469

Oulhen, N., & Wessel, G. (2017). A quiet space during rush hour: Quiescence in primordial germ cells. *Stem Cell Research*, *25*, 296–299. http://doi.org/10.1016/j.scr.2017.11.001

Ouyang, J., Lan, L., & Zou, L. (2017). Regulation of DNA break repair by transcription and RNA. *Science China Life Sciences*, *60*(10), 1081–1086. http://doi.org/10.1007/s11427-017-9164-1

Pacheco, S., Maldonado-Linares, A., Marcet-Ortega, M., Rojas, C., Martínez-Marchal, A., Fuentes-Lazaro, J., … Roig, I. (2018). ATR is required to complete meiotic recombination in mice. *Nature Communications*, *9*(1). http://doi.org/10.1038/s41467-018-04851-z

Page, J., De La Fuente, R., Manterola, M., Parra, M. T., Viera, A., Berríos, S., … Rufas, J. S. (2012). Inactivation or non-reactivation: What accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma*, *121*, 307–326. http://doi.org/10.1007/s00412-012-0364-y

Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Servel, N., Taourit, S., Furet, J. P., … Vaiman, D. (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genetics*, *29*(4), 453–458. http://doi.org/10.1038/ng769

Pálfy, M., Joseph, S. R., & Vastenhouw, N. L. (2017). The timing of zygotic genome activation. *Current Opinion in Genetics and Development*. http://doi.org/10.1016/j.gde.2016.12.001

Pani, B., & Nudler, E. (2017). Mechanistic insights into transcription coupled DNA repair. *DNA Repair*. http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.006

Pannetier, M., Chassot, A. A., Chaboissier, M. C., & Pailhoux, E. (2016). Involvement of FOXL2 and RSPO1 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. *Sexual Development*, *10*(4), 167–184. http://doi.org/10.1159/000448667

Papanikos, F., Clément, J. A. J., Testa, E., Ravindranathan, R., Grey, C., Dereli, I., … Toth, A. (2019). Mouse ANKRD31 Regulates Spatiotemporal Patterning of Meiotic Recombination Initiation and Ensures Recombination between X and Y Sex Chromosomes. *Molecular Cell*. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.022

Paronetto, M. P., & Sette, C. (2010). Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. *International Journal of Andrology*. http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00959.x

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J., & Schöler, H. R. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanisms of Development*, *71*(1-2), 89–98. http://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00002-1

Peters, A. H. F. M., Carroll, O., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Scho, C., … Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability, *107*, 323–337.

Puno, M. R., Jain, D., Mason, C. E., Lima, C. D., Anderson, K. V, Meydan, C., … Lailler, N. (2018). ketu mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. *eLife*, *7*, 1–29. http://doi.org/10.7554/elife.30919

Rankin, S. (2015). Complex elaboration: Making sense of meiotic cohesin dynamics. *FEBS Journal*. http://doi.org/10.1111/febs.13301

Raverdeau, M., Gely-Pernot, a., Feret, B., Dennefeld, C., Benoit, G., Davidson, I., … Ghyselinck, N. B. (2012). Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(41), 16582–16587. http://doi.org/10.1073/pnas.1214936109

Rhinn, M., & Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development, *858*, 843–858.

http://doi.org/10.1242/dev.065938

Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Bourbon, H. M., & De Massy, B. (2016). The Topo VIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science*, *351*(6276), 943–949. http://doi.org/10.1126/science.aad5309

Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell*, *6*, 975–987. http://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00097-6

Romer, K. A., de Rooij, D. G., Kojima, M. L., & Page, D. C. (2018). Isolating mitotic and meiotic germ cells from male mice by developmental synchronization, staging, and sorting. *Developmental Biology*, *443*(1), 19–34. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.08.009

Rossi, P., Sette, C., Dolci, S., & Geremia, R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation*. http://doi.org/10.1007/BF03343784

Royo, H., Prosser, H., Ruzankina, Y., Mahadevaiah, S. K., Cloutier, J. M., Baumann, M., … Turner, J. M. A. (2013). ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes and Development*, *27*(13), 1484–1494. http://doi.org/10.1101/gad.219477.113

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*, *16*(1), 83–83. http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x

Saba, R., Wu, Q., & Saga, Y. (2014). CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. *Developmental Biology*, *389*(2), 173–181. http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.02.013

Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. http://doi.org/10.1038/nrm3952

Saitou, M. (2009). Germ cell specification in mice. *Current Opinion in Genetics and Development*, *19*(4), 386–395. http://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.003

Saitou, M., & Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11). http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375

Santos, A. C., & Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in Drosophila and beyond. *Current Biology*. http://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.018

Sanz, L. A., Kota, S. K., & Feil, R. (2010). Genome-wide DNA demethylation in mammals. *Genome Biology*, *11*(3). http://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-110

Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*. http://doi.org/10.1126/science.1070963

Schaner, C. (2006). Germline chromatin. *WormBook*. http://doi.org/10.1895/wormbook.1.73.1

Schaner, C. E., Deshpande, G., Schedl, P. D., & Kelly, W. G. (2003). A conserved chromatin architecture

marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Developmental Cell*, *5*(5), 747–757. http://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00327-7

Schmid, R., Grellscheid, S. N., Ehrmann, I., Dalgliesh, C., Danilenko, M., Paronetto, M. P., … Elliott, D. J. (2013). The splicing landscape is globally reprogrammed during male meiosis. *Nucleic Acids Research*, *41*(22), 10170–10184. http://doi.org/10.1093/nar/gkt811

Schoenmakers, S., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Laven, J. S. E., Grootegoed, J. A., & Baarends, W. M. (2009). Female meiotic sex chromosome inactivation in chicken. *PLoS Genetics*, *5*(5). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000466

Schulz, K. N., & Harrison, M. M. (2019). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nature Reviews. Genetics*, *20*(4), 221–234. http://doi.org/10.1038/s41576-018-0087-x

Schupp, M., Curtin, J., & Kim, R. (2007). A Widely Used Retinoic Acid Receptor Antagonist Induces Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Activity. *Molecular Pharmacology*, *71*(5), 1251–1257. http://doi.org/10.1124/mol.106.033662.(RXR)

Selth, L. A., & Sigurdsson, S. (2010). Transcript elongation by RNA polymerase II. *Annual Review of …*. Retrieved from http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425\npapers2://publication/uuid/95401837-C2B2-4228-A8BE-E90274161485

Selth, L. A., Sigurdsson, S., & Svejstrup, J. Q. (2010). Transcript Elongation by RNA Polymerase II. http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425

Seydoux, G., & Dunn, M. A. (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster. *Development (Cambridge, England)*, *124*(11), 2191–201. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187145

Shandilya, J., & Roberts, S. G. E. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. http://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2012.01.010

Shibuya, H., Morimoto, A., & Watanabe, Y. (2014). The Dissection of Meiotic Chromosome Movement in Mice Using an In Vivo Electroporation Technique. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004821. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004821

Shilatifard, A. (2012). The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 65–95. http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100

Shin, Y. H., Choi, Y., Erdin, S. U., Yatsenko, S. A., Kloc, M., Yang, F., … Rajkovic, A. (2010). Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genetics*, *6*(11). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001190

SHIRAKATA, Y., HIRADATE, Y., INOUE, H., SATO, E., & TANEMURA, K. (2014). Histone H4 Modification During Mouse Spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Development*, *60*(5), 383–387. http://doi.org/10.1262/jrd.2014-018

Sleutels, F., Soochit, W., Bartkuhn, M., Heath, H., Dienstbach, S., Bergmaier, P., … Galjart, N. (2012). The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner. *Epigenetics and Chromatin*, *5*(1). http://doi.org/10.1186/1756-8935-5-8

Smagulova, F., Brick, K., Pu, Y., Sengupta, U., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2013). Suppression of genetic recombination in the pseudoautosomal region and at subtelomeres in mice with a hypomorphic Spo11 allele. *BMC Genomics*, *14*(1). http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-493

Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., & Hishikawa, Y. (2011). Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis, *44*(4), 183–190. http://doi.org/10.1267/ahc.11027

Sonoda, J., & Wharton, R. P. (1999). Recruitment of nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes and Development*, *13*(20), 2704–2712. http://doi.org/10.1101/gad.13.20.2704

Soumillon, M., Necsulea, A., Weier, M., Brawand, D., Zhang, X., Gu, H., … Kaessmann, H. (2013). Cellular Source and Mechanisms of High Transcriptome Complexity in the Mammalian Testis. *Cell Reports*, *3*(6), 2179–2190. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.031

Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., … Livera, G. (2013). MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. *PLoS Genetics*, *9*(9). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784

Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., & Livera, G. (2012). Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology*, *153*(May 2012), 2466–2473. http://doi.org/10.1210/en.2011-2056

Subramanian, V. V., & Hochwagen, A. (2014). The meiotic checkpoint network: Step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(10). http://doi.org/10.1101/cshperspect.a016675

Suzuki, A., Igarashi, K., Aisaki, K., Kanno, J., & Saga, Y. (2010). NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(8), 3594–3599. http://doi.org/10.1073/pnas.0908664107

Suzuki, A., & Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes and Development*, *22*, 430–435. http://doi.org/10.1101/gad.1612708

Svingen, T., Wilhelm, D., Combes, A. N., Hosking, B., Harley, V. R., Sinclair, A. H., & Koopman, P. (2009). Ex vivo magnetofection: a novel strategy for the study of gene function in mouse organogenesis. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *238*(March), 956–964. http://doi.org/10.1002/dvdy.21919

Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N., & Shinkai, Y. (2007). Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO Journal*, *26*(14), 3346–3359. http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601767

Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, *136*(18), 3033–3042. http://doi.org/10.1242/dev.033183

Tam, P. P., & Snow, M. H. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *64*, 133–47. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7310300

Tedesco, M., Desimio, M. G., Klinger, F. G., De Felici, M., & Farini, D. (2013). Minimal concentrations of retinoic acid induce stimulation by retinoic acid 8 and promote entry into meiosis in isolated pregonadal and gonadal mouse primordial germ cells. *Biology of Reproduction*, *88*(May), 145. http://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106526

Tedesco, M., La Sala, G., Barbagallo, F., De Felici, M., & Farini, D. (2009a). STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35781–35793. http://doi.org/10.1074/jbc.M109.056481

Tedesco, M., La Sala, G., Barbagallo, F., De Felici, M., & Farini, D. (2009b). STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35781–35793. http://doi.org/10.1074/jbc.M109.056481

Teletin, M., Vernet, N., Ghyselinck, N. B., & Mark, M. (2017). Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation. *Current Topics in Developmental Biology*, *125*, 191–225. http://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.013

Teletin, M., Vernet, N., Yu, J., Klopfenstein, M., Jones, J. W., Féret, B., … Mark, M. (2019). Two functionally redundant sources of retinoic acid secure spermatogonia differentiation in the seminiferous epithelium. *Development*, *146*(1), dev170225. http://doi.org/10.1242/dev.170225

Topletz, A. R., Thatcher, J. E., Zelter, A., Lutz, J. D., Tay, S., Nelson, W. L., & Isoherranen, N. (2013). Comparison of the Function and Expression of CYP26A1 and CYP26B1, the two Retnoic Acid Hydroxylases. *Biochemical Pharmacology*, *83*(1), 149–163. http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.10.007.Comparison

Trautmann, E., Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Habert, R., & Livera, G. (2008). Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle*, *7*(January 2015), 656–664. http://doi.org/10.4161/cc.7.5.5482

Turner, J. M. A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, *134*(10), 1823–1831. http://doi.org/10.1242/dev.000018

Turner, J. M. A. (2015). Meiotic Silencing in Mammals. *Annual Review of Genetics*, *49*(1), 395–412. http://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055145

Turner, J. M. A., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G. V. R., … Deng, C. X. (2004).

BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology*, *14*(23), 2135–2142. http://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.032

Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., … Yamagata, K. (2017). Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis Report Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *CellReports*, *18*(3), 593–600. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.065

Van Pelt AM, D. R. D. G. (1990). The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol Reprod*, *42*(4), 677–682.

Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., … Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science*, *351*(6276), 939–943. http://doi.org/10.1126/science.aad5196

Ward, A., Hopkins, J., Mckay, M., Murray, S., & Jordan, P. W. (2016). Genetic Interactions Between the Meiosis-Specific Cohesin Components, STAG3, REC8, and RAD21L. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *6*(6), 1713–1724. http://doi.org/10.1534/g3.116.029462

Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A. J. M., Schäfer, S., Kuckenberg, P., … Schorle, H. (2010). Critical Function of AP-2gamma/TCFAP2C in Mouse Embryonic Germ Cell Maintenance1. *Biology of Reproduction*, *82*(1), 214–223. http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078717

Wendt, K. S., & Peters, J. M. (2009). How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Research*, *17*(2), 201–214. http://doi.org/10.1007/s10577-008-9017-7

White, J. A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., … Petkovich, M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6403–6408. http://doi.org/10.1073/pnas.120161397

Widger, A., Mahadevaiah, S. K., Lange, J., Elinati, E., Zohren, J., Hirota, T., … Turner, J. M. A. (2018). ATR is a multifunctional regulator of male mouse meiosis. *Nature Communications*, *9*(1). http://doi.org/10.1038/s41467-018-04850-0

Winters, T., McNicoll, F., & Jessberger, R. (2014). Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO Journal*, *33*(11), 1256–1270. http://doi.org/10.1002/embj.201387330

Wojtas, M. N., Pandey, R. R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., & Pillai, R. S. (2017). Regulation of m 6 A Transcripts by the 3'→5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline. *Molecular Cell*, *68*(2), 374–387.e12. http://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.021

Wojtasz, L., Cloutier, J. M., Baumann, M., Daniel, K., Varga, J., Fu, J., … Tóth, A. (2012). Meiotic DNA double-strand breaks and chromosome asynapsis in mice are monitored by distinct HORMAD2-independent and -dependent mechanisms. *Genes and Development*, *26*(9), 958–973.

http://doi.org/10.1101/gad.187559.112

Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., … Toth, A. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genetics*, *5*(10). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000702

Wolbach, B., & Howe, P. R. (1925). Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin. *The Journal of Experimental Medecine*, *42*, 753–777. http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1978.tb03675.x

Wu, Q., Kanata, K., Saba, R., Deng, C.-X., Hamada, H., & Saga, Y. (2013). Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. *Development (Cambridge, England)*, *140*, 291–300. http://doi.org/10.1242/dev.087882

Xu, H., Beasley, M. D., Warren, W. D., van der Horst, G. T. J., & McKay, M. J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Developmental Cell*, *8*(6), 949–961. http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.018

Xu, K., Yang, Y., Feng, G. H., Sun, B. F., Chen, J. Q., Li, Y. F., … Li, W. (2017). Mettl3-mediated m 6 A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Research*, *27*(9), 1100–1114. http://doi.org/10.1038/cr.2017.100

Yamada, S., Kim, S., Tischfield, S. E., Jasin, M., Lange, J., & Keeney, S. (2017). Genomic and chromatin features shaping meiotic double-strand break formation and repair in mice. *Cell Cycle*, *16*(20), 1870–1884. http://doi.org/10.1080/15384101.2017.1361065

Yamaji, M., Sano, M., Saga, Y., Shigeta, M., Matsui, Y., Seki, Y., … Shinkai, Y. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, *134*(14), 2627–2638. http://doi.org/10.1242/dev.005611

Yang, F., De La Fuente, R., Leu, N. A., Baumann, C., McLaughlin, K. J., & Wang, P. J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *Journal of Cell Biology*, *173*(4), 497–507. http://doi.org/10.1083/jcb.200603063

Yokobayashi, S., Liang, C. Y., Kohler, H., Nestorov, P., Liu, Z., Vidal, M., … Peters, A. H. F. M. (2013). PRC1 coordinates timing of sexual differentiation of female primordial germ cells. *Nature*, *495*(7440), 236–240. http://doi.org/10.1038/nature11918

Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., & Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, *296*(5570), 1115–1118. http://doi.org/10.1126/science.1070594

Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., & Höög, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*, *5*(1), 73–83. http://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80404-9

Zalokar, M. (1976). Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of

Drosophila eggs. *Developmental Biology*, *49*(2), 425–437. http://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90185-8

Zarkower, D. (2013). DMRT Genes in Vertebrate Gametogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 102, pp. 327–356). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00012-X

Zhang, J., Fujiwara, Y., Yamamoto, S., & Shibuya, H. (2019). A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nature Communications*, *10*(1). http://doi.org/10.1038/s41467-019-08676-2

Zhang, Q., Ji, S.-Y., Busayavalasa, K., & Yu, C. (2019). SPO16 binds SHOC1 to promote homologous recombination and crossing-over in meiotic prophase I. *Science Advances*, *5*(1), eaau9780. http://doi.org/10.1126/sciadv.aau9780

Zhang, T., Murphy, M. W., Gearhart, M. D., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2014). The mammalian Doublesex homolog DMRT6 coordinates the transition between mitotic and meiotic developmental programs during spermatogenesis. *Development*, *141*, 3662–3671. http://doi.org/10.1242/dev.113936

Zhao, Y., & Garcia, B. A. (2015). Comprehensive catalog of currently documented histone modifications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(9). http://doi.org/10.1101/cshperspect.a025064

Résumé

La méiose est un processus **hautement conservé**, central dans la **reproduction sexuée,** permettant la production de **cellules haploïdes** à partir des cellules germinales diploïdes. Chez les mammifères l'entrée en méiose est étroitement **régulée** et dépendante du sexe : elle a lieu au cours de la vie fœtale chez la femelle et pendant la vie post-natale chez le mâle. À l'heure actuelle, **l'acide rétinoïque (AR**) est considéré comme le principal régulateur de l'entrée en méiose : il induirait l'expression de ***Stra8*** (*Stimulated by the retinoic acid gene 8),* facteur transcriptionnel clé de la **transition mitose/méiose**. Dans les testicules fœtaux, **CYP26B1,** enzyme capable de cataboliser l'AR, inhibe l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose. Cependant, il n'existe pas de preuve définitive du rôle de l'AR endogène dans l'initiation de la méiose.

Nous avons donc tenté de clarifier l'implication de l'AR dans la régulation de *Stra8* en vie fœtale. Pour cela nous avons développé une méthode de surexpression *ex vivo* des enzymes CYP26B1 et CYP26A1, une autre enzyme avec une activité catalytique de l'AR. Nous montrons que CYP26B1 est suffisant pour inhiber STRA8 dans l'ovaire fœtal, **indépendamment de la voie de signalisation de l'AR.** Nous proposons ainsi que l'AR agisse dans l'amplification de *Stra8* plutôt que dans son induction primaire.

Récemment deux autres facteurs ont été caractérisés pour leur rôle clé dans la régulation de la transition mitose/méiose au niveau post-transcriptionnel : MEIOC et son partenaire YTHDC2. Nous avons effectué une analyse des mutants ***Stra8, Meioc* et *Ythdc2***, qui révèlent de nombreuses similarités. Nous émettons donc l'hypothèse de l'existence d'un *continuum* entre la régulation **transcriptionnelle** (par STRA8) et **post-transcriptionnelle** (par MEIOC/YTHDC2) en début de méiose. En outre, la double-invalidation de *Stra8* et *Meioc* ne prévient pas l'entrée en méiose de quelques rares spermatocytes. Nous suggérons donc l'existence de facteurs additionnels, encore à découvrir, contrôlant la transition mitose/méiose.

Enfin, nous montrons qu'au moment de la transition mitose/méiose les spermatocytes I sont **trancriptionnellement silencieux.** Cette répression transcriptionnelle est en partie régulée par *Stra8* mais elle est indépendante des évènements clés de la prophase I : cassures double brin, synapsis des chromosomes homologues, changements de la structure chromatinienne. En exploitant une méthode de synchronisation de la spermatogenèse et en immunoprécipitant les ARN néotranscrits, nous avons alors caractérisé le paysage de la transcription en début de méiose pour la première fois. Nous mettons ainsi en évidence des évènements de **stabilisation/déstabilisation** des ARN ayant lieu au cours de la prophase I.

Ces travaux ont donc mis en lumière le haut degré de complexité caractérisant l'entrée en méiose des cellules germinales. Cette dernière est régulée par plusieurs facteurs, dont certains demeurent encore inconnus, aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Mots-clés : Entrée en méiose, prophase I méiotique, acide rétinoïque, *Stra8*, *Meioc/Ythdc2*, régulation post-transcriptionnelle, *silencing* transcriptionnel

Summary

Meiosis is a conserved process, allowing the production of haploid germ cells. In mammals, entry into meiosis is sexually dichotomic, taking place during fetal life in ovaries and during postnatal life in testes. In fetal ovaries, Retinoic Acid (RA) is believed to activate *Stra8* (*Stimulated by the retinoic acid gene 8)*, a key factor of mitosis/meiosis transition. In fetal testes, CYP26B1, a RA-metabolising enzyme, prevents *Stra8* expression. However, the exact role of endogenous RA remains uncertain.

The first objective of my work was to clarify the function of endogenous RA in meiotic initiation. For this purpose, we created a model of artificial RA deficiency by ex vivo electroporation of fetal gonads with plasmids encoding *Cyp26b1* or *Cyp26a1*, two RA-metabolising enzymes. We observed that ectopic CYP26B1 is sufficient to prevent STRA8 appearance in germ cells from fetal ovaries. In contrast, overexpression of CYP26A1 only mildly affects the expression of Stra8 mRNA. We thus conclude that CYP26B1 acts independently of RA signalling pathway on meiotic initiation. We propose a two-step model with first a RA-independent *Stra8* induction, followed by its RA-dependent amplification.

Recently, MEIOC and YTHDC2 have been caracterised as key post-transcriptional regulators of mitosis/meiosis transition. Here, we compare the phenotypes of *Stra8*, *Meioc* and *Ythdc2* mutant mice Their high similarity prompt us to hypothesise a continuity between transcriptional and post-transcriptional regulations. In parallel, we show that double invalidation of *Stra8* and *Meioc* does not completely prevent meiotic initiation. Thus, we hypothesise the existence of other unknown mitosis/meiosis regulators.

Finally, we characterised a genome wide arrest of transcription taking place during mitosis/meiosis transition. This transcriptional silencing is partly dependent of *Stra8* but is independent of other key events of meiotic prophase I: double-strand breaks, homologous chromosome synapsis, axe-loop chromosome structure. We took advantage of a spermatogenesis synchronisation protocol and nascent RNA immunoprecipitation, to characterise the transcriptional landscape of early-meiotic germ cells. This highlighted stabilization and destabilization phemomena taking place during prophase I.

As a whole, we show the high complexity level of meiosis initiation, which has to be finely regulated by the orchestration of transcriptional and post-transcriptional events.

Keywords : Meiotic initaition, meiotic prophase I, *Stra8*, *Meioc/Ythdc2*, post-transcriptional regulation, transcriptional *silencing*.

Liste des éléments sous droits

Légende	Type	Source	DATE	Numéro (thèse)	pages (thèse)
Figure 3: De la spécification des Cellules Germinale Primordiales (CG	Image	*Spiller et al. 2017*	2017	Figure 3 A	Page 8
Figure 3: De la spécification des Cellules Germinale Primordiales (CG	Image	*M. De Felici, 2011*	2011	Figure 3 B	Page 8
Figure 5: Métabolisme de l'Acide Rétinoïque.	Image	*Teletin et al. 2017*	2017	Figure 5	Page 14
Figure 6: Modèle du rôle de l'Acide Rétinoïque (AR) dans la régulatio	Image	*Bowles et al., 2006*	2006	Figure 6	Page 16
Figure 12: Régulations des trois étapes de la spermatogenèse régulé	Image	*Teletin et al., 2017*	2017	Figure 12	Page 30
Figure 16: Structure et fonctions des cohésines.	Image	*Bolcun-Filas and Schimenti, 2012; Haering and Jessber*	2012	Figure 16	Page 40
Figure 18: *Synapsis* des chromosomes homologues au cours de la p	Image	*Burgoyne et al. 2009*	2009	Figure 18	Page 44
Figure 20: Conservation du MSCI entre les mammifères (souris) et le	Image	*Namekawa et al. 2009*	2009	Figure 20	Page 50
Figure 23: Origine des cellules germinales chez la Drosophile.	Image	*Seydoux et al. 1997*	1997	Figure 23	Page 64
Figure 24: Inactivation transcriptionnelle des cellules germinales prim	Image	*Seydoux et al. 1997*	1997	Figure 24	Page 64
Figure 25: Origine des cellules germinales chez C. elegans.	Image	*Seydoux et al. 1997*	1997	Figure 25	Page 64
Figure 26: Inactivation transcriptionnelle des cellules P chez C. elega	Image	*Seydoux et al. 1997*	1997	Figure 26	Page 64
Figure 27: Inactivité transcriptionnelle dans les Cellules Germinales F	Image	*Seki et al. 2007*	2007	Figure 27	Page 66
Figure 28: Incorporation de l'Uridine-H^3 et autoradiographie dans des	Image	*V. Monesi 1964*	1964	Figure 28	Page 68
Figure 29: Absence de l'ARN polymérase II active en début de méios	Image	*Page et al. 2012*	2012	Figure 29	Page 68
Figure 30: Baisse de transcription concomitante à la transition des his	Image	*Klaus et al. 2016*	2016	Figure 30	Page 70
Figure 31: Représentation schématique de l'activation du génome en	Image	*Eckersley-Maslin et al. 2018*	2018	Figure 31	Page 72
Figure 8: Comparaison des profils d'expression de marqueurs de spe	Image	*Ernst et al. 2019*	2019	Figure 8 discussion	Page 164

)